



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón"

TESIS DE GRADO

**Previa a la obtención del título de
ACUICULTOR**

Presentada por

Kleber Siavichay Cornejo

**GUAYAQUIL - ECUADOR
1997**

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Por el gran esfuerzo y fé
que han puesto en mí.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las personas que me han ayudado para la realización y culminación de este trabajo. De manera especial al Dr. Eric Mialhe y a quien en vida fue Dra. Lucía Carrera, directores de esta tesis.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su director general Dr. Jorge Calderón, lugar donde se desarrolló el presente estudio.

Al laboratorio Macrobio y a las personas que lo conforman por haberme apoyado y dado la facilidad de realizar los muestreos.

DECLARACION EXPRESA

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

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'KASE', is written over a horizontal dotted line.

Kléber A. Siavichay C.



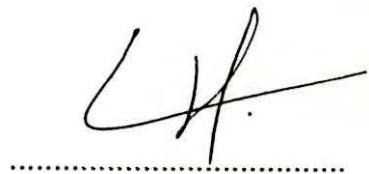
Jerry Landívar, M. Sc.

Presidente del Tribunal



Jorge Calderón V., Ph.D.

Miembro del Tribunal



Eric Mialhe, Ph.D.

Director de Tesis

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	ii
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Larvicultura del camarón en el Ecuador.....	3
1.2. Enfermedades bacterianas asociadas a la larvicultura de camarón.....	4
1.3. Características de los principales agentes bacterianos que afectan al camarón.....	8
1.3.1. Familia <i>Pseudomonaceae</i>	8
1.3.1.1. Descripción y propiedades metabólicas del género <i>Pseudomonas</i>	8
1.3.2. Familia <i>Vibrionaceae</i>	10
1.3.2.1. Descripción y propiedades metabólicas del género <i>Vibrio</i>	11
1.3.2.2. Descripción y propiedades metabólicas del género <i>Aeromonas</i>	12
1.3.2.3. Descripción y propiedades metabólicas del género <i>Photobacterium</i>	13
1.4. Técnicas empleadas en el control de enfermedades bacterianas.....	14
1.4.1. Bacteriología Clásica.....	14

1.4.2. Técnicas de asepsia.....	15
1.4.3. Utilización de antibióticos.....	16
1.5. Nuevas técnicas de identificación bacteriana.....	16
1.5.1. Técnicas de identificación bioquímica.....	16
1.5.2. Técnicas inmunológicas.....	17
1.5.3. Técnicas de Biología Molecular: (AP-PCR).....	19
2. MATERIALES Y METODOS.....	23
2.1. Material biológico.....	23
2.1.1. Animales.....	23
2.1.2. Anticuerpos.....	23
2.1.3. Aislados bacterianos.....	23
2.2. Metodología.....	24
2.2.1. Descripción del sistema de cultivo.....	24
2.2.2. Muestras diarias.....	24
2.2.3. Técnicas de bacteriología.....	25
2.2.4. Técnicas de pruebas bioquímicas.....	26
2.2.5. Técnicas de pruebas antigénicas.....	31
2.2.5.1. Técnica de dot-blot.....	31
2.2.6. Técnicas de Biología Molecular.....	33
2.2.6.1. Técnica para la extracción de ADN de bacterias.....	33
2.2.6.2. Protocolo para la amplificación de ADN por medio de una AP-PCR.....	33



2.2.6.3. Elaboración de un gel de electroforesis (1.5% de agarosa).....	34
2.2.6.4. Depósito de la muestra en el gel.....	34
RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60
ANEXOS.....	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de aislamiento por estrias.....	15
Figura 2. Bioquímica miniaturizada.....	18
Figura 3. Principio del Dot-blot.....	20
Figura 4. AP-PCR mediante la utilización de ADN bacterial.....	21
Figura 5. Plan de trabajo para el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias.....	37
Figura 6. Resultados de los aislados bacterianos presentes en el tanque # 20.....	41
Figura 7. Resultados de los aislados bacterianos presentes en el tanque # 21.....	46
Figura 8. Resultados de los aislados bacterianos presentes en el tanque # 18.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las familias <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> y <i>Pseudomonaceae</i>	9
Tabla 2. Características de los miembros de la familia <i>Vibrionaceae</i>	10
Tabla 3. Resultados de los aislados bacterianos del tanque # 20 en base a los criterios de identificación bioquímica, antigénica y genética.....	42
Tabla 4. Resultados de los aislados bacterianos del tanque # 21 en base a los criterios de identificación bioquímica, antigénica y genética.....	47
Tabla 5. Resultados de los aislados bacterianos del tanque # 18 en base a los criterios de identificación bioquímica, antigénica y genética.....	52

INDICE DE ABREVIATURAS

Act.	Actividad
ADN	Acido desoxirribonucleico
Aerom.	<i>Aeromonas</i>
Alg.	Algas
Alim.	Alimento
AM	Agar Marino
AP-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena iniciada aleatoriamente
ARG	Arginina
B.L.	Bacterias luminosas
B.T.	Bacterias totales
Bac.	Bacilo
Bact.	Bacteria
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolylfosfato en dimethylformamida
BHI	Agar infusion cerebro-corazón
CAT.	Catalasa
CEL.	Celobiosa
Cit.	Citrato
Cod.	Código
Conv.	Convexa
D	Algunas especies son positivas, algunas negativas
E.	Eritromicina
Est. lrv.	Estadio larvario
E.D.T.A.	Etilén diamino tetra-acético
E22	Cepa patógena de <i>Vibrio harveyi</i>
F.	Furazolidona
GAL.	Galactosa

GLU.	Gluconato
GLUC.	Glucoronato
Hon.	Hongos
ILI	Cepa probiótica de <i>Vibrio alginolyticus</i>
IND.	Indol
L	Larvas
Lrv. Mrt.	Larva muerta
M	Mysis
med.	Mediana
ml	Mililitros
mM	Milimoles
MNS.	Manosa
MNT.	Manitol
Mot.	Motilidad
N	Nauplio
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NBT	Nitro blue tetrazolium
N.C.	No creció
Necr.	Necrosis
OF. F.	OF. Fermentativo
OF. O.	OF. Oxidativo
ORN	Ornitina
Osc.	Oscuro
OXI.	Oxidasa
PBS	Tampón fosfato salino sin Ca^{++} y Mg^{++}
PL	Post-larva
ppm	Partes por millón

Pseud.	<i>Pseudomonas</i>
RAPD	Patrones de polimorfismos aleatorios de ADN
Rec.	Recambio
Red.	Redonda
RPM	Revoluciones por minuto
SUC.	Sucrosa
S2	Cepa de <i>V. harveyi</i> con perfil RAPD de una sola banda
TAE	Tris Acido acético
Taq ADN polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i> Acido dexosirribonucleico
TCBS	Agar con Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sucrosa
TE	Tris EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar (Agar triptico de soya)
TSB	Tryptic Soy Broth (Caldo triptico de soya)
Tween 20	Polyxyethylene-sorbitan monolaurate
UFC	Unidades formadoras de colonias
V. aest.	<i>Vibrio aestuarinus</i>
V. alg.	<i>Vibrio alginolyticus</i>
V. ang.	<i>Vibrio anguillarum</i>
V. cam.	<i>Vibrio campbelli</i>
V. cho.	<i>Vibrio cholerae</i>
V. dam.	<i>Vibrio damsela</i>
V. fis.	<i>Vibrio fischeri</i>
V. flu.	<i>Vibrio fluvialis</i>
V. fur.	<i>Vibrio furnissii</i>
V. har.	<i>Vibrio harveyi</i>
V. log.	<i>Vibrio logei</i>
V. ner.	<i>Vibrio nereis</i>
V. par.	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

V.P.	Voges Proskauer
V. pel.	<i>Vibrio pelagius</i>
V. spl.	<i>Vibrio splendidus</i>
V. tub.	<i>Vibrio tubiashii</i>
V. vul.	<i>Vibrio vulnificus</i>
V.A.	Vibrios amarillos
V.L.	Vibrios luminosos
V.T.	Vibrios totales
V.V.	Vibrios verdes
Z	Zoea
μ l	Microlitros
μ m	Micras
% C	Porcentaje de concordancia de los criterios bioquímicos de los aislados bacterianos con los criterios de referencia de la bioquímica miniaturizada
% Mort.	Porcentaje de mortalidad
% spv.	Porcentaje de supervivencia
°C	Grados centígrados
**	Cepa de aislado bacteriano desconocido con perfil RAPD de dos bandas
0 % S.	Crecimiento al 0 % de salinidad
2C9	Anticuerpo monoclonal contra <i>Vibrio harveyi</i>
158	Cepa de <i>Vibrio alginolyticus</i>

RESUMEN

En la búsqueda de prevenir y controlar enfermedades bacterianas que afectan a los laboratorios de camarones pencidos, el presente estudio epidemiológico se ha realizado basado en la utilización de tres nuevas técnicas recientemente desarrolladas en el CENAIM.

Se colectaron 266 cepas bacterianas obtenidas de un laboratorio de producción ubicado en la zona de Ayangue (Provincia del Guayas). Los aislados bacterianos provenían de muestras de larvas y de agua de 3 tanques de cultivo, correspondientes a 2 periodos de cultivo consecutivos en los meses de mayo y junio de 1996. La caracterización bioquímica, antigénica y genética de cada cepa aislada fue realizada mediante un sistema miniaturizado de pruebas bioquímicas, un immuno-dot-blot con el anticuerpo monoclonal 2C9 específico de las cepas S₂ y E₂₂ de *Vibrio harveyi*, y con la técnica de AP-PCR utilizando un iniciador de 10 nucleótidos para determinar el perfil RAPD de cada bacteria, respectivamente.

Las bacterias caracterizadas bioquímicamente como *Vibrio tubiashii* y *Vibrio vulnificus*, fueron las cepas predominantes durante los muestreos. Algunas de las cepas caracterizadas genéticamente presentaron el perfil RAPD típico de la bacteria S₂ responsable del "Síndrome de bolitas". La mayor parte de estas bacterias con perfil RAPD típico de S₂, fueron caracterizadas bioquímicamente como *V. vulnificus*. El uso de antibióticos (eritromicina y furazolidona) a diferentes concentraciones cuando se presentaron problemas en los tanques de cultivo de larvas, modificó ocasionalmente la diversidad de la flora bacteriana y en particular redujo la población de la cepa bacteriana *V. vulnificus* con perfil típico S₂. Casi ninguna bacteria fue reconocida por el anticuerpo monoclonal 2C9.

Este trabajo muestra el carácter confiable de las tres técnicas para su aplicación al seguimiento bacteriológico en laboratorios de camarón, permitiendo obtener muchas

informaciones precisas sobre la dinámica de poblaciones bacterianas asociadas a las larvas o presentes en el agua.

INTRODUCCION

La creciente demanda en el Ecuador de post larvas del género *Penaeus* para cultivarlas en cautiverio y la escasez de las mismas en el medio natural, hizo imperiosa la necesidad de instalar laboratorios debidamente equipados para obtenerlas en medios controlados. Inicialmente, el cultivo solo era de la especie *P. vannamei*, pero actualmente también se cultiva el *P. stylirostris*.

Sin embargo, esta demanda de las post larvas de laboratorios está relacionada con la provisión y precio de las larvas marinas, decreciendo en los periodos de abundancia de éstas últimas, lo cual acontece especialmente durante los eventos de El Niño.

Además, los camaroneros prefieren generalmente adquirir las post larvas capturadas en el medio natural aduciendo que se desarrollan y sobreviven mejor a problemas de manejo (altas densidades) y de enfermedades (virus y bacterias).

Diferentes grupos de bacterias han sido implicadas como causantes de enfermedades y mortalidad en peneidos cultivados, especialmente en estadios larvales, post larvas y juveniles.

Las referencias epidemiológicas disponibles indican que especies de vibrios son los agentes bacterianos más importantes conocidos y también, son parte de la microflora normal de los peneidos. Algunos investigadores opinan que estos vibrios se convierten en patógenos oportunistas cuando las condiciones de cultivo favorecen su crecimiento. Tal es el caso de bacterias inocuas que pueden volverse dañinas cuando las condiciones del medio favorecen su propagación de forma excesiva.

En los laboratorios comerciales de camarón la identificación de los vibrios presentes en las larvas se la realiza por la simple observación de un color determinado de las colonias bacterianas en agar TCBS (debido a la utilización de la sucrosa); a las colonias verdes se las identifica como patógenas y a las amarillas, no patógenas. También se le da importancia a la presencia de luminiscencia en las bacterias para determinar su

patogenicidad. Sin embargo, características propias de las bacterias como el color, que está vinculado con la producción de ciertas enzimas metabólicas, o la luminiscencia involucrada con el gen que codifica para la producción de luciferasa, no tienen relación directa con la patogenicidad, que depende de diferentes factores genéticos como la presencia de genes que promuevan la producción de toxinas.

Para la caracterización y detección de bacterias patógenas y probióticas de interés en la acuicultura, se ha tomado como referencia a la bacteriología humana, las técnicas de identificación mediante criterios morfológicos, bioquímicos, genéticos y antigénicos, servirán para poder aplicar las medidas de control necesarias.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis es aplicar y evaluar las nuevas técnicas de identificación bioquímica, antigénica y genética de bacterias marinas asociadas al camarón, desarrolladas en el CENAIM, mediante un estudio epidemiológico en un laboratorio comercial de larvas de camarón, ubicado en la zona de Ayangue.

1. ANTECEDENTES

1.1. LARVICULTURA DEL CAMARON EN EL ECUADOR

El Ecuador se ha convertido en el primer país productor de camarón del hemisferio occidental (75% de la producción total), el quinto productor a nivel mundial y el segundo mayor productor mundial de camarón en cautiverio. La principal especie cultivada es el *Penaeus vannamei*, conocido como Camarón blanco del Pacífico. La tecnología de cultivo puede ser clasificada como semi-intensiva y semi-extensiva con un promedio anual cosechado de 2.250 libras por hectáreas de camarones enteros (Cámara Nacional de Acuicultura, 1995).

La industria ecuatoriana del camarón está orientada hacia la exportación, la cual representa el 35% de las ventas al exterior de productos primarios, siendo el segundo producto no petrolero que mayores ingresos genera al país superado sólo por el banano; en 1994 se exportaron 504 millones de dólares. Estados Unidos es el mercado más importante para las exportaciones ecuatorianas. El 65.4% de las ventas externas de camarón se dirigen a ese país, siendo Ecuador su segundo proveedor. Las exportaciones ecuatorianas a los países de la Unión Europea se han incrementado y la demanda del producto cobra mayor interés e importancia (Cámara Nacional de Acuicultura, 1995).

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

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

El año de 1984 fue decisivo para el crecimiento de los laboratorios. El fenómeno climático contrario de El Niño, llamado La Niña, sumado a la enorme competencia por

encontrar larvas para las camaroneras hizo pensar al sector en la necesidad de contar con instalaciones de producción de larvas (Barniol, 1995).



Como respuesta a esta necesidad el crecimiento de la infraestructura de producción de larvas se ha evidenciado en todo el país, en especial en la provincia del Guayas. Las últimas estadísticas disponibles (marzo 1995) reflejan la existencia de 205 laboratorios, de los cuales 117 se encuentran en Guayas, representando el 57% de la infraestructura total; sin embargo, su potencial de producción, dada la capacidad de siembra de algunos, podría superar esta participación (Acuacultura del Ecuador 1996).

Sin embargo, muchos de los laboratorios de larvas actualmente están en crisis debido, en parte, a la aparición de enfermedades, siendo las más importantes las causadas por virus y bacterias, y entre éstas últimas, las vibriosis parecen ser las principales responsables de altas mortalidades.

1.2. ENFERMEDADES BACTERIANAS ASOCIADAS A LA LARVICULTURA DEL CAMARON

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

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

Las especies bacterianas Gram negativas que causan septicemias o enfermedades del sistema digestivo en crustáceos marinos son predominantemente miembros de la familia Vibrionaceae, y principalmente del género *Vibrio* (Krantz and co-authors, 1969).

El *V. parahaemolyticus* es frecuentemente reportado como patógeno para ciertos crustáceos marinos (Krantz and co-authors, 1969). Otras bacterias Vibrionaceae oxidasa positiva, implicadas en enfermedades bacterianas del camarón son las *Aeromonas spp.* (Lightner and Lewis, 1975; Lightner, 1977) y *Photobacterium spp.* (Austin, 1995). Adicionalmente *Pseudomonas spp.* han sido encontradas como patógenos en ciertos camarones peneidos (Barkate, 1972; Lihgtner, 1983, 1985).

Entre las especies bacterianas pertenecientes al género *Vibrio spp.* implicadas como agentes causantes de infecciones y enfermedades en camarones peneidos, encontramos: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. splendidus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* (Lightner, 1993), *V. anguillarum* (Lewis, 1973; Lihgtner y Lewis, 1975; Rosemark y Fisher, 1988), *V. cholerae* (Guoxing, 1986). Tendencias recientes han mostrado la aparición de muchos otros vibrios incluyendo: *V. aestuarinus*, *V. pelagius*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. nereis*, *V. tubiashii* (Brian Austin, 1995), *V. logei*, *V. marinus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* (Lihgtner, 1995).

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

Epidemiológicamente, la vibriosis ocurre cuando el huésped marino es afectado y los mecanismos de defensa no están capacitados para prevenir la entrada de las bacterias ni para impedir la multiplicación bacteriana una vez que los organismos han invadido al hospedador.

Las infecciones bacterianas en camarones pueden tomar cuatro formas generales: erosiones de la cutícula, de la superficie del cuerpo, agallas y apéndices (necrosis bacterial y enfermedad del caparazón), lesiones localizadas dentro del cuerpo, septicemias generalizadas y evacuaciones significativas de heces (Lightner, 1985).

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

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

“Síndrome de bolitas”

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

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

No obstante, la constante presencia de niveles significativos de bacterias quitinofílicas en la cutícula de los apéndices bucales, esófago, estómago, hepatopáncreas e intestino, la eficacia aparente de ciertos antibióticos y la filtración del agua en el control de las mortalidades en las fases tempranas de la enfermedad hicieron pensar que la enfermedad era de etiología bacteriana (Bell T. A. and Lightner D., 1991).

Los primeros signos clínicos son anorexia y ausencia de alimento en el tracto intestinal. Al microscopio óptico se observa descamación de las células epiteliales del hepatopáncreas e intestino, que se observan individualizadas dentro de la luz intestinal, los túbulos hepatopancreáticos generalmente contienen grandes cantidades de células epiteliales desprendidas (Bell T. A. and Lightner D., 1991), dando el aspecto de bolitas, lo que dio el nombre a la enfermedad. Por último, los movimientos contráctiles del tubo digestivo cesan y la muerte llega rápidamente (Morales I., 1992). Con microscopía electrónica de transmisión se comprobó la ausencia de hongos, protozoos y agentes virales en el tracto digestivo, sin embargo, se encontraron grandes cantidades de bacterias (vibrios) cuando fueron teñidos frotis del intestino con naranja de acridina (Criado-Fornelio *et al.*, 1988).

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

Cuando macerados de larvas procedentes de tanques afectados eran cultivados en TCBS las colonias encontradas a las 24 horas eran concéntricas, verdes y de aproximadamente 5 mm de diámetro. Estas colonias fueron identificadas bioquímicamente como *V. harveyi*, por lo que se consideró que este vibrio era el agente causal del síndrome de bolitas. En muestras de cultivos sanos no se encuentra esta dominancia (Morales I., 1992).

1.3. CARACTERISTICAS DE LOS PRINCIPALES AGENTES BACTERIANOS QUE AFECTAN AL CAMARON

1.3.1. Familia *Pseudomonaceae*

Esta familia pertenece al grupo 4 (bacilos y cocos Gram negativos aeróbicos/microaerófilos) de la clasificación de bacterias según el manual de Bergey's (1994). Los miembros pertenecientes a esta familia son bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos, mótils por medio de flagelos polares, estrictamente aeróbicos, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en ambientes acuáticos (Frerichs N. and Millar S., 1993) (Tabla 1).

1.3.1.1. Descripción y propiedades metabólicas del género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, posee aproximadamente 27 especies reconocidas (Sanders J. and Fryer J., 1986).

Las especies de *Pseudomonas* son nutricionalmente no exigentes y pueden ser aisladas en medios generales, tales como BHI, TSA o NA, con temperaturas de incubación de 20 a 25°C. Una variedad de pigmentos pueden ser producidos, algunos con la presencia de fluorescencia, un pigmento soluble amarillo-verdoso es importante para la caracterización.

Los representantes del género *Pseudomonas spp.* son bacilos rectos o ligeramente curvos de aproximadamente 0.5-1.0 X 1.5-5.0 µm de tamaño. Gram negativos. Mótils por uno o varios flagelos polares sin envoltura. Quimioheterótrofos. Muchas especies acumulan poli-β-hidroxibutirato como reserva de carbón. Son estrictamente aeróbicos, dando una reacción oxidativa en la prueba O-F glucosa. La mayoría de las especies son oxidasa positiva, todas son catalasa positiva y producen arginina dihidrolasa. La mayoría no puede crecer en condiciones ácidas (pH 4.5) y no requieren factores orgánicos de crecimiento.

Tabla 1 Características de las familias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* y *Pseudomonaceae*.

Características	<i>Enterobacteria ceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Pseudomona ceae</i>
Diámetro celular, μm	0.3-1.5	0.3-1.3	0.5-1.0
Forma celular:			
Bacilos rectos	+	D	+
Curvos	-	D	+
Tinción de Gram	-	-	-
Acidez desde D-glucosa	+	+	D
Productos de fermentación del azúcar:			
Ethanol	-	-	
Acido láctico	-	-	
Acido acético	-	-	
Colonias violetas	-	-	-
Motilidad	D	+ ^e	D
Presencia de flagelos:			
Polar	-	+	+
Lateral	+ ^f	-	-
Ambos	-	D	
Oxidasa	-	D	D
Catalasa	+ ^e	D	D
Reducción de NO_3 a NO_2	+ ^e	+ ^e	
Producción de Indol	D	D	
Cepas que corroen al agar	-	-	
Requerimiento de Na para crecimiento	-	D	D
Requerimiento de nitrógeno orgánico	- ^e	- ^e	

+ = 90% o más de las especies son positivas

- = 90% o más de las especies son negativas

D = algunas especies son positivas, algunas negativas

e = Pueden darse pocas excepciones

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

1.3.2. Familia Vibrionaceae

Esta familia pertenece al grupo 5 (bacilos Gram negativos anaeróbicos facultativos) de la clasificación de bacterias según el manual de Bergey's (1994). Estas bacterias son bacilos rectos o curvos usualmente mótils por medio de un flagelo polar. Quimioorganotróficos, con ambos tipos de metabolismo respiratorio y fermentativo, posee tres géneros de interés: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Photobacterium*..(Tabla 2). La mayoría son microorganismos acuáticos ampliamente distribuidos en agua dulce y de mar. Juntas constituyen las más frecuentemente encontradas en camarones (Frerichs N. & Millar S., 1993).

Tabla 2. Características de los miembros de la familia *Vibrionaceae*

Características	<i>Vibrio</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Aeromonas</i>
Flagelo polar cubierto	+	-	-
Motilidad	+	+	(+) ^e
Acumulación de poly-β-hydroxybutyrato con la inhabilidad de utilizar β-hydroxybutyrato	-	+	
Requerimiento de Na para crecimiento	+	+	-
Lipasa	(+) ^b	D	(+)
Utilización de D-manitol	(+) ^c	-	(+)
Sensibilidad al compuesto vibriostático 0/129	+	+	-
Mol% G+C de ADN	38-51	40-44	57-63

+= todas las especies son positivas

(+)= muchas especies son positivas

-= todas las especies son negativas

D= algunas especies son positivas, algunas negativas

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

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

d= Hay ciertas excepciones

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

1.3.2.1. Descripción y propiedades metabólicas del género *Vibrio*

Son bacilos rectos o curvos, 0.5-0.8 μm de ancho y 1.4-2.6 μm de longitud. Gram negativos. Móviles por uno o más flagelos polares, los cuales están encerrados en una envoltura. No forman endosporas o microcistos. Anaeróbicos facultativos. Quimioorganotróficos, con ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo. No denitrifican o fijan nitrógeno molecular. Los iones de sodio estimulan el crecimiento de todas las especies y son necesarias para el crecimiento de la mayoría, la concentración mínima necesaria para un crecimiento óptimo va de 5 a 700 mM. Muchas especies de vibrios toleran condiciones moderadamente alcalinas, creciendo a pH de 9.

La mayoría de las especies crecen bien en medios que contengan agua de mar. D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con producción de ácido, pero no de gas. Oxidasa positiva. Reducen nitratos. Se las encuentran en ambientes acuáticos con amplios rangos de salinidades, sobre las superficies y en los contenidos intestinales de los animales marinos, algunas especies también pueden crecer en agua dulce. Muchas especies son patógenas para vertebrados e invertebrados marinos.

Gran parte de las especies de vibrios no requieren factores de crecimiento orgánicos. Algunas cepas, sin embargo, pueden desarrollar requerimientos de aminoácidos, particularmente después de almacenamientos prolongados y subcultivos (Lee *et al.*, 1978).

Los vibrios crecen en una variedad de medios. La mayoría de las especies forman colonias convexas, lisas, blancas-cremosas con bordes enteros, algunas variantes en la morfología de las colonias puede darse en determinadas especies, particularmente después de repetidos cultivos y almacenamientos en medios más complejos. La temperatura óptima de crecimiento varía considerablemente, todas crecen a 20°C y la mayoría a 30°C.

Thiosulfate-citrate-bile salt-sucrosa agar (TCBS) (Kobayashi *et al.*, 1963), que originalmente fue formulado para el aislamiento del *V. parahaemolyticus*, es el agar selectivo apropiado para el aislamiento de vibrios.

Muchas cepas de vibrios marinos son capaces de esparcirse en medios sólidos. Esto parece estar asociado con la formación de células largas con muchos flagelos laterales y cuando es afectada por ciertos parámetros químicos y físicos, incluyendo concentración del agar, complejidad del medio y temperatura (Baumann and Baumann, 1977) Bergey's p-520.

V. fischeri y *V. logei* producen un pigmento amarillo-naranja asociado a la célula, el cual es evidente después de 3-4 días de incubación en medio sólido complejo (Bang et al., 1978a). Algunas cepas de *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fischeri* y *V. logei* son capaces de emitir luz de color azul-verdoso. La reacción que lleva a la emisión de luz, catalizada por la enzima luciferasa, ha demostrado ser similar a la de todos los procariotas.

1.3.2.2. Descripción y propiedades metabólicas del género *Aeromonas*

Son bacilos rectos con extremos redondeados acercándose a una forma esférica, 0.3-1.0 µm de diámetro y 1.0-3.5 µm en longitud. Aparecen solas, en pares o cadenas cortas. Gram negativos. Usualmente móviles por un flagelo polar simple. Anaeróbicas facultativas. Quimioorganotróficas, con ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo. Oxidasa y catalasa positivo. Usualmente son arginina dihidrolasa positiva y ornitina decarboxilasa negativo. Reducen nitratos. Pueden crecer en agua dulce.

Las especies de *Aeromonas* pueden ser aisladas en NA o en TSA, el crecimiento de esta bacteria es usualmente inhibida en agar TCBS. Cepas de *A. salmonicida* (no móvil) pueden ser aisladas en TSA, produciendo colonias pequeñas y con pigmentación café. La temperatura óptima de crecimiento es de 22 a 28°C.

1.3.2.3. Descripción y propiedades metabólicas del género *Photobacterium*

Son bacilos rectos y delgados, 0.8-1.3 µm de diámetro y 1.8-2.4 µm de longitud. Gram negativos. Móviles por 1-3 flagelos sin envoltura, algunas son no móviles. No forman endosporas o microcistos. Anaeróbicas facultativas. Quimioorganotróficas, poseen

ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo. No denitrifican. No fijan nitrógeno molecular; iones de sodio son requeridos para su crecimiento (160-280 mM es la concentración óptima).

La mayoría de las cepas crecen en medios minerales que contengan agua de mar, D-glucosa y NH_4Cl . En adición a la D-glucosa, todas utilizan D-manosa y glicerol.

La reacción de oxidasa es variable. La mayoría de las cepas son lisina decarboxilasa y arginina dihidrolasa positivo. Ornitina decarboxilasa negativo. Acumulan poli- β -hidroxibutirato bajo ciertas condiciones de cultivo.

Las colonias son características, siendo convexas, lisas, con bordes enteros y coloración blanca cuando crecen en medios complejos o minerales, como agar marino. El color de las colonias es de alguna forma más blanco que otras muchas bacterias marinas Gram negativas, probablemente debido al relativo bajo contenido de citocromos. La temperatura óptima de crecimiento parece ser 18-25°C.

Cepas de las especies *P. phosphoreum* y *P. leiognathi* son capaces de emitir luz de color azul-verdoso, una propiedad no encontrada en cepas de *P. angustum*.. Cepas de *P. phosphoreum* y *P. leiognathi* están ampliamente distribuídas en ambientes marinos y han sido aisladas de agua de mar, de la cutícula y contenidos intestinales de animales marinos. No hay información disponible de la distribución de *P. angustum*.. Todas las cepas de esta especie han sido aisladas del océano abierto en el Archipiélago de Hawai.

1.4. TECNICAS EMPLEADAS EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES BACTERIANAS

1.4.1. Bacteriología clásica

La metodología utilizada en microbiología para aislar microorganismos está basada en el uso de medios selectivos o enriquecidos, los cuales satisfacen las demandas fisiológicas mas o menos específicas de un grupo de microorganismos considerados. Entre los medios utilizados están:

TCBS, (Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar). Que es un medio selectivo para vibrios.

TSA, (Tryptic Soy Agar). Es un medio general que permite el crecimiento de distintas especies bacterianas y es recomendado para el aislamiento y purificación de bacterias antes de realizar pruebas de identificación bioquímica.

Agar Marino. Es un medio específico para bacterias marinas, en el cual pueden crecer distintas especies.

El aislamiento de una colonia bacteriana correspondiente a un sólo tipo de bacteria presente en una muestra se la realiza tomando una pequeña cantidad de la colonia deseada con la punta de un asa de platino y sembrándola en una caja Petri que contenga medio sólido. El rayado se efectúa en forma de estrías y por agotamiento (Fig 1), de tal manera que se puedan obtener colonias aisladas. Las placas inoculadas son incubadas a 28°C por 24 horas.

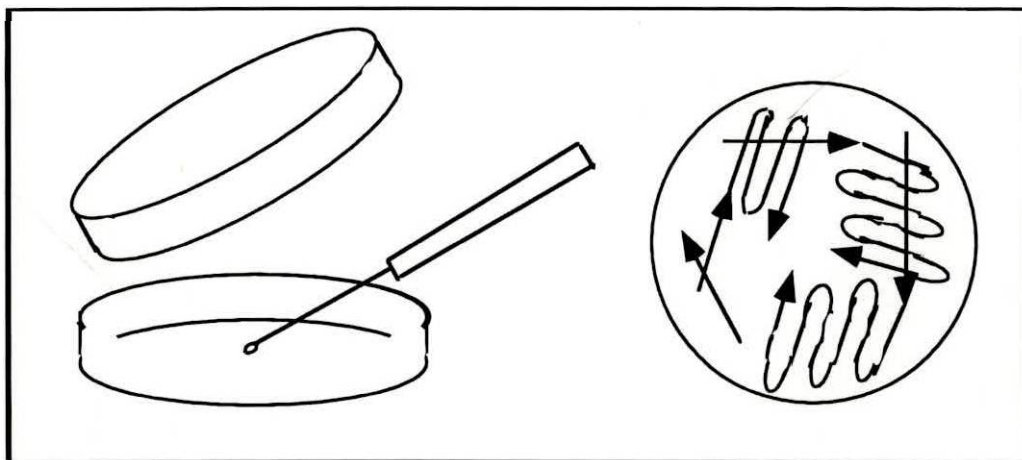


Figura 1.- Técnica de aislamiento por estrías. Se puede observar una caja petri con agar, sembrada en estrías con una asa de inoculación.

1.4.2. Técnicas de asepsia

Se ha podido comprobar que el éxito en la operación de una nueva "corrida de larvicultura" entre otras cosas es el adecuado proceso de limpieza y desinfección del sistema, tanques y pisos.

El cloro debido a su costo, eficacia y confiabilidad es ampliamente usado en los laboratorios comerciales de larvas de camarón y su poder desinfectante depende del tiempo de contacto, la temperatura y el pH (Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón. Mayo 1990).

El uso de lámparas ultravioletas y/o de ozonificadores es necesario instalarlas una vez realizada la filtración física del agua, considerando el caudal a utilizarse y diseñar así el equipo adecuado, con el objeto de reducir elementos o microorganismos patógenos en el sistema (Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón. Mayo 1990).

El carbón activado también es recomendable para la eliminación de material orgánico.

1.4.3. Utilización de antibióticos

Muchos antibióticos son utilizados comunmente en la rutina de los laboratorios de larvas como medida preventiva en el control de enfermedades bacterianas. Esta medida puede crear problemas de aparición de resistencias bacterianas a dichos antibióticos, lo que dificultaría el tratamiento, particularmente cuando se trata de bacterias patógenas. El uso de bacterias probióticas puede constituir una alternativa a la utilización de antibióticos, aunque en algunas situaciones de enfermedad los probióticos pueden no ser suficientes.

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

El estudio microbiológico a través de los antibiogramas y controles mínimos inhibitorios son los que determinarían el tipo y dosis de antibiótico a usarse (Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón, Mayo 1990).

1.5. NUEVAS TECNICAS DE IDENTIFICACION BACTERIANA

1.5.1. Técnicas de identificación bioquímica

La identificación bacteriana es un proceso por el cual los microorganismos de una colonia aislada son caracterizados a fin de tener suficiente información para compararla con aquella utilizada en la descripción de referencia de una especie o una cepa.

El primer paso para identificar a nivel específico una bacteria es obtener cultivos puros, seguido por una serie de pruebas para determinar características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

Los criterios bioquímicos a pesar de ser una técnica de identificación ampliamente utilizada, es un método muy costoso en tiempo y en reactivos; sin embargo, la miniaturización de tales pruebas constituye una herramienta valiosa ya que permite identificar bioquímicamente de forma fácil, rápida y barata un mayor número de muestras, en un menor tiempo que el método clásico.

Un total de 21 pruebas entre morfológicas y bioquímicas, fueron seleccionadas por ser necesarias y suficientes para poder identificar y diferenciar las bacterias aisladas.

Estas pruebas son: Forma celular, motilidad, tinción de Gram, oxidasa, catalasa, crecimiento 0% NaCl, OF (oxidativo y fermentativo), producción de indol, Voges-Proskauer, citrato de Simmons, ornitina decarboxilasa, arginina dihidrolasa, L-arabinosa, celobiosa, D-manosa, D-manitol, sucrosa, D-glucuronato, D-gluconato, D- galactosa (Solís A. 1996. Datos no publicados).

Las pruebas de forma celular, motilidad, tinción de Gram, oxidasa y catalasa son importantes para la identificación a nivel de los géneros seleccionados, pero no para la

diferenciación de las bacterias escogidas, ya que todas ellas poseen las mismas características (Solís A. 1996. Datos no publicados).

Para lograrlo se utilizan microplacas de titulación, de esta forma al trabajar con volúmenes pequeños, podremos ahorrar hasta 50 veces la cantidad de medios y reactivos empleados en el método clásico.

1.5.2. Técnicas inmunológicas

Se basan en la utilización de anticuerpos policlonales o monoclonales que identifican y reaccionan en forma específica con un epítipo del antígeno contra el que fueron elaborados, formándose un complejo antígeno-anticuerpo.

El Dot-blot es una de estas técnicas que se utiliza para la detección específica de bacterias previamente aisladas. Consiste en disolver una colonia bacteriana en un tampón líquido y luego colocar la suspensión bacteriana en una membrana de nitrocelulosa, siendo esta membrana la fase sólida donde se fija el antígeno.

La membrana es luego incubada con una solución de una proteína como la caseína o albúmina para bloquear cualquier sitio libre sobre la nitrocelulosa en el cual se adhieran proteínas e impedir reacciones inespecíficas que podrían dar resultados falso-positivos. De esta forma toda respuesta se deberá a la reacción antígeno-anticuerpo.

A continuación, se la incuba con el anticuerpo que puede estar previamente marcado con una enzima (método directo); en el caso que este anticuerpo no esté marcado, es necesaria la incubación con un segundo anticuerpo marcado con una enzima, el cual va a reconocer las regiones constantes del primer anticuerpo y por lo tanto va a reaccionar con él (método indirecto).

Finalmente la presencia de la enzima es revelada mediante el desarrollo de una coloración al incubar la membrana con un sustrato.

Este método es fácilmente aplicable al campo práctico ya que es un método sensible, específico y rápido (nos permite obtener resultados 4-5 horas después que se coloca la suspensión bacteriana sobre la membrana y la visualización directa sin necesidad de equipo especial para la toma de los resultados) (Donoso E. 1995. Datos no publicados).

1.5.3. Técnicas de biología molecular (AP PCR)

Una de las técnicas más importantes empleada para determinar variabilidad genética es: La Reacción en Cadena de la Polimerasa mediante el uso de Primers Aleatorios (AP PCR), cuyo producto es conocido como Random Amplified Polymorphisms DNA (RAPD) o Patrones de polimorfismos aleatorios de ADN, los cuales son interpretados por comparaciones entre diferentes perfiles de productos amplificados obtenidos a partir de diferentes individuos.

La AP PCR es una técnica relativamente nueva (Williams et al., 1990), basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que involucra el uso de iniciadores (*primers*) arbitrarios de 10 nucleótidos que amplifican (copian) segmentos aleatorios del genoma (García et al., 1994). Esta técnica sirve para determinar marcadores moleculares genéticos.

A su vez, la PCR es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en Biología Molecular y fue inventada por Kary Mullis en 1985. Es un método *in vitro* que permite la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN y consta de una serie de ciclos que involucran: la desnaturalización de la molécula de ADN utilizada como patrón convirtiéndola en dos cadenas separadas, la hibridación o unión de cada *primer* a la cadena respectiva y la síntesis de nuevas cadenas a partir de los *primers* por acción de una enzima termoestable (Taq ADN polimerasa). Como resultado se produce la acumulación exponencial de un fragmento específico, limitado lateralmente por la ubicación de cada *primer* al hibridarse con su correspondiente cadena. Debido a que el producto sintetizado del primer ciclo puede servir como patrón en el siguiente, el número de copias del ADN

estudiado se duplica en cada ciclo. Así, 20 ciclos de PCR producen una amplificación de un millón de veces, aproximadamente (Erich, 1989).

El método de AP PCR es una modificación de la PCR ya que utiliza generalmente un solo *primer* de secuencia aleatoria para generar los fragmentos polimórficos de ADN. En algunos casos pueden utilizarse 2 *primers* (Micheli et al., 1993). Los fragmentos de ADN son visualizados como bandas en un gel de agarosa y aquellos que son polimórficos se emplean como marcadores moleculares específicos de poblaciones o especies (Hadrys et al., 1992; Williams et al., 1990, 1993).

Por tanto, en el presente trabajo, para realizar la identificación de bacterias provenientes de aislamientos desconocidos a partir de muestras tomadas en un laboratorio comercial, se utilizará AP PCR tratando de determinar marcadores moleculares a partir de fragmentos polimórficos.

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLOGICO

2.1.1. Animales

Los animales utilizados para realizar los macerados correspondían a todos los estadios de: nauplio, zoea, mysis y post-larvas; de las especies *P.vannamei* y *P. stylirostris*.

2.1.2. Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal utilizado fue.

2C9 (líquido ascítico). Que reconoce una cepa patógena de *V. harveyi* (E22).

2.1.3. Aislados bacterianos

Cepa bacteriana (E22). Aislada de una muestra de larvas de camarón infectadas con bolitas, en un laboratorio de la península de Santa Elena e identificada bioquímicamente como *V. harveyi* en 1994 por Jenny Aráuz (tesis de grado).

Cepa bacteriana de *V. alginolyticus* (ILI). Aislada por Ileana Morales en 1994 en el laboratorio de larvas de camarón EBISA de una muestra de agua de mar.

Cepa bacteriana codificada como 158. Aislada de tanques de producción de larvas del laboratorio EBISA en 1995 e identificada bioquímicamente como *V. alginolyticus*.

Cepa bacteriana S₂. Aislada por Ileana Morales en 1992 del laboratorio de larvas de camarón EBISA, de una muestra de larvas infectadas con bolitas e identificada bioquímicamente como *V. harveyi*.

Aislados bacterianos. Todos los aislados bacterianos obtenidos de agua de tanque de cultivo y de macerado de larvas para realizar este estudio epidemiológico correspondían a organismos desconocidos.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Descripción del sistema de cultivo

Las muestras (aislados bacterianos), fueron obtenidas de un laboratorio comercial de larvas de camarón. Para lo cual se muestrearon tres tanques de cultivo, correspondientes a dos corridas consecutivas.

Para hacer el primer muestreo se tomaron dos tanques (20 y 21) de 14 Tn. cada uno, sembrados con nauplios salvajes de *P. stylirostris*, provenientes de Esmeraldas y para el segundo muestreo se tomó un tanque (18) de 14 Tn. sembrado con nauplios salvajes de *P. vannamei*, provenientes de Esmeraldas.

2.2.2. Muestreos diarios

Los muestreos eran a diario, para lo cual se tomaban muestras de larvas y de agua de dichos tanques de cultivo. El número de larvas que se cogía de los tanques para hacer los macerados era variable, dependiendo del estadio larval en el cual se encontraba el animal, siendo éstos los siguientes:

ESTADIO	# DE ANIMALES
Nauplios	100
Zoeas 1-3	50
Mysis 1-3	20
Post larvas 1-n	10

2.2.3. Técnicas de bacteriología

La bacteriología empleada en el laboratorio consistía en macerar las muestras de las larvas, hacer las diluciones necesarias, sembrarlas en agar TCBS y en agar marino.

Para realizar la siembra del agua de tanque de cultivo y el macerado de larvas se vertía 100 µl de éstas al medio sólido y con una varilla de vidrio estéril se la esparcía por sobre todo el medio. Luego estas cajas eran puestas en la incubadora a 28°C y después de 24

horas de incubación se hacían los conteos de las colonias, siendo éstas verdes, amarillas y luminosas cuando crecían en agar TCBS. Para las cajas con agar marino el conteo solo era de bacterias totales y luminosas.

Los procedimientos de aislamiento consistían en obtener una colonia pura proveniente de un solo microorganismo. El aislamiento de las bacterias se realizaba tomando una pequeña cantidad de la colonia deseada con la punta de un asa de platino estéril y sembrándola en una caja Petri que contenía medio sólido, rayándola en forma de estrías. Estas cajas eran incubadas a 28°C por 24 horas. La siembra en estrías se la realizaba por agotamiento, de tal manera que se podían obtener colonias aisladas.

Una vez obtenidos los aislados bacterianos, éstos eran pasados a TSA (medio recomendado para realizar pruebas bioquímicas), la siembra en este medio se la hacía de igual manera que en los aislados bacterianos.

Debido a que todos los días se obtenían aislados bacterianos, éstos eran congelados a -80°C en tubos eppendorf de 1,5 ml que contenían una solución al 15% de glicerol más TSB.

Una vez obtenidos todos los aislados bacterianos correspondientes a los estadios de cultivo de la larva, éstos eran sembrados directamente en TSA y las placas incubadas a 28°C por 24 horas, para su posterior análisis bioquímico y antigénico.

Siempre hay que tener presente que es indispensable el mantenimiento de condiciones asépticas durante todos los pasos de esta operación, para lo cual es necesario trabajar en una cámara de flujo laminar (Air Tech Japan,Ltd. Mod. BCM-1002W).

2.2.4. Técnicas de pruebas bioquímicas

La determinación de la forma celular, motilidad, oxidasa y catalasa se las realizó de la siguiente manera:

Motilidad y forma.

El movimiento característico de una bacteria se debe a la presencia o ausencia de flagelos y se puede observar usando una lámina excavada de Koch mediante la técnica de la gota pendiente, para lo cual se coloca una gota pequeña de la suspensión bacteriana en el centro de una lámina cubre-objeto con un asa de platino estéril en punta. En las esquinas de la laminilla se debe colocar pequeños puntos de vaselina con el fin de que la suspensión bacteriana cuelgue libremente del cubre-objeto sin tocar los lados ni el fondo de la lámina de Koch, cuando se presiona suavemente el cubre-objeto sobre la lámina.

Luego se coloca una gota de aceite inmersión directamente sobre la superficie del cubre-objeto para examinar el cultivo al microscopio (100X). Observándose la motilidad, forma y arreglo celular. Para realizar esta prueba es recomendable que el aislado bacteriano tenga un periodo de incubación de 12 horas, ésto es para detectar fácilmente la motilidad de las bacterias.

Tinción de Gram.

Para determinar si una bacteria es Gram negativa o positiva se utilizó el *Método de Ryus* que consiste en tomar un inóculo de bacteria con un asa de platino en punta y ponerlo en contacto con hidróxido de sodio (NaOH) al 3%. Si se forma un hilo al levantar el asa, la bacteria es Gram negativa, caso contrario es Gram positiva.

Catalasa.

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

Oxidasa.

Con esta prueba se detecta la presencia de la enzima citocromo-oxidasa, que es capaz de reducir el oxígeno, esta prueba se la realizó de la siguiente manera:

Con un asa de platino se tomó un inóculo bacteriano y frotó en el papel impregnado con el reactivo (cytochrome-oxidase reagent "Nissui", Yaku Code 05180), previamente humedecido con agua destilada. El desarrollo de un color violeta al instante o dentro de un minuto significa un resultado positivo.

El resto de las pruebas seleccionadas (16) se las hizo en microplacas de titulación de 96 pozos, incubadas a 28°C, haciendo las lecturas a las 24, 48 y 72 horas de cultivo.

Las suspensiones bacterianas fueron preparadas en tubos de ensayo, colocando una asada de la colonia bacteriana en agua destilada estéril para la prueba de crecimiento al 0% de NaCl y en solución salina al 0.85% de NaCl para el resto de las pruebas.

Los medios fueron colocados en la microplaca de tal forma que son utilizadas dos columnas de esta para identificar a una cepa, por lo tanto se pueden analizar hasta seis cepas por cada microplaca.

Crecimiento, 0% NaCl.

A 200 µl del medio NB, se inocularon 20 µl de la suspensión bacteriana en agua destilada. La formación de turbidez en el medio indica un resultado positivo, mientras que si permanece igual sería negativo.

Tipo de metabolismo.

Se utilizaron dos pozos, en uno se determinó el metabolismo oxidativo, usando 200 µl de medio y en el otro se determinó el metabolismo fermentativo, usando 150 µl. Se inocularon 20 µl de suspensión bacteriana a ambos pozos y al segundo se le añadió 100 µl de aceite mineral estéril, para garantizar una condición anaerobia.

La acidificación del medio con un cambio del indicador de pH a amarillo solo en el pozo abierto indica un resultado positivo para la utilización oxidativa de la glucosa, mientras que la acidificación del medio en el pozo cubierto indica un resultado positivo para la utilización fermentativa de la glucosa, si el medio permanece igual sería negativo para ambos casos. Si no se produce acidificación en ninguno de los pozos significa que la bacteria no utiliza la glucosa de ninguna forma.

Producción de indol.

A 200 µl de triptona al 1% se inocularon 20 µl de la suspensión bacteriana, después de 1-3 días de incubación (cuando se note crecimiento) se adicionaron 20 µl del reactivo de Kovac mezclándolo directamente con la micropipeta. La aparición de un halo de color rosado o rojo en la superficie indica una respuesta positiva.

Voges Proskauer.

A 100 µl del medio MR-VP se adicionaron 20 µl de la suspensión bacteriana, después de 1-3 días de incubación (cuando se note crecimiento) se adicionaron 60 µl de la solución 1 (Alfa naptol al 5% de etanol absoluto) y 20 µl de la solución 2 (Hidróxido de potasio al 40%), mezclando después de añadir cada solución.

La aparición de un color rojo indica que la prueba es positiva, esto ocurre inmediatamente o después de 5 minutos de haber añadido el segundo reactivo. Sin embargo, es preferible leer los resultados después de 4 horas a fin de garantizar la veracidad de la reacción.

Citrato de Simmons.

A 200 µl del medio citrato de Simmons se añadieron 20 µl de la suspensión bacteriana. Una reacción positiva debe ser indicada por el cambio de color del medio de verde a azul, mientras que el resultado es negativo si no hay cambio de color.

Ornitina decarboxilasa.

A 150 µl del medio bacto decarboxylase base Moeller con el aminoácido ornitina, se adicionaron 20 µl de suspensión bacteriana y 100 µl de aceite mineral estéril. El desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil indica un resultado positivo, una coloración amarilla negativo.

Arginina dihidrolasa.

A 150 µl del medio bacto decarboxylase base Moeller con el aminoácido arginina, se adicionaron 20 µl de la suspensión bacteriana y 100 µl de aceite mineral estéril. El desarrollo de una coloración violeta fuerte o débil indica un resultado positivo, una coloración amarilla negativo.

Asimilación de carbohidratos.

A 200 µl del medio OF con el carbohidrato apropiado, se añadieron 20 µl de la suspensión bacteriana. Si el medio se torna amarillo la prueba es positiva, y negativa si permanece verde o se vuelve azul.

Los medios con carbohidratos, al principio fueron preparados por separado, obteniéndose ligeras diferencias en los tonos de las coloraciones debido al efecto de errores en el pesaje del medio OF, debido a ésto se preparó un stock del medio OF para luego repartirlos en tubos y añadirles el carbohidrato correspondiente quedando todas del mismo color verde.

Es importante recalcar que ciertos carbohidratos no pueden ser esterilizados en el autoclave (se desdoblan a esas temperaturas), sino por filtración entre ellos arabinosa y sucrosa, además se recomienda esterilizar el resto de los carbohidratos utilizados a 110°C por 10 minutos.

Los carbohidratos que se utilizaron para la realización de la bioquímica miniaturizada fueron:

L-Arabinosa.

Celobiosa.

D-Manosa.

D-Manitol.

Sucrosa.

D-Glucuronato.

D-Gluconato.

Galactosa.

Nota: A todos los medios se les debe ajustar la concentración de NaCl a un 2%, excepto al medio NB que sirve para determinar si los aislados bacterianos crecen al 0% de NaCl.

La interpretación de los resultados se la expresa con un porcentaje de concordancia con el total de las pruebas realizadas.

La lectura de los resultados es posible hacerla usando tablas de diagnóstico en conjunto con computadoras. Por ejemplo, las tablas son incorporadas a la memoria del computador y los resultados de aislados desconocidos son comparados con cada una de las posibilidades, la correlación más alta es tomada para inferir una identificación. (Austin, B., 1988). El programa de STATISTICA para análisis cluster es usado para este propósito. (Austin, B., comunicación personal).

En el análisis cluster se calculan los índices de similitudes entre la información de referencia y el aislado desconocido. Dentro de este análisis se utiliza el joining (tree clustering), el cual une objetos en grandes racimos, usando alguna medida de similitud o distancia.

2.2.5. Técnicas de pruebas antigénicas

2.2.5.1. Técnica de Dot blot

Protocolo básico (Protocolo según Evelyne Bachere, 1992)

1.- Depositar 1 ó 2 microlitros de la suspensión de bacterias (por ej: 1 colonia de bacteria dentro de 200-500 μ l de PBS-M) en una membrana de nitrocelulosa. Se puede también usar un aparato de microfiltración (Dot blot apparatus) para filtrar 500 μ l de suspensión bacteriana.

2.- Dejar secar la membrana a la temperatura ambiente por 30 min.

3.- Saturar la membrana mediante incubación con PBS-leche descremada 5% (peso/volumen) en una caja Petri agitando suavemente por 60 min a temperatura ambiente.

4.- Realizar 3 lavados de 3 min c/u con PBS-Tween 20 (0.1%).

5.- Depositar el anticuerpo (fluido ascítico a la dilución adecuada en PBS-Tween 0.1%-leche 0.5% ó sobrenadante de cultivo sin diluir) e incubar por 60 min a temperatura ambiente.

6.- Realizar 3 lavados de 3 min c/u con PBS-Tween 20 (0.1%).

7.- Depositar el anticuerpo conjugado (a la fosfatasa alcalina) e incubar por 45 min.; dilución empleada del anticuerpo 1/10000 en PBS-Tween 0.1%-Leche 0.5 %.

8.- Realizar 3 lavados de 3 min c/u con PBS-Tween 20 (0.1%).

9.- Incubar con la solución sustrato recientemente preparada:

BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl fosfato en 0.5 ml de dimethyl-formamida)
= 33 μ l.

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

Tampón Fosfatasa Alcalina (NaCl 5.84g/l, MgCl₂ 0.5 g/l, Tris base 12.11 g/l, pH 9.5)
= 10 ml.

Nota: Cuando las manchas alcanzan la intensidad deseada, la reacción enzimática es detenida lavando la membrana con EDTA 2 mM (100 µl. de EDTA 0.5 M diluído en 25 ml. de PBS).

2.2.6. Técnicas de biología molecular (AP PCR)

2.2.6.1. Técnica para la extracción de ADN de bacterias

- 1.- Centrifugar los tubos que contienen las bacterias (TSB+glicerol) a 13000 RPM durante 15 minutos.
- 2.- Eliminar el sobrenadante.
- 3.- Agregar 300 µl. de TE a los tubos.
- 4.- Calentar por 10 min. a 100°C para romper la pared celular de las bacterias.
- 5.- Dejar enfriar los tubos en hielo.
- 6.- Centrifugar por 10 min. a 13000 RPM.
- 7.- Extracción final del sobrenadante (ADN).

2.2.6.2. Protocolo para la amplificación de ADN por medio de una AP PCR

- 1.- Coger 5 µl. de ADN y ponerlo en un tubo eppendorf pequeño (0.5 ml.).
- 2.- Agregar 5 µl. de agua destilada estéril.
- 3.- Agregar 40 µl. de mezcla.

La mezcla se compone de: H₂O.....25.8 µl.

Buffer 10X.....5.0 µl.

dNTPs.....4.0 µl.

Cl₂Mg.....4.0 µl.

Primer 1.....1.0 µl.

Taq.....0.2 µl.

4.- Agregar 50 µl. de aceite mineral estéril para evitar que la muestra se evapore al ponerla en el termociclador (Gene-Tech, Apparatus SPCR-1) para obtener la amplificación del ADN.

2.2.6.3. Elaboración de un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa

- 1.- Coger una probeta y poner 1960 ml. de agua destilada.
- 2.- Agregar 40 ml. de solución TAE 50X y homogenizar.
- 3.- Tomar en una fiola 350 ml. de la solución tampón 1X.
- 4.- Pesar 5.25 g. de agarosa y agregársela a la fiola.
- 5.- Calentar en baño maría por espacio de 1 hora la fiola que contiene el tampón 1X con la agarosa para lograr que ésta se disuelva por completo.
- 6.- Cuando dicha solución esté algo fría agregar 17.5 µl. de Bromuro de Etidio (1 µl. de bromuro por cada 20 ml de solución) y depositar en el molde.
- 7.- Verter el volumen restante de la solución TAE 1X en la cubeta de electroforesis (Macicell. Mod. EC 360 M).
- 8.- Sumergir el gel en la cubeta que contiene la solución TAE 1X.

2.2.6.4. Depósito de la muestra en el gel

- 1.- Coger 20 µl. de ADN amplificado y colocarlo en un tubo eppendorf pequeño (0.5 ml).

RESULTADOS Y DISCUSION

La elaboración reciente de 3 tipos nuevos de herramientas para la caracterización, identificación y diagnóstico de bacterias asociadas a los camarones necesitó emprender su evaluación en situaciones reales de utilización, comparativamente al control bacteriológico como es practicado actualmente en algunos laboratorios de producción. La proximidad al CENAIM fue tomada en cuenta en la selección de laboratorios. El espíritu de cooperación de los biólogos fue el factor determinante para la elección final del laboratorio Macrobio (Ayangue).

El trabajo fue concebido a medio tiempo (mañana) en el laboratorio Macrobio, en estrecha colaboración con los responsables de la larvicultura y bacteriología. La otra mitad del tiempo (tarde) con el equipo de epidemiología del CENAIM.

Así, las muestras preparadas en la mañana fueron transportadas diariamente al CENAIM para operaciones inmediatas de aislamiento de colonias o para análisis diferidos después de haber congelado las cepas aisladas. Esta operación de congelación tenía por objeto crear un banco de bacterias de referencia, que permita repetir o profundizar los análisis bacterianos y eventualmente emprender los estudios *in vivo* e *in vitro* a fin de establecer la naturaleza de la asociación de una determinada bacteria con el camarón y con otras bacterias.

El plan de trabajo está esquematizado en la figura 5. Este estudio epidemiológico fue realizado en los meses de Mayo y Junio de 1996, con nauplios salvajes provenientes de la provincia de Esmeraldas.

Durante la primera corrida 2 tanques de cultivo de *P. stylirostris* (20 y 21) fueron analizados y en la corrida siguiente un tanque de *P. vannamei* (18).

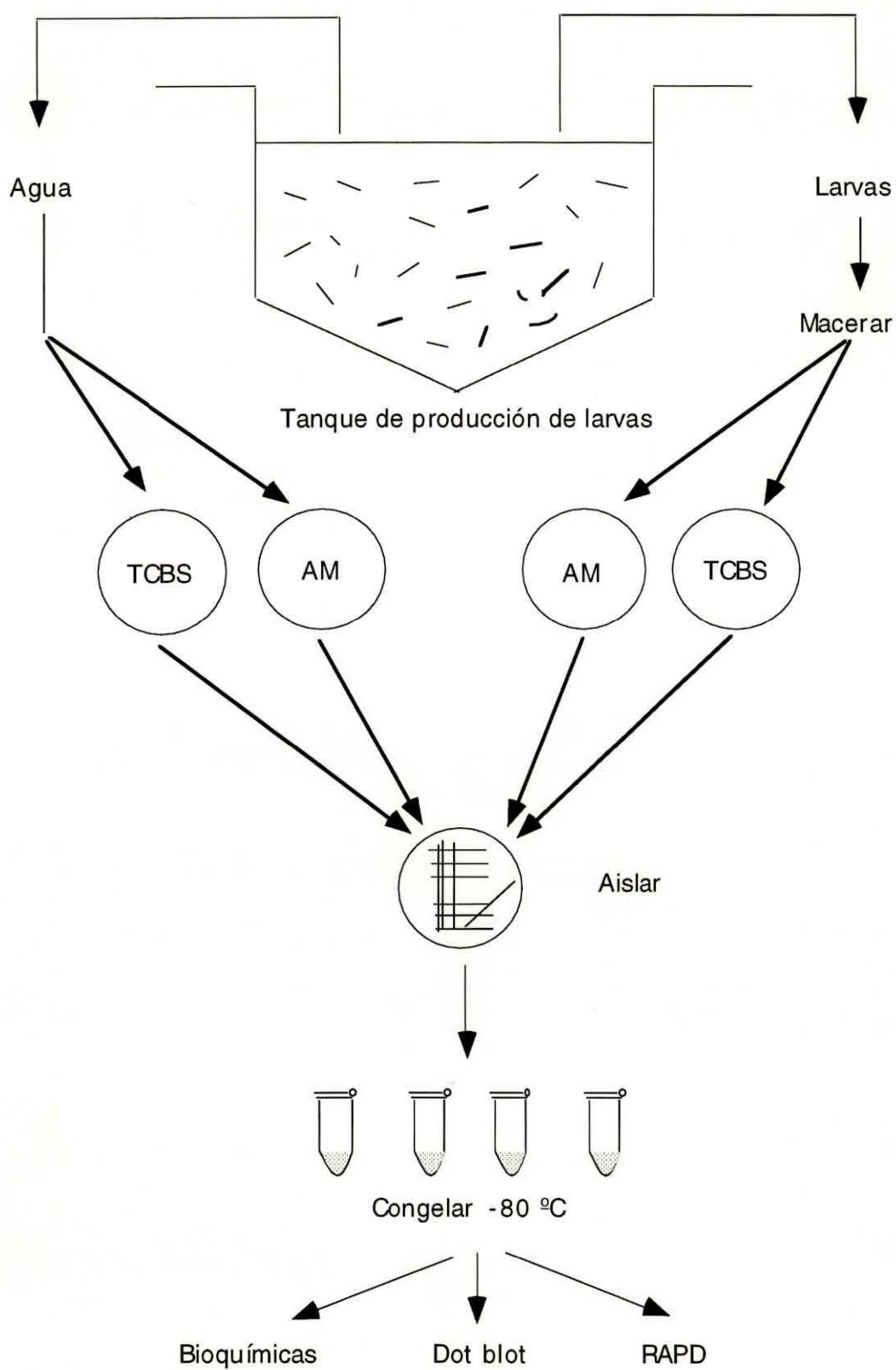


Figura 5. Plan de trabajo para el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias

Durante la segunda corrida apareció en el laboratorio un problema de mortalidad asociado a los síntomas del "Síndrome de Zoea" lo que condujo a análisis suplementarios que fueron tomados en cuenta en los comentarios y en la presentación de resultados.

Estos resultados son presentados tanque por tanque, siendo el análisis realizado en forma individual y sintética.

ESTUDIO # 1

Seguimiento bacteriológico del tanque # 20

Esta operación fue iniciada al séptimo día de cultivo cuando las larvas de *P. stylirostris* estaban en el estadio de Z₂₋₃. A causa de los problemas atribuidos al "Síndrome de Zoea" se realizó un tratamiento con antibióticos (1ppm E.+1 ppm F.) (Tabla 3).

De las 7 bacterias aisladas en este primer día de estudio, una provenía del macerado de las larvas y la otra del agua del tanque, las cuales fueron identificadas bioquímicamente como *V. vulnificus* y tuvieron un perfil RAPD típico de la bacteria S₂ (Cod. 159-161).

El octavo día cuando los antibióticos no fueron aplicados, las larvas presentaron el Síndrome de bolitas que frecuentemente está asociado al "Síndrome de Zoea"; una de las 3 bacterias aisladas de los macerados de larvas (169) tuvo el perfil RAPD típico de la S₂, sin embargo, su identificación bioquímica condujo a considerarla como *V. parahaemolyticus*. Es conveniente anotar que esta especie difiere de *V. vulnificus* solamente por el criterio 10 (celobiosa) de las pruebas de identificación bioquímica.

El noveno y décimo día, siempre en ausencia de antibióticos se aislaron bacterias *V. vulnificus* (173-178) de muestras provenientes de macerados de larvas y de agua de tanque respectivamente. Su perfil de RAPD se distinguió del perfil de S₂ por la presencia de una banda suplementaria. (Anexo VII. Foto 1 y 2).

Estos 2 tipos de perfiles de RAPD llamados S₂ y ** estuvieron todavía presentes el duodécimo día, aún cuando los tratamiento con antibióticos fueron aumentados (2ppm E.+2ppm F.). Dos de esas bacterias fueron identificadas como *V. parahaemolyticus* y *V. nereis*, esta última especie difiere de *V. vulnificus* por los siguientes criterios bioquímicos: 4-8-10-11-13-14-16 (Voges-Proskauer, Arginina dihidrolasa, Celobiosa, D-Manosa,

Sucrosa, D-Glucoronato y D-Galactosa), y del *V. parahaemolyticus* por los criterios bioquímicos: 4-6-7-8-11-12-13-16 (Anexo VI).

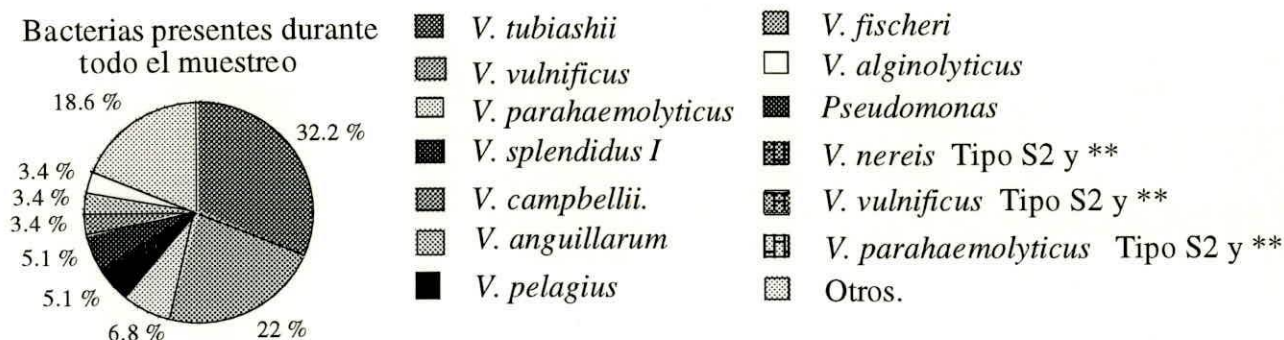
Después de este tratamiento las bacterias aisladas fueron bioquímicamente identificadas en su mayoría como *V. tubiashii*

A partir del día 20 y hasta el final del cultivo (Pl.12) las bacterias identificadas como *V. vulnificus* y que tenían un perfil típico S₂ fueron las que predominaron. Cuando las larvas (Pl.12) son vendidas se puede considerar que en su mayoría están asociadas a ese tipo de bacteria.

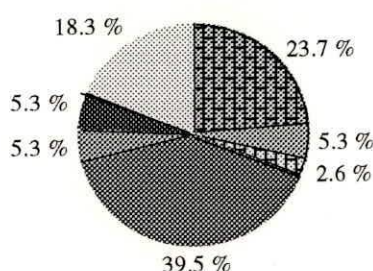
Estos resultados indican que las muestras de larvas y de agua tienen flora bacteriana similares, compuestas predominantemente de *V. vulnificus* y *V. tubiashii* (Fig. 6).

Las floras bacterianas en presencia y en ausencia de antibióticos muestran pocas diferencias al compararlas. En lo que concierne a las bacterias *V. vulnificus* tipo S₂ ellas parecen ser más sensibles al tratamiento que *V. tubiashii*, que se convierte en la predominante (Fig.6).

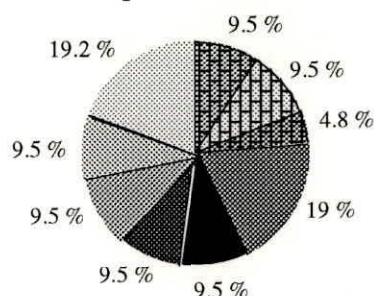
La evolución de poblaciones bacterianas, especie por especie a lo largo del cultivo larvario y en función del tratamiento con antibiótico aparece en el gráfico de la figura 6.



Bacterias presentes cuando no se aplican antibióticos



Bacterias presentes cuando se aplican antibióticos



Bacterias predominantes aisladas e identificadas, por día durante todo el muestreo.

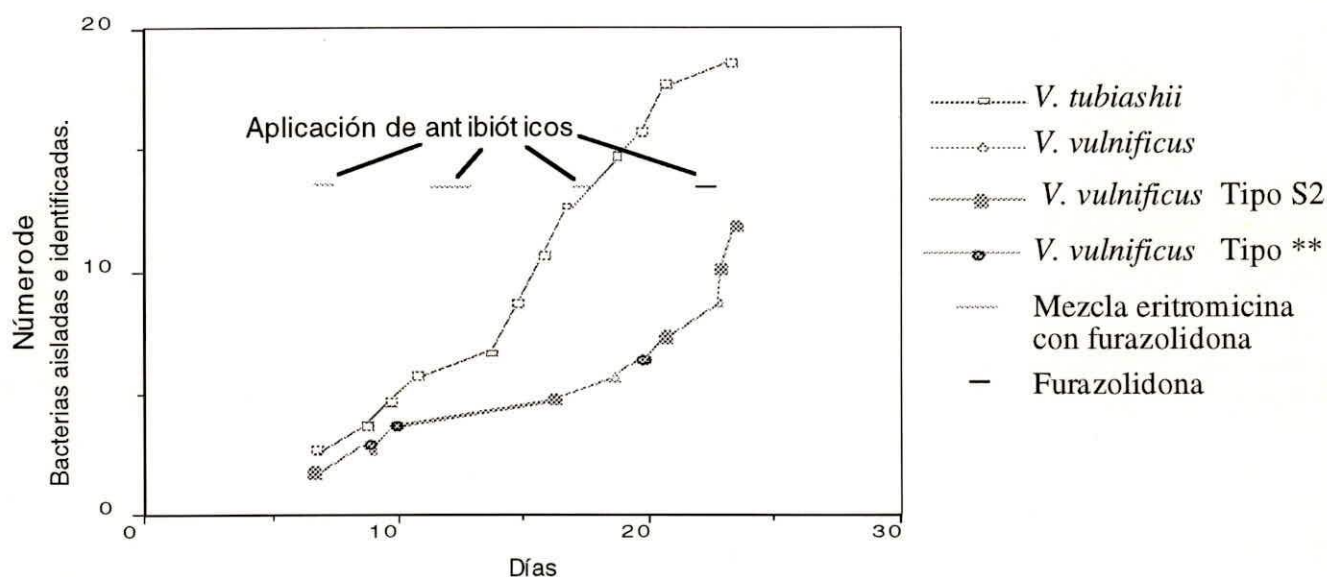


Figura 6. Resultados de los aislados bacterianos presentes en el tanque # 20. Realizados con larvas de *Penaeus stylirostris*.

Tabla 3. Resultados de los aislados bacterianos del tanque # 20 en base a los criterios de identificación bioquímica, antigénica y genética

Días	Estadio	% spv.	Observaciones-Tratamiento.	Muestra	Medio de Aislamiento	Código Bacteria	Especie de Bacteria	% C	Dot blot	RAPD
7	Z3-2	92	1E+1F (ppm)	Larvas	AM	156	V. tub.	95	-	
7	Z3-2	92	1E+1F (ppm)	Agua	AM	157	V. pel.	90	-	
7	Z3-2	92	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	159	V. vul.	100	-	S ₂
7	Z3-2	92	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	160	V. tub.	90	-	
7	Z3-2	92	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	161	V. vul.	89	-	S ₂
7	Z3-2	92	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	162	V. tub.	95	-	
7	Z3-2	92	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	163	V. spl. I	90	-	
8	Z/M	95	Bolas en Z	Agua	AM	165	V. log.	89	-	
8	Z/M	95	Bolas en Z	Agua	AM	166	Pseu.	100	-	
8	Z/M	95	Bolas en Z	Larvas	TCBS	168	V. spl. I	95	-	
8	Z/M	95	Bolas en Z	Larvas	TCBS	169	V. par.	90	-	S ₂
8	Z/M	95	Bolas en Z	Larvas	AM	170	Pseu.	83	-	
9	M1	106		Larvas	TCBS	172	V. tub.	95	-	
9	M1	106		Larvas	AM	173	V. vul.	89	-	**
10	M1-2	106		Agua	TCBS	177	V. tub.	100	-	
10	M1-2	106		Agua	TCBS	178	V. vul.	94	-	**
10	M1-2	106		Agua	AM	179	V. alg.	88	-	
11	M2-3	101	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	180	V. tub.	95	-	
11	M2-3	101	1E+1F (ppm)	Agua	AM	181	V. fur.	90	-	
12	M/P	57	2E+2F (ppm)	Agua	AM	184	V. par.	90	-	**
12	M/P	57	2E+2F (ppm)	Agua	AM	185	V. pel.	90	-	
12	M/P	57	2E+2F (ppm)	Agua	AM	189	V. fis.	90	-	
12	M/P	57	2E+2F (ppm)	Agua	TCBS	190	V. par.	90	-	S ₂
12	M/P	57	2E+2F (ppm)	Larvas	AM	192	V. ner.	86	-	**
14	P2	72	Sifoneo	Larvas	AM	195	V. tub.	90	-	
15	P3	63		Larvas	TCBS	199	V. tub.	100	-	
15	P3	63		Larvas	AM	201	V. tub.	95	-	
16	P4	56		Agua	TCBS	202	V. tub.	95	-	
16	P4	56		Agua	TCBS	205	V. tub.	95	-	
16	P4	56		Larvas	TCBS	206	V. vul.	94	-	S ₂
17	P5	61		Larvas	TCBS	213	V. tub.	90	-	
17	P5	61		Agua	TCBS	214	V. tub.	95	-	
17	P5	61		Agua	TCBS	215	V. flu.	100	-	
17	P5	61		Agua	AM	218	Aerom.	95	-	
18	P6	81	2E+2F (ppm)	Larvas	TCBS	222	V. ang.	85	-	
18	P6	81	2E+2F (ppm)	Larvas	TCBS	223	V. cho.	79	-	
18	P6	81	2E+2F (ppm)	Agua	AM	225	V. alg.	88	-	
18	P6	81	2E+2F (ppm)	Agua	AM	227	V. spl. I	90	-	
19	P7	69		Larvas	AM	229	V. cam.	94	-	
19	P7	69		Larvas	TCBS	230	V. vul.	89	-	
19	P7	69		Larvas	TCBS	231	V. tub.	100	-	
19	P7	69		Agua	AM	233	V. tub.	95	-	
20	P8	50		Larvas	TCBS	234	V. vul.	94	-	**

20	P8	50		Agua	TCBS	236	V. tub.	95	-	
21	P9	51		Agua	AM	239	V. tub.	95	-	
21	P9	51		Larvas	TCBS	241	V. par.	90	-	
21	P9	51		Larvas	TCBS	243	V. vul.	100	-	S ₂
21	P9	51		Larvas	AM	244	V. tub.	95	-	
22	P10	40	2F (ppm)	Larvas	TCBS	246	V. ang.	90	-	
22	P10	40	2F (ppm)	Agua	TCBS	248	V. har.	88	-	
22	P10	40	2F (ppm)	Agua	AM	249	V. fis.	95	-	
23	P11	19		Larvas	TCBS	253	V. vul.	94	-	
23	P11	19		Larvas	TCBS	256	V. vul.	89	-	S ₂
23	P11	19		Agua	TCBS	257	V. vul.	94	-	S ₂
24	P12	25		Larvas	TCBS	259	V. tub.	90	-	
24	P12	25		Agua	TCBS	260	V. vul.	94	-	S ₂
24	P12	25		Larvas	TCBS	264	V. cam.	88	-	
24	P12	25		Larvas	AM	265	V. pel.	95	-	
24	P12	25		Larvas	AM	266	V. vul.	94	-	S ₂

% spv.= Porcentaje de supervivencia

% C= Porcentaje de concordancia de los criterios bioquímicos de los aislados bacterianos con los criterios de referencia de la bioquímica miniaturizada

F. = furazolidona

E. = eritromicina

ESTUDIO # 2

Seguimiento bacteriológico del tanque # 21

Apenas llegaron al laboratorio las larvas en N₅ fueron tratadas con furazolidona (0.2 ppm) (Tabla 4) y se reveló que ellas estaban ya contaminadas por bacterias del perfil RAPD ** (123) y S₂ (124), identificadas bioquímicamente como *V. vulnificus* y *V. harveyi*.

Durante los estadios de Z₁ y Z₁₋₂ y en ausencia de antibióticos la diversidad bacteriana fue importante, una de 9 colonias identificadas tuvo la característica *V. vulnificus* tipo S₂ (130). Durante todo el estadio Z₂, al comienzo del cual fueron observadas mortalidades, la mayoría de las bacterias correspondieron al perfil S₂ o ** (136-138-144-145 y 141-142-143) respectivamente, las identificaciones bioquímicas condujeron a otros diversos tipos de bacterias además de *V. vulnificus*.

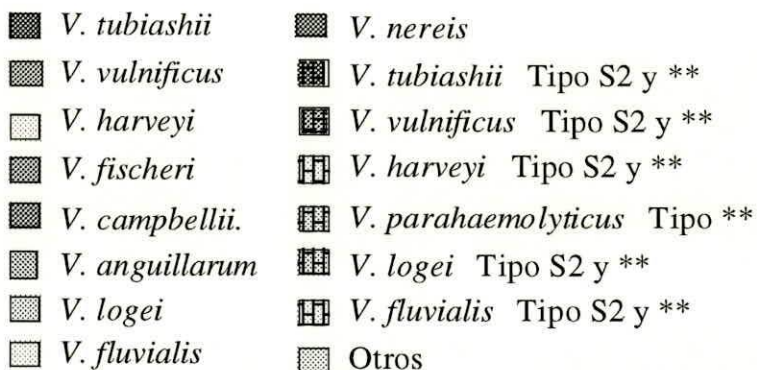
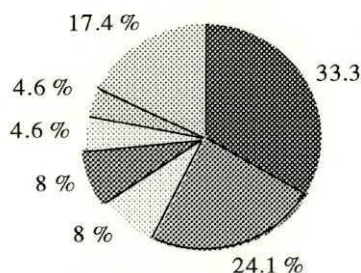
En el estadio Z₃ y a pesar del tratamiento con antibióticos (0.6ppm E.+0.6ppm F para Z₃, día 1 y 1ppm E.+1ppm F para Z₃, día 2) los síntomas de bolitas fueron observados. En este momento se observó una caída de la supervivencia, reduciéndose a un 60%, valor sobreestimado que se reveló al final del ciclo ya que la supervivencia final fue de 51.6%.

Desde el día 13 hasta el final de la producción, las bacterias que tenían el perfil típico S₂ y en una menor proporción el perfil RAPD **, estuvieron presentes en el cultivo más frecuentemente fuera del periodo de tratamiento con antibiótico. Las identificaciones bioquímicas correspondientes condujeron frecuentemente a las especies *V. tubiashii* y *V. vulnificus*..

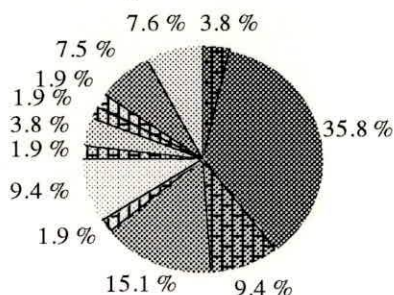
Del mismo modo que en el tanque # 20, la flora bacteriana es similar en presencia o no de antibióticos, siendo las mismas bacterias las que predominan en presencia o ausencia de estos productos (Fig. 7).

Las curvas de evaluación de las principales especies bacterianas identificadas bioquímica o genéticamente son relativamente diferentes de aquellas del tanque # 20 y prácticamente ninguna bacteria del tipo S₂ estuvo presente en las larvas Pl₁₂ en el momento en que las pots-larvas fueron vendidas a una camaronera (Fig. 7).

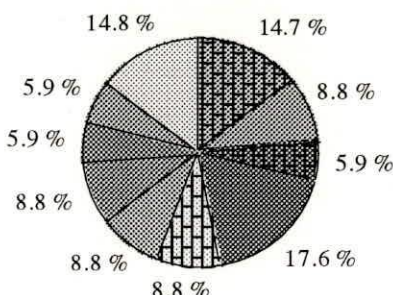
Bacterias presentes durante todo el muestreo



Bacterias presentes cuando no se aplican antibióticos



Bacterias presentes cuando se aplican antibióticos



Bacterias predominantes aisladas e identificadas, por día durante todo el muestreo.

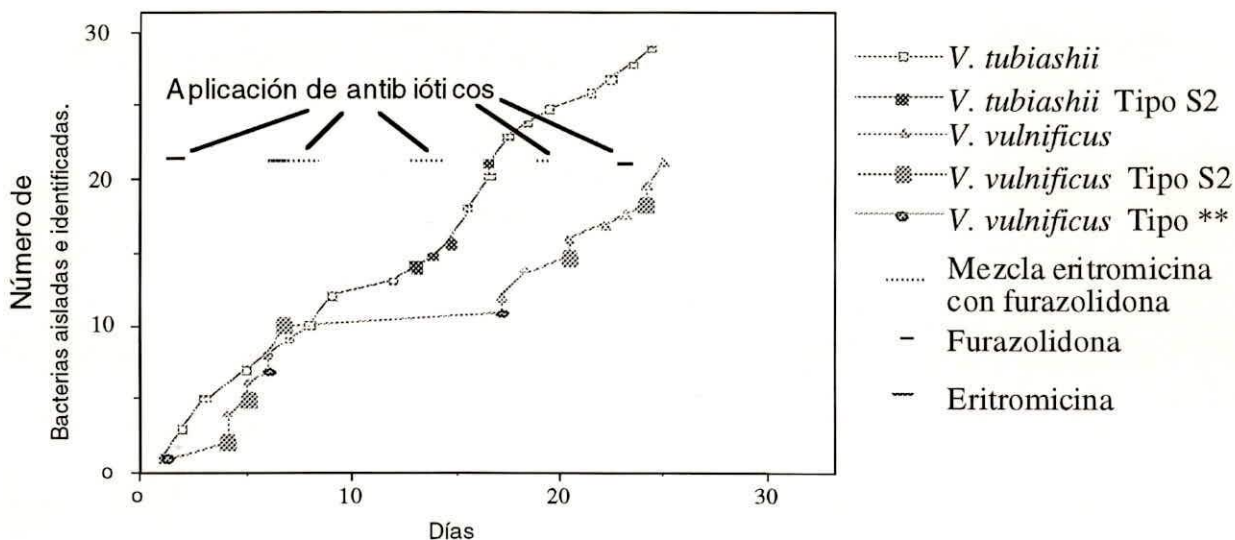


Figura 7. Resultados de los aislados bacterianos presentes en el tanque # 21. Realizados con larvas de *Penaeus stylirostris*.

Tabla 4. Resultados de los aislados bacterianos del tanque # 21 en base a los criterios de identificación bioquímica, antigénica y genética

Días	Estadio	% spv.	Observaciones-Tratamiento	Muestra	Medio de Aislamiento	Código Bacteria	Especie de Bacteria	% C	Dot blot	RAPD
1	N5	100	0.2F (ppm)	Larvas	TCBS	121	V. log .	95	-	
1	N5	100	0.2F (ppm)	Larvas	TCBS	122	V. tub.	95	-	
1	N5	100	0.2F (ppm)	Larvas	TCBS	123	V. vul.	95	-	**
2	N/Z	100	Deformidad 5%	Larvas	TCBS	124	V. har.	88	-	S ₂
2	N/Z	100	Deformidad 5%	Larvas	TCBS	125	V. tub.	95	-	
2	N/Z	100	Deformidad 5%	Larvas	TCBS	126	V. tub.	90	-	
3	Z1	100		Larvas	TCBS	127	V. tub.	90	-	
3	Z1	100		Larvas	TCBS	128	V. tub.	95	-	
3	Z1	100		Larvas	TCBS	129	V. har.	90	-	
4	Z1-2	119		Agua	TCBS	130	V. vul.	94	-	S ₂
4	Z1-2	119		Agua	TCBS	131	V. vul.	94	-	
4	Z1-2	119		Larvas	TCBS	132	V. vul.	94	-	
4	Z1-2	119		Larvas	TCBS	133	V. har.	88	-	
4	Z1-2	119		Larvas	TCBS	134	V. spl. II	90	-	
4	Z1-2	119		Larvas	AM	135	V. har.	94	-	
5	Z2	116	Mortalidad 4%	Agua	TCBS	136	V. log.	79	-	S ₂
5	Z2	116	Mortalidad 4%	Agua	TCBS	137	V. tub.	90	-	
5	Z2	116	Mortalidad 4%	Larvas	TCBS	138	V. vul.	100	-	S ₂
5	Z2	116	Mortalidad 4%	Larvas	TCBS	139	V. tub.	95	-	
5	Z2	116	Mortalidad 4%	Larvas	TCBS	140	V. vul.	89	-	
6	Z2	113	0.4E (ppm)	Larvas	TCBS	141	V. vul.	100	-	**
6	Z2	113	0.4E (ppm)	Larvas	TCBS	142	V. flu.	94	-	**
6	Z2	113	0.4E (ppm)	Larvas	TCBS	143	V. flu.	89	-	**
6	Z2	113	0.4E (ppm)	Larvas	TCBS	144	V. flu.	89	-	S ₂
6	Z2	113	0.4E (ppm)	Larvas	AM	145	V. vul.	100	-	S ₂
6	Z2	113	0.4E (ppm)	Larvas	TCBS	146	V. tub.	95	-	
7	Z3	102	Bolas 0.6E+0.6F (ppm)	Agua	TCBS	147	V. tub.	95	-	
7	Z3	102	Bolas 0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	TCBS	148	V. cam.	88	-	
7	Z3	102	Bolas 0.6E+0.6F (ppm)	Agua	TCBS	149	V. vul.	100	-	S ₂
7	Z3	102	Bolas 0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	TCBS	150	V. vul.	100	-	S ₂
7	Z3	102	Bolas 0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	TCBS	151	V. har.	88	-	
7	Z3	102	Bolas 0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	AM	152	V. ner.	91	-	
8	Z3	135	Bolas 1E+1F (ppm)	Larvas	AM	153	V. pel.	95	-	
8	Z3	135	Bolas 1E+1F (ppm)	Agua	AM	154	V. dam.	91	-	
8	Z3	135	Bolas 1E+1F (ppm)	Agua	AM	155	V. ner.	86	-	
8	Z3	135	Bolas 1E+1F (ppm)	Larvas	AM	158	V. ang.	85	-	
8	Z3	135	Bolas 1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	164	V. tub.	95	-	
9	Z/M	59		Larvas	AM	167	V. tub.	90	-	
9	Z/M	59		Larvas	TCBS	171	V. tub.	90	-	

10	M1	67		Larvas	AM	174	V. har.	94	-	
10	M1	67		Larvas	TCBS	175	V. har.	88	-	
10	M1	67		Larvas	TCBS	176	V. spl. I	95	-	
12	M2-3	82		Larvas	TCBS	182	V. par.	90	-	**
12	M2-3	82		Agua	AM	183	V. tub.	95	-	
13	M/P	107	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	186	V. fis.	95	-	
13	M/P	107	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	187	V. ang.	85	-	
13	M/P	107	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	188	V. tub.	90	-	S ₂
13	M/P	107	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	191	V. par.	90	-	
14	P1	77	2E+2F (ppm) Hay M	Agua	TCBS	193	V. tub.	90	-	S ₂
15	P2	79	Sifoneo	Agua	TCBS	194	V. tub.	90	-	S ₂
15	P2	79	Sifoneo	Agua	AM	196	V. cam.	94	-	
15	P2	79	Sifoneo	Agua	AM	197	V. flu.	94	-	S ₂
16	P3	108		Larvas	TCBS	198	V. tub.	95	-	
16	P3	108		Agua	AM	200	V. tub.	95	-	
17	P4	56		Larvas	TCBS	203	V. tub.	90	-	S ₂
17	P4	56		Larvas	TCBS	204	V. tub.	90	-	
17	P4	56		Larvas	AM	207	V. log.	94	-	
17	P4	56		Agua	AM	208	V. pel.	95	-	
17	P4	56		Agua	AM	209	V. tub.	100	-	
18	P5	51		Larvas	TCBS	210	V. vul.	89	-	S ₂
18	P5	51		Larvas	TCBS	211	V. vul.	89	-	
18	P5	51		Larvas	TCBS	212	V. tub.	90	-	
18	P5	51		Agua	AM	216	V. tub.	90	-	
18	P5	51		Agua	AM	217	V. ner.	86	-	
19	P6	76	2E+2F (ppm)	Agua	TCBS	219	V. vul.	90	-	
19	P6	76	2E+2F (ppm)	Larvas	TCBS	220	V. cam.	95	-	
19	P6	76	2E+2F (ppm)	Larvas	TCBS	221	V. vul.	94	-	
19	P6	76	2E+2F (ppm)	Larvas	AM	224	V. tub.	90	-	
19	P6	76	2E+2F (ppm)	Agua	AM	226	V. cam.	88	-	
20	P7	71		Larvas	AM	228	V. log.	95	-	
20	P7	71		Agua	AM	232	V. tub.	95	-	
21	P8	79		Larvas	AM	235	V. vul.	94	-	**
21	P8	79		Agua	AM	237	V. cam.	88	-	
21	P8	79		Larvas	AM	238	V. vul.	94	-	
22	P9	18		Larvas	AM	240	V. cam.	88	-	
22	P9	18		Larvas	TCBS	242	V. tub.	90	-	
23	P10	85	2F (ppm)	Agua	AM	245	V. ang.	85	-	
23	P10	85	2F (ppm)	Agua	TCBS	247	V. fis.	95	-	
23	P10	85	2F (ppm)	Larvas	TCBS	250	V. tub.	100	-	
23	P10	85	2F (ppm)	Larvas	AM	251	V. vul.	94	-	
24	P11	17		Larvas	TCBS	252	V. vul.	94	-	S ₂
24	P11	17		Larvas	AM	254	V. tub.	90	-	
24	P11	17		Larvas	AM	255	V. vul.	94	-	
25	P12	23		Agua	TCBS	258	V. tub.	100	-	
25	P12	23		Larvas	TCBS	261	V. cam.	88	-	
25	P12	23		Agua	AM	262	V. vul.	100	-	
25	P12	23		Agua	AM	263	V. vul.	94	-	

% spv.= Porcentaje de supervivencia

% C= Porcentaje de concordancia de los criterios bioquímicos de los aislados bacterianos con los
criterios de referencia de la bioquímica miniaturizada

F. = Furazolidona

E. = Eritromicina

ESTUDIO # 3

Seguimiento bacteriológico del tanque # 18

Este estudio corresponde a la segunda corrida, efectuada después de los 2 estudios precedentes y fue realizado con larvas de *P. vannamei*. Como rutina del laboratorio, los N₅ fueron cultivados en presencia de furazolidona (0.2ppm) (Tabla 5). Hasta el día 7, es decir, prácticamente en el momento de la transición de Z₂ a Z₃ hubo una buena diversidad de la flora bacteriana tanto en el agua como en la larva.

Es interesante anotar que 4 aislados (13-24-26-35) identificados respectivamente como *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. campbellii* y *V. pelagius*, tuvieron una reacción positiva con el anticuerpo 2C9 específico de E₂₂ y S₂, sondas de referencia del "Síndrome de Bolitas" y clasificadas como *V. harveyi* en base a criterios del sistema biológico y más recientemente como *V. vulnificus* utilizando los criterios de referencia del manual de Bergey's y las tablas preparadas por Solís (1996) (Anexo V).

Durante toda la duración del estadio Z₃, entre los días 7 y 9 se aplicó un tratamiento con antibióticos pasando sucesivamente de 0.4 ppm de eritromicina + 0.4 ppm de furazolidona a 0.6 ppm de eritromicina + 0.6 ppm de furazolidona y finalmente a 1ppm de eritromicina + 1 ppm de furazolidona, la variedad bacteriana fue entonces relativamente importante y al octavo día apareció la primera colonia con el perfil RAPD típico de S₂ (42), la identificación bioquímica condujo a *V. tubiashii*. Los días 12 y 13 se aplica nuevamente una dosis de antibiótico (1 ppm E.+1 ppm F.), luego ésta es aumentada (2 ppm E.+2 ppm F.) el día 14, las bacterias *V. vulnificus* con el perfil RAPD de S₂ y ** fueron más frecuentes; a partir del día 15 las bacterias de tipo S₂ fueron predominantes y su identificación bioquímica condujo frecuentemente a considerarlas como *V. vulnificus*.. Ciertos aislados fueron identificados bioquímicamente como *V. tubiashii* (78), *V. harveyi* (81-103-114-116) y *V. splendidus I* (85).

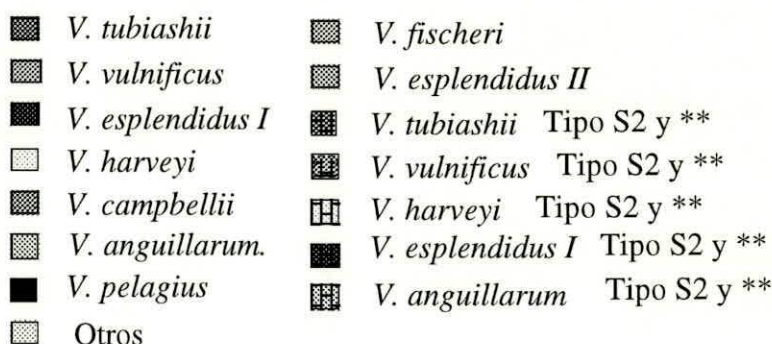
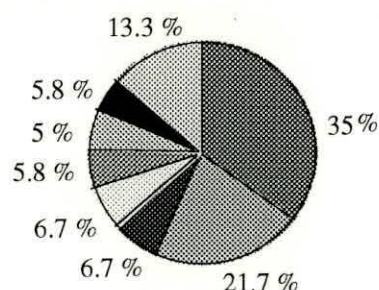
Al igual que el tanque # 20 de la corrida precedente con *P. stylirostris*, las Pl₁₀ que salieron del laboratorio fueron masivamente infectadas de bacterias de tipo S₂, lo que podría ser fatal para el futuro de estos animales en la piscina.

Desde el punto de vista de la flora bacteriana aparecieron los mismos tipos de bacterias observados en *P. stylirostris*, aunque las fluctuaciones de las mismas difieren escasamente en presencia y en ausencia de antibióticos (Fig. 8).

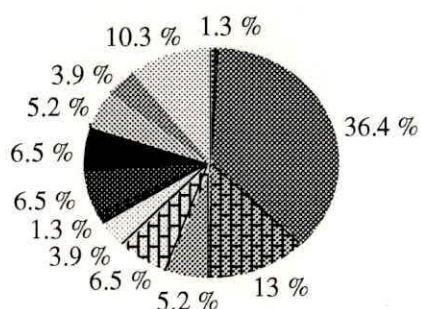
Es interesante anotar que la diversidad bacteriana inicial se redujo a partir del 16 hasta el día 24, volviéndose la bacteria de tipo S₂ predominante cuando el laboratorio sufrió mortalidades masivas en los primeros tanques.

Entonces, los análisis de RAPD fueron inmediatamente efectuados con las muestras provenientes de los tanques con animales enfermos, de diferentes partes del laboratorio, y de los cultivos de algas, donde fueron encontradas bacterias de tipo S₂. Sin embargo, el tanque # 18 no fue tan afectado como otros en los cuales las larvas fueron totalmente eliminadas presentando los síntomas del Síndrome de Zoea o de Bolitas.

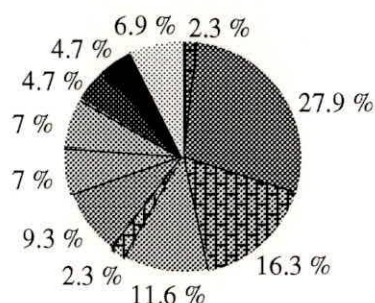
Bacterias presentes en todo el muestreo



Bacterias presentes cuando no se aplican antibióticos



Bacterias presentes cuando se aplican antibióticos



Bacterias predominantes aisladas e identificadas por día durante todo el muestreo.

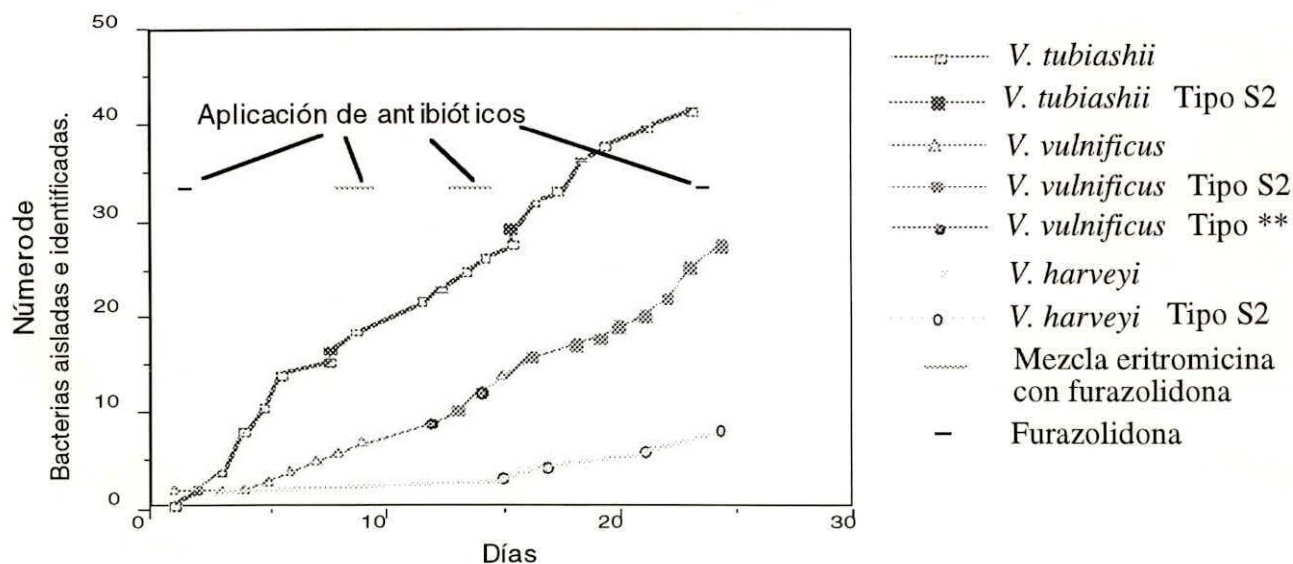


Figura 8. Resultados de los aislados bacterianos presentes en el tanque # 18. Realizados con larvas de *Penaeus vannamei*.

Tabla 5. Resultados de los aislados bacterianos del tanque # 18 en base a los criterios de identificación bioquímica, antigénica y genética

Días	Estadio	% spv.	Tratamiento-Observaciones	Muestra	Medio de Aislamiento	Código Bacteria	Especie de Bacteria	% C	Dot blot	RAPD
1	N5	100	0.2F (ppm)	Larvas	TCBS	1	V. vul.	100	-	
1	N5	100	0.2F (ppm)	Larvas	TCBS	2	V. vul.	89	-	
1	N5	100	0.2F (ppm)	Agua	AM	3	V. dam.	91	-	
1	N5	100	0.2F (ppm)	Larvas	AM	4	V. cam.	100	-	
1	N5	100	0.2F (ppm)	Larvas	AM	5	V. pel.	84	-	
2	N/Z	100		Larvas	AM	6	V. pel.	89	-	
2	N/Z	100		Agua	TCBS	7	V. tub.	95	-	
2	N/Z	100		Larvas	TCBS	8	V. tub.	90	-	
2	N/Z	100		Larvas	AM	9	V. ner.	86	-	
2	N/Z	100		Larvas	TCBS	10	V. pel.	90	-	
3	Z1	87		Agua	TCBS	11	V. tub.	95	-	
3	Z1	87		Agua	TCBS	12	V. spl. I	95	-	
3	Z1	87		Agua	AM	13	V. har.	100	+	
3	Z1	87		Larvas	AM	14	V. spl. I	95	-	
3	Z1	87		Larvas	TCBS	15	V. har.	88	-	
3	Z1	87		Larvas	TCBS	16	V. tub.	90	-	
3	Z1	87		Larvas	TCBS	17	V. pel.	90	-	
4	Z1-2	88		Larvas	AM	18	V. tub.	95	-	
4	Z1-2	88		Agua	TCBS	19	V. cam.	88	-	
4	Z1-2	88		Larvas	AM	20	V. tub.	100	-	
4	Z1-2	88		Larvas	TCBS	21	V. tub.	95	-	
4	Z1-2	88		Larvas	TCBS	22	V. tub.	100	-	
5	Z2	81		Agua	TCBS	23	V. tub.	95	-	
5	Z2	81		Larvas	TCBS	24	V. vul.	89	+	
5	Z2	81		Larvas	TCBS	25	V. tub.	100	-	
5	Z2	81		Larvas	TCBS	26	V. cam.	88	+	
5	Z2	81		Agua	TCBS	27	V. tub.	95	-	
6	Z2	107		Agua	AM	28	V. tub.	95	-	
6	Z2	107		Agua	TCBS	29	V. fur.	90	-	
6	Z2	107		Larvas	AM	30	V. vul.	95	-	
6	Z2	107		Larvas	TCBS	31	V. tub.	95	-	
6	Z2	107		Larvas	AM	32	V. tub.	100	-	
6	Z2	107		Agua	TCBS	33	V. tub.	90	-	
6	Z2	107		Larvas	TCBS	34	V. spl. I	90	-	
6	Z2	107		Larvas	TCBS	35	V. pel.	100	+	
7	Z2-3	100	0.4E+0.4F (ppm)	Agua	AM	36	V. vul.	95	-	
7	Z2-3	100	0.4E+0.4F (ppm)	Larvas	AM	37	V. tub.	100	-	
7	Z2-3	100	0.4E+0.4F (ppm)	Larvas	TCBS	38	V. fis.	90	-	

7	Z2-3	100	0.4E+0.4F (ppm)	Larvas	TCBS	39	V. spl. I	95	-	
8	Z3	100	0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	TCBS	40	V. fis.	95	-	
8	Z3	100	0.6E+0.6F (ppm)	Agua	AM	41	V. fis.	100	-	
8	Z3	100	0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	TCBS	42	V. tub.	100	-	S ₂
8	Z3	100	0.6E+0.6F (ppm)	Agua	TCBS	43	V. spl. II	90	-	
8	Z3	100	0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	AM	44	V. vul.	94	-	
8	Z3	100	0.6E+0.6F (ppm)	Larvas	AM	45	V. pel.	95	-	
9	Z3	100	1E+1F (ppm)	Agua	AM	46	V. tub.	90	-	
9	Z3	100	1E+1F (ppm)	Larvas	AM	47	V. spl. II	95	-	
9	Z3	100	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	48	V. vul.	89	-	
9	Z3	100	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	49	V. tub.	100	-	
9	Z3	100	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	50	V. ang.	95	-	
12	M1-2	103	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	51	V. tub.	95	-	
12	M1-2	103	1E+1F (ppm)	Larvas	AM	52	V. vul.	95	-	**
12	M1-2	103	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	53	V. tub.	95	-	
12	M1-2	103	1E+1F (ppm)	Agua	AM	54	V. tub.	100	-	
12	M1-2	103	1E+1F (ppm)	Larvas	AM	55	V. tub.	100	-	
12	M1-2	103	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	56	V. ang.	95	-	**
13	M2-3	56	1E+1F (ppm)	Larvas	AM	57	V. vul.	100	-	S ₂
13	M2-3	56	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	58	V. tub.	95	-	
13	M2-3	56	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	59	V. cam.	88	-	
13	M2-3	56	1E+1F (ppm)	Agua	TCBS	60	V. cam.	88	-	
13	M2-3	56	1E+1F (ppm)	Larvas	AM	61	V. alg.	82	-	
13	M2-3	56	1E+1F (ppm)	Larvas	TCBS	62	V. spl. II	95	-	
14	M/P	51	2E+2F (ppm)	Agua	TCBS	63	V. spl. I	95	-	
14	M/P	51	2E+2F (ppm)	Agua	TCBS	64	V. vul.	89	-	**
14	M/P	51	2E+2F (ppm)	Larvas	TCBS	65	V. vul.	94	-	**
14	M/P	51	2E+2F (ppm)	Larvas	TCBS	66	V. tub.	90	-	
14	M/P	51	2E+2F (ppm)	Larvas	AM	67	V. tub.	95	-	
15	P1	58		Larvas	TCBS	68	V. har.	88	-	S ₂
15	P1	58		Larvas	TCBS	69	V. vul.	89	-	
15	P1	58		Larvas	AM	70	V. tub.	95	-	
15	P1	58		Agua	TCBS	71	V. dam.	91	-	
15	P1	58		Agua	TCBS	72	Aerom.	90	-	
15	P1	58		Agua	AM	73	V. vul.	89	-	
16	P2	55		Larvas	TCBS	74	V. vul.	89	-	S ₂
16	P2	55		Larvas	TCBS	75	V. har.	94	-	
16	P2	55		Agua	TCBS	76	V. vul.	100	-	S ₂
16	P2	55		Agua	TCBS	77	V. spl. I	90	-	
16	P2	55		Larvas	AM	78	V. tub.	95	-	S ₂
16	P2	55		Agua	AM	79	V. tub.	95	-	
17	P3	58		Larvas	TCBS	80	V. tub.	100	-	
17	P3	58		Larvas	TCBS	81	V. har.	94	-	S ₂
17	P3	58		Agua	TCBS	82	V. tub.	90	-	
17	P3	58		Larvas	AM	83	V. tub.	100	-	
17	P3	58		Agua	AM	84	V. alg.	77	-	
18	P4	56		Larvas	TCBS	85	V. spl. I	95	-	S ₂

18	P4	56		Larvas	TCBS	86	V. tub.	95	-	
18	P4	56		Larvas	AM	87	V. pel.	95	-	
18	P4	56		Larvas	AM	88	V. spl. II	95	-	
18	P4	56		Agua	TCBS	89	V. vul.	100	-	S ₂
19	P5	54		Larvas	TCBS	90	V. tub.	95	-	
19	P5	54		Agua	TCBS	91	V. tub.	95	-	
19	P5	54		Larvas	TCBS	92	V. vul.	100	-	S ₂
19	P5	54		Agua	TCBS	93	V. tub.	95	-	
19	P5	54		Larvas	AM	94	V. fis.	95	-	
20	P6	58		Larvas	TCBS	95	V. vul.	100	-	S ₂
20	P6	58		Larvas	TCBS	96	V. spl. I	90	-	
20	P6	58		Larvas	AM	97	V. tub.	100	-	
20	P6	58		Larvas	AM	98	V. ang.	95	-	
20	P6	58		Agua	TCBS	99	V. tub.	95	-	
21	P7	54		Larvas	TCBS	100	V. tub.	100	-	
21	P7	54		Larvas	TCBS	101	V. vul.	100	-	S ₂
21	P7	54		Agua	TCBS	102	V. tub.	90	-	
21	P7	54		Agua	TCBS	103	V. har.	94	-	S ₂
22	P8	49		Agua	TCBS	104	V. vul.	100	-	S ₂
22	P8	49		Larvas	TCBS	105	V. vul.	100	-	S ₂
22	P8	49		Larvas	TCBS	106	V. ang.	85	-	
22	P8	49		Agua	AM	107	V. hol.	79	-	
23	P9	48	2F (ppm)	Larvas	TCBS	108	V. tub.	90	-	
23	P9	48	2F (ppm)	Larvas	TCBS	109	V. vul.	95	-	S ₂
23	P9	48	2F (ppm)	Agua	TCBS	110	V. tub.	100	-	
23	P9	48	2F (ppm)	Larvas	AM	111	V. cam.	94	-	
23	P9	48	2F (ppm)	Agua	AM	112	V. vul.	84	-	S ₂
23	P9	48	2F (ppm)	Larvas	AM	113	V. vul.	100	-	S ₂
24	P10	48		Agua	TCBS	114	V. har.	94	-	S ₂
24	P10	48		Larvas	TCBS	115	V. ang.	95	-	
24	P10	48		Larvas	TCBS	116	V. har.	94	-	S ₂
24	P10	48		Larvas	AM	117	V. vul.	95	-	S ₂
24	P10	48		Agua	AM	118	V. vul.	100	-	S ₂
24	P10	48		Larvas	AM	119	V. cam.	94	-	
24	P10	48		Agua	TCBS	120	V. ang.	90	-	

% spv.= Porcentaje de supervivencia

%C = Porcentaje de concordancia de los criterios bioquímicos de los aislados bacterianos con los criterios de referencia de la bioquímica miniaturizada

F. = Furazolidona

E. = Eritromicina

CONCLUSIONES

Un aspecto primordial de estos estudios epidemiológicos, fue evaluar en términos de facilidad y confiabilidad las 3 técnicas recientemente desarrolladas en el CENAIM.

Es importante anotar que los aislamientos fueron efectuados sobre Agar Marino (AM) o medio TCBS, siendo estos 2 agares clásicamente utilizados en todos los laboratorios. El hecho de haber aislado con los 2 medios los mismos tipos de vibrios, pero siempre en cantidad menor sobre TCBS, sugiere que este medio ejerce un efecto selectivo al seno de un mismo grupo de bacterias, las cuales parecen idénticas en base a criterios bioquímicos pero de hecho son diferentes desde el punto de vista de su capacidad de utilización del medio TCBS.

Estas consideraciones son importantes porque es lógico suponer que, bacterias patógenas e hiperespecializadas para una vida parasitaria en los organismos del sistema digestivo del camarón, pueden haber perdido la capacidad de desarrollarse en cultivo. Este fenómeno es particularmente bien conocido en salud humana, en el caso del *V. cholerae* del cual existen cepas hipervirulentas que no pueden ser aisladas porque no son cultivables. (Colwell; *et.al*, 1995).

Desde el punto de vista de la identificación bioquímica, el sistema miniaturizado desarrollado por Solís, A. (comunicación personal) fue realmente útil, ya que las 266 identificaciones se realizaron fácilmente al igual que la lectura de sus resultados.

Con una automatización simple, por ejemplo la utilización de una bomba peristáltica multicanal para repartir los medios en los hoyos de las microplacas, o con la utilización de un sistema de distribución del tipo pipeta de repetición Eppenforf, parece totalmente realista

emprender amplias encuestas epidemiológicas a la escala de asociación entre productores y/o centros de investigación como el CENAIM.

A nivel de empresa privada es absolutamente necesario reemplazar la utilización de los sistemas existentes, tipo galería API 20E, que conducen a identificaciones imprecisas a causa de la ausencia de criterios bioquímicos esenciales. El sistema miniaturizado con 21 criterios bioquímicos es mucho más preciso, considerando que el nombre de especie para una bacteria tiene solamente un valor indicativo, debido a la variabilidad genética de ese tipo de microorganismos. Este concepto de variabilidad genética puede ser muy bien explorado, gracias al estudio de perfiles de RAPD.

Se reveló que la técnica de AP PCR (Aleatory-Primed Polimerase Chain Reaction), en su versión simplificada y optimizada (Betancourt y Motte, comunicación personal), fue perfectamente confiable, ya que los controles negativos fueron correctos y los controles positivos fueron perfectamente reproducibles (S₂-E₂₂-ILI-158).

Estos resultados muestran que la AP-PCR puede perfectamente entrar en la gama de herramientas de caracterización, identificación y diagnóstico de bacterias asociadas al camarón y de manera más general de agentes patógenos de camarón.

Desde el punto de vista de informaciones bacteriológicas aportadas por el RAPD, estos resultados son realmente interesantes, considerando que es el primer estudio global que permite analizar en paralelo fenotipos bioquímicos y genotipos. Así, se puede considerar que los marcadores genéticos podrían estar mejor adaptados a los análisis epidemiológicos. En efecto, la gran mayoría de cepas de tipo S₂ y ** en RAPD fueron identificadas como *V. vulnificus*, otras consideradas como *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. En tanto que *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* son próximos desde el punto de vista taxonómico en referencia a los genes de ADN ribosómicos (Martinez-Picado; *et al* 1994), *V. harveyi* está

más alejado filogenéticamente. Los criterios bioquímicos para distinguir *V. harveyi* y *V. vulnificus* podrían ser insuficientes para evitar confusiones entre los dos grupos.

Aunque es necesario ser prudente, es interesante anotar que los genotipos S₂ y ** de bacterias aisladas en 1996, en aparente asociación con el "Síndrome de Zoea", son similares a los de las bacterias aisladas en 1992, en asociación con el "Síndrome de bolitas". Por supuesto, es conveniente utilizar otros iniciadores para acumular más información sobre los perfiles de RAPD de diferentes cepas de S₂. Además, será indispensable emprender infecciones experimentales según el protocolo desarrollado por San Miguel, L. (1996) y optimizado por Serrano, J. (1996), a fin de determinar si las cepas S₂ y **, son efectivamente patógenas y capaces de inducir los síntomas típicos del "Síndrome de Zoea".

Es necesario señalar que luego de este estudio, se iniciaron experiencias en este laboratorio (Macrobio) para limitar el desarrollo de bacterias de tipo S₂ utilizando una cepa de *V. alginolyticus* que tiene un cierto efecto probiótico contra bacterias de tipo S₂ y E₂₂ (San Miguel, L. 1996; Serrano, J. 1996).

En el caso de que las cepas de tipo S₂ y ** sean efectivamente patógenas, será urgente identificar una banda correspondiente a un producto de amplificación por PCR específico de estas cepas. Este producto de amplificación podría ser marcado con la digoxigenina para ser utilizado como sonda específica. La ventaja de este tipo de ensayo es permitir analizar simultáneamente miles de colonias bacterianas transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa e identificar en algunas horas aquellas que son reconocidas por esta sonda. Este tipo de ensayo colony-blot puede ser utilizado en rutina para controlar la aparición de bacterias patógenas.

En lo que concierne a los ensayos de inmuno-dot-blot, ellos fueron simples de efectuar, pero las bacterias actualmente presentes en las crías larvarias no poseen el antígeno de membrana reconocido específicamente por el anticuerpo 2C9. Estos resultados indican el riesgo de la

utilización de anticuerpos monoclonales en los cuales la capacidad de reconocimiento concierne a algunos aminoácidos. Así, las cepas de tipo *V. vulnificus* S₂ han mutado probablemente a nivel de este epítotope, quizás en relación con un aumento de la patogenicidad, siendo el "Síndrome de Zoea" más drástico que el "Síndrome de las Bolitas". En consecuencia, las colonias S₂ y ** deberán ser analizadas en dot-blot con la colección de 19 anticuerpos monoclonales específicos de S₂ y E₂₂, asociados al "Síndrome de Bolitas". Desde el punto de vista de diagnóstico y detección precoz de bacterias S₂, podría ser eficaz mezclar todos los anticuerpos monoclonales que reaccionan con las cepas actuales de S₂ y **.

En conclusión, este estudio totalmente original a la escala de cultivo de camarones peneidos, muestra que este tipo de análisis epidemiológico, podría desde ahora ser realizado según normas estandarizadas y confiables, con la finalidad de prevenir enfermedades de camarón, tal como es practicado en medicina humana y veterinaria.

Sin embargo, se trata solamente de una primera etapa que abre camino hacia un mejor conocimiento de las bacterias asociadas a los camarones, siendo el objetivo domesticar y explotar aquellas que son beneficiosas y por otra parte, limitar en todo lo posible la aparición de bacterias patógenas que son nefastas, en particular con la ayuda de cepas probióticas.

RECOMENDACIONES

- 1.- Completar la caracterización de cepas S₂ y ** por otros análisis de RAPD con diferentes iniciadores, por inmuno-dot-blot con otros anticuerpos y por patología experimental para determinar si estas bacterias están efectivamente asociadas al "Síndrome de Zoea".
- 2.- Confirmar el efecto probiótico *in vitro* e *in vivo* de cepas tipo ILI en contra de cepas tipo S₂.
- 3.- Caracterizar y estudiar las cepas de *V. tubiashii* a fin de determinar la naturaleza de su asociación con las larvas de *P. vannamei* y su interacción con otras bacterias.
- 4.- Estudiar el futuro en las camaroneras de las post-larvas infectadas por S₂ y **.
- 5.- Empezar en laboratorios otros estudios epidemiológicos según el esquema seguido en este trabajo.
- 6.- Según la misma base epidemiológica estudiar las mortalidades en camaroneras practicando a la vez análisis histológicos, bioquímicos y genéticos.
- 7.- Estudiar, según el mismo esquema, las mortalidades de los reproductores desde su introducción en los laboratorios.
- 8.- Una vez estandarizadas las tres nuevas técnicas (bioquímica miniaturizada, AP-PCR y dot-blot), organizar la transferencia de las mismas para utilizarlas al servicio de los productores.
- 9.- Comparar las bacterias *V. vulnificus* S₂ asociadas a los camarones con aquellas responsables de patologías en el hombre a fin de estar en capacidad de prevenir los riesgos de epidemias relacionadas a la actividad acuícola.

BIBLIOGRAFIA

- ACUACULTURA ECUATORIANA: UN SECTOR PARA INVERTIR. En Acuicultura del Ecuador, N° 7 Marzo-Abril, 1995. Camara Nacional de Acuicultura. 8-9.
- AUSTIN, B. 1991 Identification. en Austin, B. (ed.). *Methods in aquatic bacteriology.*, 4, 95-111.
- AUSTIN, B. 1995. *Vibrionaceae* representative as pathogens of penaeid shrimps. En Calderón, J. V., Sorgeloos, P. (ed.). *Memorias del segundo congreso Ecuatoriano de acuicultura.* 189-192.
- BARKATE, J. A. 1972. Preliminary studies of some shrimp diseases. *Proc.Wld Mariculture. Soc.*, 3, 337-344., citado por Brock, J. A. and Lightner, D. V. Diseases caused by microorganisms. En: Kinne, O. (ed.) *Diseases of marine animals.*, 3, 296-326.
- BARNIOL R., 1995. Pasado, presente y futuro de los laboratorios de larvas de camarón en Ecuador. En *Acuicultura del Ecuador* N° 7 Marzo-Abril 1995. Camara Nacional de Acuicultura. 64-65.
- BATICADOS, M. C. L. 1988. Diseases of prawns in the Philippines. *SEAFDEC Asian Aquacult.*, 10, (1), 1-8.
- BELL T. A., LIGHTNER D. V. 1991. Chemoterapy in Acuaculture today curret practices in sphimp culture avabile treatments and their efficacy. Chemoterpy in Acuiculture: from theory to reality. Simposium, Paris, 12-15 March 1991. 45-57.
- BRISOU, J., TYSSET, C., RAULTIN DE LA ROY, & CURCIER, R. 1965. Marine bacteria especially Micrococcaceae. *J. gen. Microbiol.*, 41, 23.

- COLWELL, R.R., HUQ, A., CHOWDHURY, M. A., BRAYTON, P. R., & XU, B. 1995. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. 41: 946-950.
- CRIADO-FORNELIO A., CHARGOT D., CONSTANTIN E., MIALHE E., & GRIZEL H., 1988. An outbreak of *Vibrio* - caused disease in hatchery reared *Penaeus vannamei* larvae 3rd International Colloq. Pathol. Marine Aquaculture. 2-6 October 1988. Gloucester Point, VA U.S.A. 19-20.
- DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS 1991. Los laboratorios de larvas de camarón en el Ecuador. En larvicultura en el Ecuador. Guía ecuatoriana de los laboratorios de larvas de camarón, 1993. 65-66.
- DIFCO MANUAL. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth edition. DIFCO Laboratories. Detroit Michigan USA.
- DONOSO, E. 1996. Producción de anticuerpos monoclonales y desarrollo de inmunoensayos para la identificación de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 123 p.
- ERLICH, H., 1989. PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Basic methodology: 1-6.
- FRERICHS, G. N. & MILLAR, S. D. 1993. Manual for the isolation & identification of fish bacterial pathogens. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland. 12-52.
- GARCÍA, D., M. FAGGART, L. RHOADES & ALCIVAR-WARREN, 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three genetic techniques. USA. Genetic: 3(5), 270-280.
- GUOXING, Z. 1986. Identification and pathogenicity of *Vibrio cholera* (non-01)



- isolated from diseased penaeid shrimp. (In Chinese). *J. Fish. China*, **10**, 195-203.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H., STALEY, J. T., & WILLIAMS, S. T. 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. USA. Ninth edition.
- KRANTZ, G. E., COLWELL, R. R. & LOVELACE, E. 1969. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab, *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. *Science, N.Y.*, **164**, 1286-1287.
- LEWIS, D. H. 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio* sp. *Proc. Wld. Maricult. Soc.*, **4**, 333-338.
- LIGHTNER, D. V. 1977. Virus disease of shrimps. In C. J. Sindermann (Ed.), *Disease, Diagnosis and control in North American Marine Acuaquulture*. Elsevier, New York. 10-77.
- LIGHTNER, D. V. 1983. Diseases of cultured penaid shrimp. In J. R. Moore (Ed.-in-Chief), *CRC Handbook of Mariculture*, Vol. I. J. P. Mc.Vey (Ed.), *Crustacean Aquaculture*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 289-320.
- LIGHTNER, D. V. 1985. A review of the diseases of cultured penaid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. In Y. Taki, J. H. Primavera and J. A. Llobrera (Eds), *Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/ shrimps*. Aquaculture Dept., SEAFDEC, Iliolo, Philippines. 79-103.
- LIGHTNER, D. V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. In C. J. Sindermann and D.V. Lightner (Eds), *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*, 2nd ed. Elsevier, New York. 8-127.
- LIGHTNER, D. V. 1993. Shrimp pathology: Major diseases of concern to the farming industry in the Americas. En Calderón, J. V., Sandoval, V. C.(ed.). *Memorias del*

- primer congreso Ecuatoriano de acuicultura. 177-195
- LIGHTNER, D. V. & LEWIS, D. H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev.*, **37** (5-6), 25-28.
- MARTINEZ J., - PICADO, ANICET R. & JOFRE, J. 1994. Rapid Detection and Identification of *Vibrio anguillarum* by Using a Specific Oligonucleotide probe Complementari to 16S rRNA. *Applied and Enviromental Microbiology*, Feb. 732-737.
- MICHELI, M.R., R. BOVA, P. CALISSANO & E. D' AMBROSIO, 1993. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers. *BioTechniques* **15**: 388-390.
- MORALES I., 1992. Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *P. vannamei* en Ecuador. Memorias del primer congreso Ecuatoriano de Acuicultura 18-23 de Octubre de 1992. Guayaquil-Ecuador. 203-207.
- ROSEMARK, R. & FISHER, W. S. 1988. Vibriosis of lobsters. In C. J. Sindermann and D. V. Lightner (Eds). *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*, 2nd ed. Elsevier, New York. 240-242.
- SANDERS, E. & FRYER, J. L. 1991. Bacteria of fish. en Austin, B (Ed.). *Methods in aquatic bacteriology*. **5**, 115-123.
- SAN MIGUEL, L. 1996. Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio *in vivo* de la interacción con una bacteria patógena. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 123 p.
- SERRANO, J. 1996. Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para el control de infecciones por *Vibrio harveyi* (Cepa E22). Mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus* (Cepa ILI).

- SOLIS, A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 65 p.
- VANDERZANT, C., MROZ, E. & NICKELSON, R. (1970a). Microbial flora of Gulf of Mexico and pond shrimp. *J. Milk Fd Technol.*, **33**, 346-350.
- VANDERZANT, C., NICKELSON, R. & PARKER, J. C. (1970b). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from gulf coast shrimp. *J. Milk Fd Technol.*, **33**, 161-162.
- WILLIAMS, J.G.K., M.K. HANAFEY, J.A. RAFALSKY & S.V. TINGEY, 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* **218**: 704-740.
- WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI & S.V. TINGEY, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

ANEXOS

ANEXO I

Tablas de control diario de los tanques muestreados.

Tanque # 20

Dia	Est.	Larva viva	Lrv. Mrt.	%	Conteo		TEMPERATURA °C				Rec. de Agua	Aq. Cal/ml	PRIPAK (g/10l)				ARTEMIA				Malla	Act.	Alim.	Bact.	Necr.	Hor.	Tratamiento (ppm)	Observaciones	
					Mrt.	Total	29.5	29.5	30.0	29.0			1	2	3	AM	PM	PM	AM										
1	N5	-	-	-	-	1,400,000	29.5	29.5	30.0	29.0	5	40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	0.2F+3EDTA		
2	Z1	-	-	-	-	1,400,000	28.0	28.8	28.5	28.0	9	60,000	5*2	-	-	-	-	-	-	-	5.0	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
3	Z1	270	-	-	-	1,518,000	28.0	28.5	28.0	28.0	14	70,000	7*2	-	-	-	-	-	-	-	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
4	Z2	228	-	-	-	1,995,000	28.0	29.0	28.0	28.0	35%	80,000	7*4	-	-	-	-	-	-	-	200	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	Mortalidad 3%
5	Z2	190	-	-	-	1,662,000	28.0	29.0	28.8	28.0	35%	80,000	7*5	-	-	-	-	-	-	-	200	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	0.4 ppm ERI
6	Z2-3	175	-	-	-	1,535,000	28.0	28.5	28.0	28.0	35%	100,000	7*5	3.5*5	-	-	-	-	35	200	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	Bolas 0.6E-0.6F	
7	Z3-2	147	-	-	-	1,286,000	28.0	29.0	28.0	28.0	50%	100,000	5*5	3.5*5	-	-	-	-	35	200	4.5	4.5	4.0	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	1E+1F (ppm)	
8	Z/M	152	-	-	-	1,330,000	28.0	29.0	28.5	28.0	50%	100,000	3*5	4*5	-	-	-	-	35	300	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	Bolas en Z	
9	M	170	1	0.58	-	1,487,000	28.0	29.0	29.0	28.5	50%	50,000	-	7*5	-	-	-	-	70	300	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
10	M1-2	170	-	-	-	1,487,000	28.0	29.0	29.0	28.5	50%	50,000	-	7*5	-	-	-	-	70	300	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
11	M2-3	162	-	-	-	1,417,000	28.0	30.0	29.0	28.5	50%	50,000	-	5.5*5	1.5*5	-	-	-	70	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	1E+1F (ppm)	
12	M/P	92	-	-	-	804,000	28.0	30.0	29.0	28.5	80%	50,000	-	7*6	7*6	210	-	-	210	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	2E+2F (ppm)	
13	P1	112	-	-	-	980,000	29.0	30.0	29.0	29.0	80%	50,000	-	7*6	7*6	210	-	-	210	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	Hay M2-M3	
14	P2	115	-	-	-	1,006,000	29.0	30.0	29.5	29.0	80%	50,000	-	7*6	7*6	210	-	-	210	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	Sifoneo	
15	P3	100	-	-	-	875,000	28.5	30.0	29.5	29.0	80%	-	-	-	-	-	-	-	210	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
16	P4	90	-	-	-	788,000	28.5	30.0	29.5	29.0	80%	-	-	-	-	-	-	-	210	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
17	P5	97	-	-	-	848,000	28.5	29.0	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	210	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
18	P6	130	-	-	-	1,137,000	28.0	30.0	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	210	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA		
19	P7	110	-	-	-	963,000	28.0	28.5	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	210	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	2E+2F (ppm)	
20	P8	80	-	-	-	700,000	28.0	29.0	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	315	280	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	
21	P9	162	-	-	-	717,000	28.0	29.0	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	350	280	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	0.05T+3EDTA	
22	P10	65	-	-	-	568,000	28.0	29.5	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	280	210	280	500	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	7EDTA	2F (ppm)
23	P11	30	-	-	-	262,000	28.0	29.0	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	280	210	280	500	5.0	4.0	4.5	5.0	5.0	7EDTA	
24	P12	40	-	-	-	350,000	28.0	29.0	29.0	28.5	80%	-	-	-	-	-	-	-	280	210	280	500	5.0	4.5	5.0	5.0	5.0	7EDTA	

Tanque # 21

Dia	Est. Lrv.	Larva viva	Lrv. Mrt.	%	Conteo		TEMPERATURA °C				Rec. de Agua	Alg. Cel/ml.	FILIPPAK (gr/30)			ASTELIA				Malla	Act.	Alim.	Bact.	Necr.	Hon.	Tratamiento. (ppm)	Observaciones	
					Total		29.5	30.0	29.5	30.0			1	2	3	AM	PM	PM	AM									
1	N5	-	-	-	1,550,000		29.5	30.0	29.5	30.0	5	40,000							-	5.0						0.2F+3EDTA		
2	N/Z	-	-	-	1,550,000		29.0	28.6	28.0	28.0	9	60,000	5*2						-	5.0	4.5	4.0	5.0	5.0		0.05T+3EDTA	Deformidad 5%	
3	Z1	-	-	-	1,550,000		28.5	28.2	28.5	28.0	14	70,000	7*2						-	5.0	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+3EDTA		
4	Z1-2	210	-	-	1,837,000		28.0	29.0	28.5	28.0	35%	80,000	7*4						200	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+3EDTA		
5	Z2	206	-	-	1,802,000		28.5	29.0	28.5	28.0	35%	80,000	7*4						200	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+3EDTA	Mortalidad 4%	
6	Z2	200	-	-	1,750,000		27.5	28.5	28.0	28.5	35%	80,000	7*5					35	200	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+3EDTA	0.4E (ppm)	
7	Z3	180	-	-	1,575,000		28.0	28.0	28.0	27.5	35%	100,000	5*5	3.5*5				35	200	4.5	4.5	3.5	5.0	5.0		0.05T+3EDTA	Bolas 0.6E+0.8F (ppm)	
8	Z3	239	-	-	2,091,000		27.0	28.0	28.0	28.0	35%	100,000	3*5	3.5*5				35	300	4.5	4.0	3.5	5.0	5.0		0.05T+3EDTA	Bolas 1E+1F (ppm)	
9	Z/M	105	-	-	918,000		28.0	29.0	28.5	28.0	50%	100,000	3*5	4*5				35	300	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+5EDTA		
10	M1	119	1	0.83	1,041,000		28.0	29.0	29.0	28.5	50%	50,000		7*5				70	300	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+5EDTA		
11	M1-2	155	-	-	1,356,000		28.0	29.5	29.0	28.5	50%	50,000		7*5				70	300	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+5EDTA		
12	M2-3	145	-	-	1,268,000		28.0	30.0	29.0	28.5	50%	50,000		5.5*5				70	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+5EDTA		
13	M/P	189	-	-	1,653,000		28.0	30.0	29.0	28.5	80%	50,000		7*6	105			70	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+5EDTA	1E+1F (ppm)	
14	P1	136	-	-	1,190,000		28.0	30.0	29.0	29.0	80%	50,000		7*6	210			210	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA	2E+2F (ppm) Hay M	
15	P2	140	-	-	1,225,000		29.0	30.0	29.5	29.0	80%			7*6	210			210	400	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA	Sifoneo. Hay M2-3	
16	P3	180	-	-	1,675,000		28.5	30.0	29.5	29.0	80%			7*6	210			210	500	4.5	4.5	4.0	5.0	5.0		0.05T+7EDTA		
17	P4	100	-	-	875,000		28.5	30.0	29.5	29.0	80%			7*6	210			210	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA		
18	P5	91	-	-	796,000		28.5	30.0	29.0	28.5	80%			10*6	210			210	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA		
19	P6	134	-	-	1,172,000		28.0	30.0	29.0	28.5	80%			10*6	280			280	500	4.5	4.0	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA	2E+2F (ppm)	
20	P7	126	-	-	1,103,000		28.0	28.5	29.0	28.5	80%			14*6	315			280	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA		
21	P8	140	-	-	1,227,000		28.0	28.5	29.0	28.5	80%			14*6	350			280	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA		
22	P9	33	-	-	280,000		28.0	28.5	29.0	28.5	80%			14*6	280			210	280	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		0.05T+7EDTA	
23	P10	150	-	-	1,312,000		28.0	28.5	29.0	28.5	80%			14*6	280			210	280	500	4.5	4.5	4.5	5.0	5.0		7EDTA	2F (ppm)
24	P11	30	-	-	262,000		28.0	29.0	29.0	28.5	80%			14*6	280			210	280	500	4.0	4.5	4.5	5.0	5.0		7EDTA	
25	P12	40	-	-	350,000		28.0	29.0	29.5	30.0	80%			14*6	280			210	280	500	5.0	4.5	4.5	5.0	5.0		7EDTA	

Tanque # 18

Día	Est.	Larva viva	Lrv. Mrt.	%	Conteo		TEMPERATURA			Rec. de Agua	Alg. Cel/ml.	FRIEPACK (5" Dia.)					ARTESAGA				Malla	Act.	Alim.	Bact.	Necr.	Hon.	Tratamiento.	Observaciones
					Total	Mrt.	°C	1	2			3	AM	PM	PM	AM												
1	N5	-	-	-	-	1,400,000	29.5	31.0	30.0	29.0	5	40,000								-	3.0	4.0	5.0	5.0			0.2F+3EDTA	
2	N/2	-	-	-	-	1,400,000	26.5	27.0	28.0	28.0	9	60,000	3.1*2							-	3.0	4.0	5.0	5.0			0.05T+3EDTA	
3	Z1	216	-	-	-	1,215,000	26.5	27.0	27.0	27.5	14	70,000	7*2							-	5.0	4.5	4.5	5.0			0.05T+3EDTA	
4	Z1-2	140	-	-	-	1,225,000	26.5	27.0	27.0	27.0	35%	80,000	7*4							200	5.0	4.0	4.5	5.0			0.05T+3EDTA	
5	Z2	130	-	-	-	1,137,000	26.5	27.0	28.0	27.5	35%	80,000	7*4							200	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+3EDTA	
6	Z2	200	-	-	-	1,500,000	27.0	26.0	28.0	27.5	50%	100,000	7*5							200	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+3EDTA	
7	Z2-3	160	-	-	-	1,400,000	27.0	28.0	28.0	27.5	50%	100,000	5.5*5	3.5*2						200	4.5	4.0	4.0	5.0			0.05T+3EDTA	
8	Z3	160	-	-	-	1,400,000	28.0	28.0	28.5	28.0	50%	100,000		7*5	70					200	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+3EDTA	0.4E+0.4F (ppm)
9	Z3	160	-	-	-	1,400,000	28.0	29.0	29.0	28.5	50%	100,000		7*5	35					200	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+3EDTA	0.6E+0.6F (ppm)
10	Z/M	149	-	-	-	1,303,000	28.0	28.5	29.0	28.5	80%	50,000		7*5	70					200	4.5	4.5	4.0	5.0			0.05T+5EDTA	1E+1F (ppm)
11	M1	120	-	-	-	1,050,000	28.0	29.5	28.5	28.5	80%	50,000		7*5	70					300	4.5	4.5	4.0	5.0			0.05T+5EDTA	
12	M1-2	164	-	-	-	1,435,000	28.5	30.0	29.5	28.0	80%	50,000		7*5	105					300	4.0	4.0	4.0	5.0			0.05T+5EDTA	
13	M2-3	89	2	2.2	778,000	28.5	30.0	29.5	29.0	80%	80%	50,000		7*5	105					300	4.0	4.0	4.0	5.0			0.05T+5EDTA	1E+1F (ppm)
14	M/P	81	2	2.4	708,000	28.5	30.0	29.5	29.0	80%	80%			5*6	70					400	4.0	4.0	4.0	5.0			0.05T+5EDTA	1E+1F (ppm)
15	P1	93	-	-	-	814,000	28.5	30.0	29.5	29.0	80%			7*6	90	50	50			400	4.0	4.5	4.0	5.0			0.05T+7EDTA	2E+2F (ppm)
16	P2	88	-	-	-	770,000	28.5	29.0	29.5	30.0	80%			7*6	150	100	150	100		500	4.5	4.5	4.0	5.0			0.05T+7EDTA	
17	P3	92	-	-	-	805,000	28.0	29.0	29.0	28.5	80%			7*6	200	150	200	150		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	
18	P4	89	-	-	-	779,000	28.0	30.0	29.0	28.5	80%			7*6	200	200	200	200		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	
19	P5	87	2	2.3	761,000	28.0	28.5	29.0	29.0	29.0	80%			10*6	200	200	200	200		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	
20	P6	92	-	-	-	805,000	28.5	29.0	29.0	28.5	80%			10*6	280	280	280	280		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	
21	P7	86	-	-	-	753,000	28.0	28.5	29.0	28.5	80%			14*6	315	280	315	280		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	7EDTA
22	P8	78	-	-	-	683,000	28.5	29.5	29.0	28.5	80%			14*6	315	280	315	280		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	
23	P9	76	-	-	-	665,000	28.0	29.0	28.5	28.5	80%			14*6	315	280	315	280		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	
24	P10	76	-	-	-	665,000	28.5	28.0	28.5	29.0	80%			14*6	315	280	315	280		500	4.5	4.5	4.5	5.0			0.05T+7EDTA	2F (ppm)

ANEXO II

Siembra de agua de tanque y de macerado de larvas en agar TCBS y AM.

Tanque # 20

Día	Estadio	Agua de tanque en agar TCBS				Agua de tanque en agar marino	
		V.T. (UFC/ml)	V.V. (UFC/ml)	V.A. (UFC/ml)	V.L. (UFC/ml)	B.T. (UFC/ml)	B.L. (UFC/ml)
1	N5	7000	2000	5000	-	23000	-
2	Z1	4500	1800	2700	-	11000	-
3	Z1	11000	4000	7000	-	19000	-
4	Z2	7000	3500	3500	100	26000	1000
5	Z2	4500	2500	2000	100	28000	1000
6	Z2-3	8000	4500	3500	500	37000	1000
7	Z3-2	13000	12700	300	4400	37000	5000
8	Z/M	4700	2400	2300	100	21000	2000
9	M1	2700	1600	1100	100	42000	1000
10	M1/2	13900	6700	7200	-	112000	1000
11	M2-3	4700	2500	2200	300	27000	2000
12	M/P	20500	7100	13400	1500	76000	3000
13	P1	18600	7400	11200	7200	123000	14000
14	P2	45200	20200	25000	2500	161000	8000
15	P3	86200	9200	77000	1600	166000	4000
16	P4	98000	8000	90000	-	183000	1000
17	P5	38000	14000	24000	200	101000	2000
18	P6	28100	2600	25500	200	160000	2000
19	P7	14000	400	13600	200	62000	1000
20	P8	59900	5300	54600	500	109000	3000
21	P9	60000	22000	38000	1300	117000	4000
22	P10	19000	6400	12600	700	97000	3000
23	P11	10600	1100	9500	-	64000	2000
24	P12	12200	1900	10300	300	38000	2000

Tanque # 21

Día	Estadio	Macerado		TCBS	Macerado en		Agar marino
		V.T. (UFC/I)	V.V. (UFC/I)		V.A. (UFC/I)	V.L. (UFC/I)	
1	N5	275	25	250	1	480	-
2	N/Z	260	60	200	-	490	-
3	Z1	920	320	600	1	1220	10
4	Z1-2	860	160	700	4	1440	10
5	Z2	410	170	240	40	820	80
6	Z2	666	320	346	160	1380	200
7	Z3	1060	980	80	300	2360	340
8	Z3	1420	780	640	260	3140	320
9	Z/M	320	282	38	136	2500	180
10	M1	5400	1350	4050	250	7150	350
11	M1-2	13550	5150	8400	500	17500	260
12	M2-3	4700	2100	2600	400	9350	550
13	M/P	2400	900	1500	150	5950	400
14	P1	4300	2300	2000	1300	12200	1600
15	P2	27500	9200	18300	-	39000	1000
16	P3	15100	800	14300	500	23900	700
17	P4	13900	3200	10700	1600	22100	2200
18	P5	14400	1800	12600	900	20400	900
19	P6	26100	6900	19200	1600	28800	2000
20	P7	8900	1100	7800	-	19400	-
21	P8	18200	6400	11800	-	21900	2000
22	P9	24500	10500	14000	2300	28700	2800
23	P10	10400	5200	5200	400	18700	700
24	P11	6000	900	5100	100	10900	800
25	P12	10800	2300	8500	300	19600	400

Tanque # 18

Día	Estado	Agua de tanque en agar TCBS				Agua de tanque en agar marino	
		V.T. (UFC/ml)	V.V. (UFC/ml)	V.A. (UFC/ml)	V.L. (UFC/ml)	B.T. (UFC/ml)	B.L. (UFC/ml)
1	N5	6000	2000	4000	-	46000	-
2	N/Z	200	-	200	-	11000	-
3	Z1	1200	150	1050	-	29000	-
4	Z1-2	300	100	200	-	35000	-
5	Z2	1300	150	1150	-	46000	-
6	Z2	8700	2700	6000	-	52000	-
7	Z2-3	3200	1050	2150	-	57000	-
8	Z3	21500	12000	9500	-	56000	-
9	Z3	13300	2500	10800	-	68000	-
10	Z/M	21000	8000	13000	-	82000	-
11	M1	32000	14000	18000	-	89000	-
12	M1-2	48000	18000	30000	-	93000	-
13	M2-3	26500	7700	18800	100	101000	1000
14	M/P	35000	34000	1000	100	61000	1000
15	P1	36000	35000	1000	200	86000	1000
16	P2	24400	1500	22900	200	124000	1000
17	P3	52300	12800	39500	-	116000	1000
18	P4	53500	13000	40500	2000	103000	3000
19	P5	59000	3000	56000	-	159000	-
20	P6	5100	-	5100	-	72000	-
21	P7	30500	30000	500	400	103000	5000
22	P8	7300	1000	6300	500	68000	2000
23	P9	45100	3100	42000	2200	147000	6000
24	P10	21300	7700	13600	5000	119000	6000

ANEXO III

Características morfológicas y luminiscencia en agar TCBS y AM de los aislados bacterianos.

Código	Estadío	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
1	N5	18	Larvas	TCBS	Verde claro, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
2	N5	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
3	N5	18	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, redonda, grande, convexa.	-
4	N5	18	Larvas	AM	No Crecio (N.C.)	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
5	N5	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
6	N/Z	18	Larvas	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
7	N/Z	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
8	N/Z	18	Larvas	TCBS	Verde claro, pequeña, redonda, convexa.	Blanco-crema, redonda, mediana, convexa.	-
9	N/Z	18	Larvas	AM	N.C.	Blanca, pequeña, redonda.	-
10	N/Z	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco, mediana, redonda, convexa.	-
11	Z1	18	Agua	TCBS	Verde de centro oscuro, grande, red, conv.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
12	Z1	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
13	Z1	18	Agua	AM	N.C.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
14	Z1	18	Larvas	AM	N.C.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
15	Z1	18	Larvas	TCBS	Verde de centro oscuro, grande, red, conv.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
16	Z1	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
17	Z1	18	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanco-traslúcido, crece en spreader.	-
18	Z1-2	18	Larvas	AM	N.C.	Crema, pequeña, redonda, convexa.	-
19	Z1-2	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco-traslúcido, crece en spreader.	-

Código	Estadid	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
20	Z1-2	18	Larvas	AM	N.C.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
21	Z1-2	18	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
22	Z1-2	18	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
23	Z2	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
24	Z2	18	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc, red, gmd, conv.	Blanca, pequeña-diminuta, redonda, convexa.	-
25	Z2	18	Larvas	TCBS	Verde, claro, traslucido, red, med, conv.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
26	Z2	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
27	Z2	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco opaco, crece en spreader.	-
28	Z2	18	Agua	AM	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, pequeña-diminuta, redonda, convexa.	-
29	Z2	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda,convexa.	-
30	Z2	18	Larvas	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
31	Z2	18	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc,red, med, conv.	Blanca-cremosa, mediana, redonda, conv.	-
32	Z2	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, conv.	Blanca, crece en spreader.	-
33	Z2	18	Agua	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, conv.	Crema, pequeña, redonda, convexa.	-
34	Z2	18	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanco-traslucido, crece en spreader.	-
35	Z2	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
36	Z2-3	18	Agua	AM	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
37	Z2-3	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
38	Z2-3	18	Larvas	TCBS	Verde claro, pequeña, redonda, convexa	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
						Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
39	Z2-3	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
40	Z3	18	Larvas	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
41	Z3	18	Agua	AM	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanco-crema, redonda, mediana, convexa.	-
42	Z3	18	Larvas	TCBS	Amarilla, redonda, mediana, convexa.	Blanco-crema, redonda, mediana, convexa.	-
43	Z3	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco-crema, redonda, mediana, convexa.	-
44	Z3	18	Larvas	AM	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, redonda, mediana, convexa	-
45	Z3	18	Larvas	AM	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanco-crema, mediana, redonda, convexa.	-
46	Z3	18	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
47	Z3	18	Larvas	AM	N.C.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
48	Z3	18	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, grande, redonda, convexa.	-
49	Z3	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
50	Z3	18	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
51	M1-2	18	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
52	M1-2	18	Larvas	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanco-crema, redonda, mediana, convexa.	-
53	M1-2	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
54	M1-2	18	Agua	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
55	M1-2	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
56	M1-2	18	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
57	M2-3	18	Larvas	AM	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
58	M2-3	18	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
59	M2-3	18	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Traslúcida, crece en spreader.	-
60	M2-3	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Traslúcida, crece en spreader.	-
61	M2-3	18	Larvas	AM	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanco-crema, redonda, mediana, convexa.	-
62	M2-3	18	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanco traslúcido, crece en spreader.	-
63	M/P	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
64	M/P	18	Agua	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
65	M/P	18	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
66	M/P	18	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
67	M/P	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
68	P1	18	Larvas	TCBS	Verde claro, grande, redonda, convexa.	Blanca, redonda, pequeña, convexa.	+
69	P1	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
70	P1	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco-crema, mediana, redonda, convexa.	-
71	P1	18	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
72	P1	18	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc, red, med, conv.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
73	P1	18	Agua	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanco-crema, redonda mediana, convexa.	-
74	P2	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
75	P2	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
76	P2	18	Agua	TCBS	Verde claro redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
77	P2	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
78	P2	18	Larvas	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
79	P2	18	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
80	P3	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Traslúcido, pequeña, redonda, convexa.	-
81	P3	18	Larvas	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
82	P3	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
83	P3	18	Larvas	AM	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Crema, grande, redonda, convexa.	-
84	P3	18	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
85	P4	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
86	P4	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
87	P4	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
88	P4	18	Larvas	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
89	P4	18	Agua	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
90	P5	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
91	P5	18	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc, red, md, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
92	P5	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
93	P5	18	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
94	P5	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
95	P6	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
77	P2	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
78	P2	18	Larvas	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
79	P2	18	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
80	P3	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Traslúcido, pequeña, redonda, convexa.	-
81	P3	18	Larvas	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
82	P3	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
83	P3	18	Larvas	AM	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Crema, grande, redonda, convexa.	-
84	P3	18	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
85	P4	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
86	P4	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
87	P4	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
88	P4	18	Larvas	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
89	P4	18	Agua	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
90	P5	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
91	P5	18	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc, red, md, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
92	P5	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
93	P5	18	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
94	P5	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
95	P6	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
96	P6	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
97	P6	18	Larvas	AM	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
98	P6	18	Larvas	AM	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
99	P6	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
100	P7	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, grande, redonda, convexa.	-
101	P7	18	Larvas	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
102	P7	18	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc, grde, red, conv	Crema, grande, redonda, convexa.	-
103	P7	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
104	P8	18	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc, med, red, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
105	P8	18	Larvas	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
106	P8	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca traslúcida, crece en spreader.	-
107	P8	18	Agua	AM	N.C.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
108	P9	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
109	P9	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
110	P9	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
111	P9	18	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, grande, redonda, convexa.	-
112	P9	18	Agua	AM	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
113	P9	18	Larvas	AM	Verde claro redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
114	P10	18	Agua	TCBS	Verde claro de cento osc., red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-

Código	Estadío	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
115	P10	18	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
116	P10	18	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
117	P10	18	Larvas	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
118	P10	18	Agua	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
119	P10	18	Larvas	AM	N.C.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
120	P10	18	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
121	N5	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
122	N5	21	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
123	N5	21	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
124	N/Z	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
125	N/Z	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
126	N/Z	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
127	Z1	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
128	Z1	21	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
129	Z1	21	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
130	Z1-2	21	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
131	Z1-2	21	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
132	Z1-2	21	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
133	Z1-2	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco-crema, mediana, redonda, convexa.	-

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
134	Z1-2	21	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
135	Z1-2	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
136	Z2	21	Agua	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
137	Z2	21	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
138	Z2	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
139	Z2	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
140	Z2	21	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
141	Z2	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
142	Z2	21	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanco-crema, pequeña, redonda, convexa.	+
143	Z2	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
144	Z2	21	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
145	Z2	21	Larvas	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
146	Z2	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
147	Z3	21	Agua	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
148	Z3	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
149	Z3	21	Agua	TCBS	Verde claro, grande, redonda, convexa.	Blanca-brillante, pequeña, redonda, conv.	+
150	Z3	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca-brillante, pequeña, redonda, conv.	+
151	Z3	21	Larvas	TCBS	Verde claro, pequeña, redonda, convexa.	Anaranjado (melon), mediana, red., conv.	-
152	Z3	21	Larvas	AM	N.C.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-

Código	Estado	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
153	Z3	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
154	Z3	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Traslúcido, crece en spreader.	-
155	Z3	21	Agua	AM	Anaranjada, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
156	Z3-2	20	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Traslúcido, crece en spreader.	-
157	Z3-2	20	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda.	-
158	Z3	21	Larvas	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Traslúcido, crece en spreader (rizoide).	-
159	Z3-2	20	Larvas	TCBS	Verde, grande, redonda, convexa.	Blanco-crema, mediana, redonda, convexa.	+
160	Z3-2	20	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
161	Z3-2	20	Agua	TCBS	Verde, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
162	Z3-2	20	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
163	Z3-2	20	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
164	Z3	21	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, grande, redonda, convexa.	-
165	Z/M	20	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
166	Z/M	20	Agua	AM	N.C.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
167	Z/M	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
168	Z/M	20	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco-crema, mediana, redonda, convexa.	-
169	Z/M	20	Larvas	TCBS	Verde, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
170	Z/M	20	Larvas	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Mostaza, pequeña, redonda, convexa.	-
171	Z/M	21	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanco-crema, crece en spreader.	-

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
172	M1	20	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
173	M1	20	Larvas	AM	Anaranjada, pequeña, redonda, convexa.	Anaranjada, pequeña, redonda, convexa.	-
174	M1	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco-crema, pequeña, redonda, convexa.	-
175	M1	21	Larvas	TCBS	Amarilla, diminuta, redonda, convexa.	Blanco-crema, mediana, redonda, convexa.	-
176	M1	21	Larvas	TCBS	Amarillo claro, mediana, redonda, conv.	Blanco-crema, pequeña, redonda, convexa.	-
177	M1-2	20	Agua	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
178	M1-2	20	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
179	M1-2	20	Agua	AM	N.C.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
180	M2-3	20	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Crema, pequeña, redonda, convexa.	-
181	M2-3	20	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
182	M2-3	21	Larvas	TCBS	Verde de bordes claros, red, med, conv.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
183	M2-3	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa	Crema, crece en spreader.	-
184	M/P	20	Agua	AM	Verde claro, redonda, pequeña, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
185	M/P	20	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda,convexa.	Crema, pequeña, redonda,convexa.	-
186	M/P	21	Agua	TCBS	Verde, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
187	M/P	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, grande, redonda, convexa.	-
188	M/P	21	Agua	TCBS	Verde, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
189	M/P	20	Agua	AM	Verde oscuro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
190	M/P	20	Agua	TCBS	Verde, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
191	M/P	21	Larvas	TCBS	Verde, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	+
192	M/P	20	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader tipo mosaico.	-
193	P1	21	Agua	TCBS	Verde, redonda, mediana, convexa.	Crema, pequeña, redonda, convexa.	+
194	P2	21	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
195	P2	20	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
196	P2	21	Agua	AM	N.C.	Crema, pequeña, redonda, convexa.	-
197	P2	21	Agua	AM	Verde, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
198	P3	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
199	P3	20	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
200	P3	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, grande, redonda, plana.	-
201	P3	20	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
202	P4	20	Agua	TCBS	Verde oscuro, grande, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
203	P4	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
204	P4	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
205	P4	20	Agua	TCBS	Verde oscuro, grande, redonda, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
206	P4	20	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
207	P4	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
208	P4	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
209	P4	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
210	P5	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	+
211	P5	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
212	P5	21	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Crema, pequeña, redonda, convexa.	-
213	P5	20	Larvas	TCBS	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
214	P5	20	Agua	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
215	P5	20	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda.	-
216	P5	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
217	P5	21	Agua	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, grande, traslúcida, plana.	-
218	P5	20	Agua	AM	Amarilla, pequeña, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
219	P6	21	Agua	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
220	P6	21	Larvas	TCBS	Verde claro, pequeña, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
221	P6	21	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
222	P6	20	Larvas	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
223	P6	20	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
224	P6	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
225	P6	20	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
226	P6	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanco opaco, grande, plana.	-
227	P6	20	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
228	P7	21	Larvas	AM	Verde claro, redonda, pequeña, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-

Código	Estadio	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
229	P7	20	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca traslúcida, grande con centro oscuro.	-
230	P7	20	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
231	P7	20	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
232	P7	21	Agua	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
233	P7	20	Agua	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
234	P8	20	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., red, med, conv.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
235	P8	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
236	P8	20	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
237	P8	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
238	P8	21	Larvas	AM	Verde, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
239	P9	20	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
240	P9	21	Larvas	AM	Verde, redonda, mediana, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
241	P9	20	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
242	P9	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
243	P9	20	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
244	P9	20	Larvas	AM	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
245	P10	21	Agua	AM	Amarilla, grande, redonda, convexa.	Blanca, plana, mediana, crece en spreader.	-
246	P10	20	Larvas	TCBS	Verde claro de centro osc., grnd. red, conv.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-
247	P10	21	Agua	TCBS	Verde claro de centro Osc., red, med, conv.	Crema, mediana, redonda, convexa.	-

Código	Estado	Tanque	Muestra	Tipo agar	Características de colonias en agar TCBS	Características de colonias en agar marino	Luminosidad
248	P10	20	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
249	P10	20	Agua	AM	N.C.	Anaranjada, pequeña, redonda, convexa.	-
250	P10	21	Larvas	TCBS	Verde claro, mediana, redonda, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
251	P10	21	Larvas	AM	N.C.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
252	P11	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, mediana, redonda, convexa.	+
253	P11	20	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, pequeña, redonda, convexa.	-
254	P11	21	Larvas	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, mediana, redonda, convexa.	-
255	P11	21	Larvas	AM	N.C.	Crema, pequeña, redonda, convexa.	-
256	P11	20	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	+
257	P11	20	Agua	TCBS	Verde claro, grande, redonda, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	+
258	P12	21	Agua	TCBS	Amarilla, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
259	P12	20	Larvas	TCBS	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Blanca, crece en spreader.	-
260	P12	20	Agua	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	+
261	P12	21	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
262	P12	21	Agua	AM	Amarilla, mediana, redonda, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
263	P12	21	Agua	AM	Verde claro, pequeña, redonda, convexa.	Blanca, redonda, mediana, convexa.	-
264	P12	20	Larvas	TCBS	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Crema, redonda, mediana, convexa.	-
265	P12	20	Larvas	AM	Verde claro, redonda, mediana, convexa.	Blanco traslúcido, redonda, mediana, plana.	-
266	P12	20	Larvas	AM	Verde, claro, redonda, pequeña, convexa.	Blanco-crema, redonda, mediana, convexa.	-

ANEXO IV

Resultados de los análisis bioquímicos realizados a los aislados bacterianos.

Código	Gram	Forma	Mot.	OxI.	CAT.	10% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
1	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
2	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	V. vul.	89
3	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	V. dam.	91
4	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V. cam.	100
5	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	V. pel.	84
6	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	V. pel.	89
7	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
8	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	V. tub.	90
9	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	V. ner.	86
10	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	V. pel.	90
11	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
12	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl I	95
13	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. har.	100
14	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl I	95
15	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. har.	88
16	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	V. tub.	90
17	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	V. pel.	90
18	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
19	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	V. cam.	88

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
20	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
21	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
22	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
23	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
24	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. vul.	89
25	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
26	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	V. cam.	88
27	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
28	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
29	-	Bac.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. fur.	90
30	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. vul.	95
31	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
32	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
33	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	90
34	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	V. spl l	90
35	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. pel.	100
36	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	95
37	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
38	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	V. fis.	90

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
39	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl I	95
40	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. fis.	95
41	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	V. fis.	100
42	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
43	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. spl II	90
44	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	94
45	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. pel.	95
46	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	90
47	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V. spl II	95
48	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	V. vul.	89
49	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
50	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. ang.	95
51	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
52	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. vul.	95
53	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
54	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
55	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
56	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. ang.	95
57	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF.	O.	OF.	F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
58	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. tub.	95
59	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	V. cam.	88
60	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	V. cam.	88
61	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V. alg.	82
62	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	V. spl II	95
63	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. spl I	95
64	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. vul.	89
65	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	94
66	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	90
67	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
68	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. har.	88
69	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. vul.	89
70	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
71	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	V. dam	91
72	-	Bac.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	Aerom.	90
73	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	89
74	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. vul.	89
75	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. har.	94
76	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
77	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	V. spl I	90
78	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
79	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
80	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
81	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. har.	94
82	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	V. tub.	90
83	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
84	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	V. alg.	77
85	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	V. spl I	95
86	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
87	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	V. pel.	95
88	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	V. spl II	95
89	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
90	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
91	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. tub.	95
92	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
93	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
94	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. fis.	95
95	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
96	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl I	90
97	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
98	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V. ang.	95
99	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
100	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
101	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
102	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. tub.	90
103	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V. har	94
104	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
105	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
106	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	V. ang.	85
107	-	Bac.	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	V. hol.	79
108	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	V. tub.	90
109	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	95
110	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
111	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V. cam.	94
112	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. vul.	84
113	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
114	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	V. har.	94

Código	Gram	Forma	Mot.	Oxl.	CAT.	0% S.	OF.	O.	OF.	F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
115	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. ang.	95
116	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. har.	94
117	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	95
118	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
119	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	V. cam.	94
120	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	V. ang.	90
121	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. log.	95
122	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
123	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	95
124	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. har.	88
125	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
126	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	90
127	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
128	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	90
129	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. har.	90
130	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. vul.	94
131	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. vul.	94
132	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. vul.	94
133	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. har.	88

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
134	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	V. spl II	90
135	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. har.	94
136	-	Bac.	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. log.	79
137	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	V. tub.	90
138	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
139	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
140	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	V. vul.	89
141	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
142	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V. flu.	94
143	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V. flu.	89
144	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V. flu.	89
145	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
146	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	95
147	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
148	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	V. cam.	88
149	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
150	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
151	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. har.	88
152	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	V. ner.	91

Código	Gram	Forma	Mot.	Oxi.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
153	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	V. pel.	95
154	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	V. dam.	91
155	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	V. ner.	86
156	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	V. tub.	95
157	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	V. pel.	90
158	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	V. ang.	85
159	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
160	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	V. tub.	90
161	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	V. vul.	89
162	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
163	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl l	90
164	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
165	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. log.	89
166	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Pseu.	100
167	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	V. tub.	90
168	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl l	95
169	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	V. par.	90
170	-	Bac.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	Pseu.	83
171	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	90

Código	Gram	Forma	Mot.	Oxl.	Cat.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
172	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
173	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. vul.	89
174	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. har.	94
175	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. har.	88
176	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl	95
177	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
178	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	94
179	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	V. alg.	88
180	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
181	-	Bac.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. fur.	90
182	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. par.	90
183	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V. tub.	95
184	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. par.	90
185	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	V. pel.	90
186	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. fis.	95
187	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	V. ang.	85
188	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	90
189	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. fis.	90
190	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. par.	90

[illegible]

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
210	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	89
211	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. vul.	89
212	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	90
213	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	90
214	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
215	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V. flu.	100
216	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	V. tub.	90
217	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	V. ner.	86
218	-	Bac.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	Aerom.	95
219	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	90
220	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	V. cam.	95
221	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	94
222	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. ang.	85
223	-	Bac.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. cho.	79
224	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V. tub.	90
225	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	V. alg.	88
226	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	V. cam.	88
227	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	V. spl I	90
228	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. log.	95

Código	Gram	Forma	Mot.	OXI.	CAT.	0% S.	OF. O.	OF. F.	IND.	V.P.	CIT.	ORN.	ARG.	ARA.	CEL.	MNS.	MNT.	SUC.	GLUC.	GLU.	GAL.	T. Bact.	% C.
229	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	V. cam.	94
230	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	89
231	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	100
232	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
233	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. tub.	95
234	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	94
235	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	94
236	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. tub.	95
237	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	V. cam.	88
238	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	V. vul.	94
239	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	V. tub.	95
240	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	V. cam.	88
241	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. par.	90
242	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	90
243	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V. vul.	100
244	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	V. tub.	95
245	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	V. ang.	85
246	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V. ang.	90
247	-	Bac.	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V. fis.	95

[illegible]

ANEXO V

Criterios utilizados para la identificación bioquímica.

	Pseu.	Aero.	Photo.	V. alg	V. ang	V. can	V. cho	V. dam	V. fls	V. flu	V. fur	V. har	V. hol	V. log	V. mar	V. nar	V. par	V. pel	V. pen.	V. spl I	V. spl II	V. tub	V. vul
1 Crecimiento 0% CNA	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 OF(oxidativo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 OF (fermentativo)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 Produccion de indol	-	d	(+)	+	+	-	+	-	-	(-)	(-)	+	+	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+
5 Voges-Proskauer	d	d	+	+	+	d	d	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6 Citrato-Simmons	d	d	-	+	+	d	+	-	d	+	+	-	-	-	-	+	-	+	d	+	+	+	d
7 Ornitina descarboxilasa	d	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	d
8 Arginina dihidrolasa	d	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	d
ASIMILACION DE:																							
9 L-Arabinosa	d	d	-	-	+	-	-	-	-	+	+	d	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
10 Celobiosa	d	d	-	-	+	d	-	-	+	d	-	+	-	+	-	-	-	-	+	d	-	+	+
11 D-Manosa	d	d	+	d	+	d	d	+	+	+	d	+	+	d	-	-	+	d	+	+	-	+	+
12 D-Manitol	d	d	-	+	+	d	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	d
13 Sucrosa	d	d	d	+	+	-	+	-	-	+	+	d	-	+	-	+	-	d	-	d	-	+	-
14 D-Glucuronato			d	-	-	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	d	-	-	+	-	+	+
15 D-Gluconato			d	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	+	+
16 D-Galactosa			+	+	d	-	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

+ (90% o más positivo)

- (90% o menos negativo)

d (11-89% positivo)

(+) 76-89% positivo

(-) 11-25% negativo

ANEXO VI

Criterios bioquímicos que permiten la diferenciación de géneros y especies bacterianas.

	Aeromonas	Photobacterium	Vibrio			
Pseu.	3	1,3	1,3			
Aero.		1	1			
Photo.			7,8,11,12			
	V. alginolyticus	V. anguillarum	V. campbelli	V. cholera	V. damsela	V. fischeri
V. ang.	6,8,9,10					
V. cam.	13,15	4,8,9,13,15				
V. cho.	1,6,15	1,7,8,9,10,15	1,4,7,13,16			
V. dam.	8,12,13,15	4,6,9,10,12,13,15	8,16	1,4,6,7,8,12,13		
V. fis.	5,10,13,15	4,5,8,9,13,15	16	1,4,7,10,13	5,8,10,12	
V. flu.	5,6,8,9	5	8,9,13,15,16	1,7,8,9,15	5,6,9,12,13,15	8,9,13,15
V. fur.	1,5,6,8,9	1,5,10	1,8,9,13,15,16	7,8,9,15	1,5,6,9,12,13,15	1,8,9,10,13,15
V. har.	10,14	6,8,14	4,14,15	1,6,7,10,14,15	4,8,10,12,14,15	4,14,15
V. hol.	5,9,12,13	5,6,8,10,12,13	4,9,16	1,6,7,9,12,13	4,5,8,9	4,9,10,12
V. log.	5,10,13	5,6,8,9,13	15,16	1,6,7,10,13,15	5,8,10,12,15	15
V. mar.	5,12,13	4,5,6,8,9,10,11,12,13	15,16	1,4,6,7,12,13,15	5,8,11,15	10,11,12,15
V. ner.	5,6,8,12	4,5,9,10,11,12	8,13,15	1,4,7,8,12,15,16	5,6,11,13,15,16	8,10,11,12,13,15,16
V. par.	5,13	5,6,7,8,10,13	4,7,15,16	1,6,13,15	4,5,7,8,12,15	4,7,10,15
V. pel.	5,6	4,5,8,9,10	15,16	1,4,7,15	5,6,8,12,15	10,15
V. pen.	5,10,12,13	5,8,9,12,13	lisina	1,7,10,12,13,16	8,10,16	12,16
V. sple. I	5,6,8,10,14	5,9,14	4,8,14,16	1,7,8,10,14	4,5,6,10,12,14	4,8,14
V. sple. II	5,6,13,15	8,9,11,13,15	4	1,7,13,16	4,5,6,8,11,12,16	4,11,16
V. tub.	5,6,10	5,9	13,15,16	1,7,10,15	5,6,10,12,13,15	13,15
V. vul.	5,10,13,14	5,8,9,13,14	4,14,15,16	1,10,13,14,15	4,5,8,10,14,15	4,14,15
	V. fluvialis	V. furnissi	V. harveyi	V. holtsiae	V. logei	V. marinus
V. fur.	1					
V. har.	6,8	1,6,8,10,14				
V. hol.	6,8,12,13	1,6,8,12,13	10,12			
V. log.	6,8,9,13	1,6,8,9,10,13	14	9,10,12		
V. mar.	6,8,9,11,12,13	1,6,8,9,12,13	4,10,11,12,14	4,9,11	10,12	
V. ner.	9,11,12,16	1,9,12,16	4,6,8,10,11,12,14	4,6,8,9,11,13,16	6,8,10,12,13,16	6,8,13,16
V. par.	6,7,8,13	1,6,7,8,13	7,10	7,12	7,10	4,7,11,12
V. pel.	8,9	1,8,9	4,6,10,14	4,6,9,12	6,10	6,12
V. pen.	8,9,12,13,16	1,8,9,10,12,13,16	12,14	2,9,10,16	12,16	10,11,16
V. sple. I	9	1,9,10,14	6,8	6,8,9,10,12	6,8,14	4,6,8,10,11,12,14
V. sple. II	8,9,11,13,15,16	1,8,9,13,15,16	6,11,14,15	6,9,11,12,16	6,15,16	4,6,10,12,15,16
V. tub.	9	1,9,10	6,14	6,9,10,12,13	6,13	6,10,11,12,13
V. vul.	8,9,13	1,8,9,10,13,14	mot	9,10	14	4,10,11,14
	V. nereis	V. parahaemolyticus	V. pelagicus	V. penaeicida	V. splendidus I	V. splendidus II
V. par.	4,6,7,8,11,12,13,16	-				
V. pel.	8,12,16	4,6,7				
V. pen.	8,10,11,13	7,10,12,16	10,12,16			
V. sple. I	4,10,11,12,14,16	6,7,8,10	4,8,10,14	8,12,14,16		
V. sple. II	4,8,12,13,15	6,7,11,15,16	4,15,16	11,12	8,11,14,16	
V. tub.	10,11,12,16	6,7,10,13	10	12,13,16	14	11,13,15,16
V. vul.	4,8,10,11,13,14,16	10	4,10,14	14,16	8	11,14,15,16
	V. tubiflashi					
V. vul.	13,14					

ANEXO VII

Patrones genéticos obtenidos a partir de los aislados bacterianos utilizando la AP-PCR.

Gel de electroforesis # 1

Foto 1

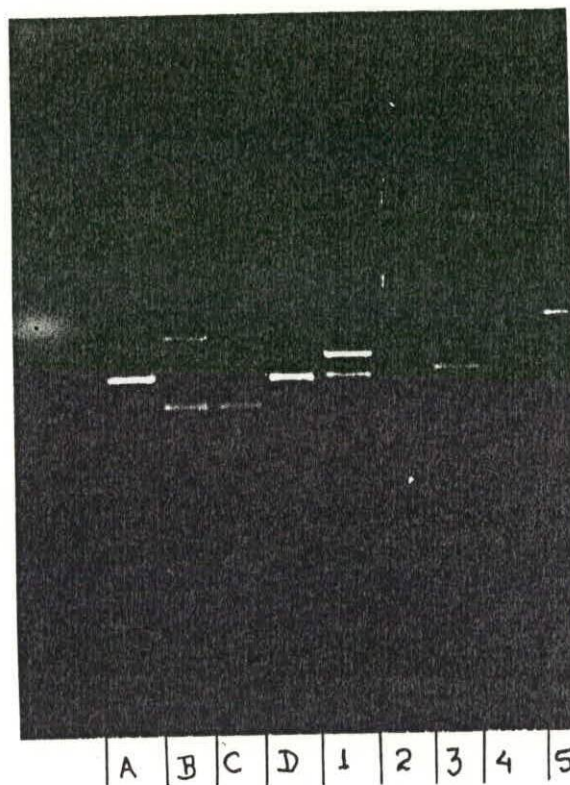
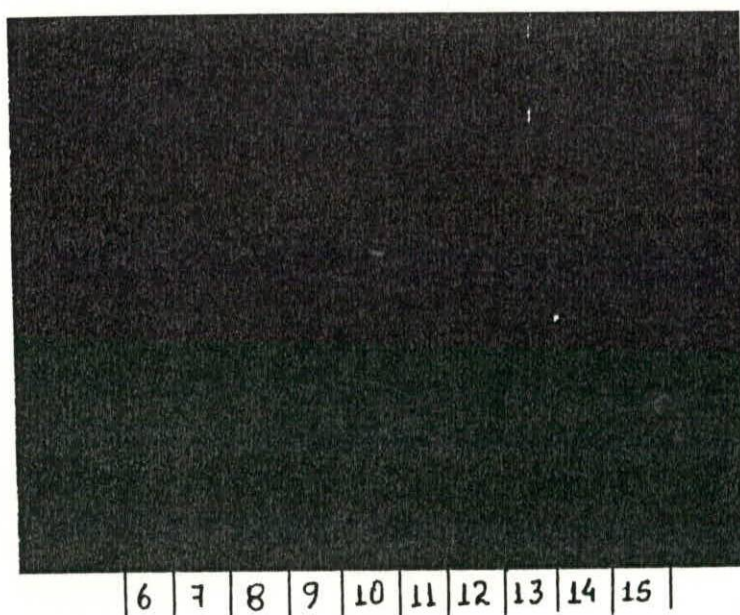


Foto 2



A.- E₂₂

B.- lli.

C.- 158

D.- S₂

1.- V. vul. 100%

2.- V. vul. 89%

3.- V. dam. 91%

4.- V. cam. 100%

5.- V. pel. 84%

6.- V. pel. 89%

7.- V. tub. 95%

8.- V. tub. 90%

9.- V. ner. 86%

10.- V. pel. 90%

11.- V. tub. 95%

12.- V. spl. I 95%

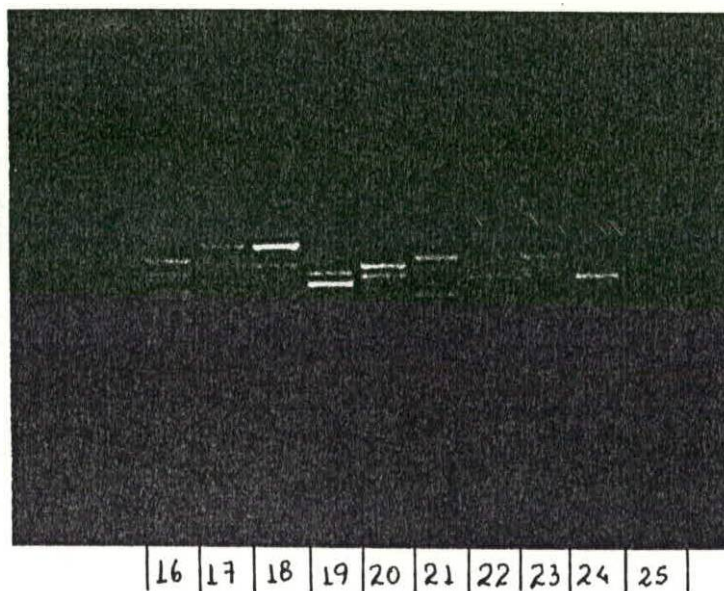
13.- V. har. 100%

14.- V. spl. I 100%

15.- V. har. 88%

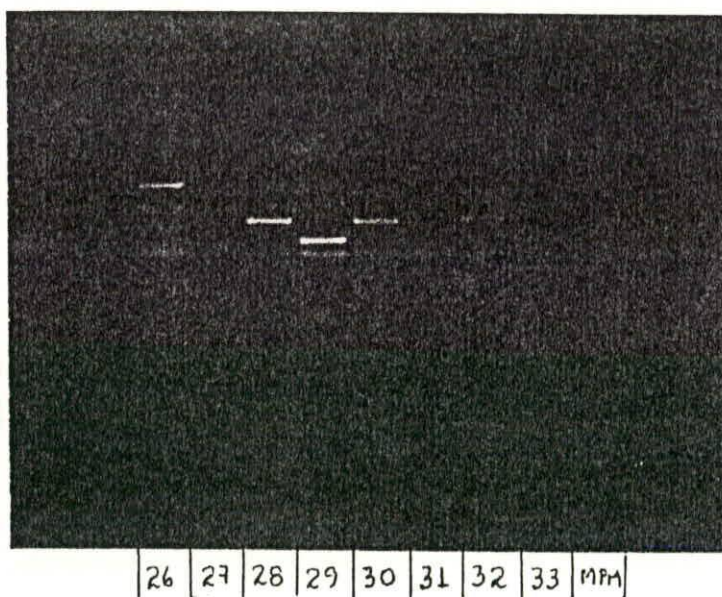
Gel de electroforesis # 1

Foto 3



- 16.- V. tub. 90%
- 17.- V. pel. 90%
- 18.- V. tub. 95%
- 19.- V. cam. 88%
- 20.- V. tub. 100%
- 21.- V. tub. 95%
- 22.- V. tub. 100%
- 23.- V. tub. 95%
- 24.- V. vul. 89%
- 25.- V. tub. 100%

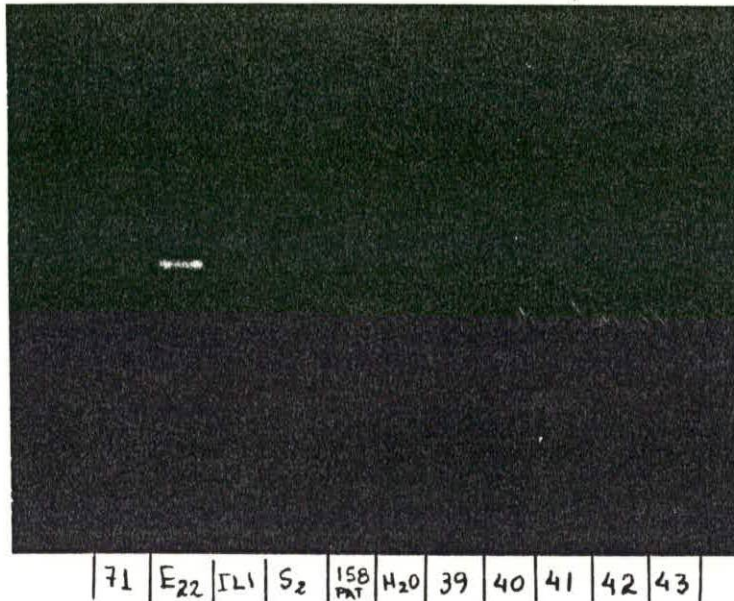
Foto 4



- 26.- V. cam. 88%
- 27.- V. tub. 95%
- 28.- V. tub. 95%
- 29.- V. fur. 90%
- 30.- V. vul. 95%
- 31.- V. tub. 95%
- 32.- V. tub. 100%
- 33.- V. tub. 90%
- M.P.M.

Gel de electroforesis # 2

Foto 1



71.- No salio.

E₂₂.

Ili.

S₂

158 (Patrón)

H₂O

39.- V. spl. I 95%

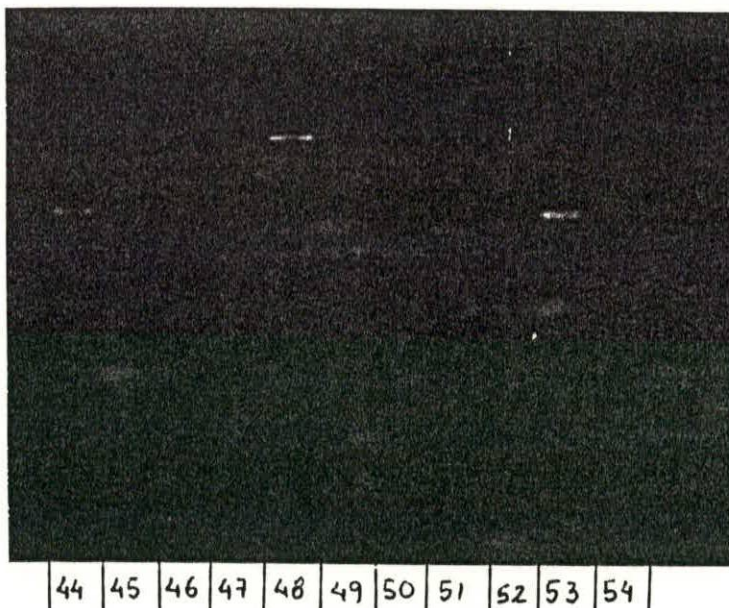
40.- V. fis. 95%

41.- V. fis. 100%

42.- V. tub. 100% (S₂)

43.- V. spl. II 90%

Foto 2



44.- V. vul. 94%

45.- V. pel. 95%

46.- V. tub. 90%

47.- V. spl. II 95%

48.- V. vul. 89%

49.- V. tub. 100%

50.- V. ang. 95%

51.- V. tub. 95%

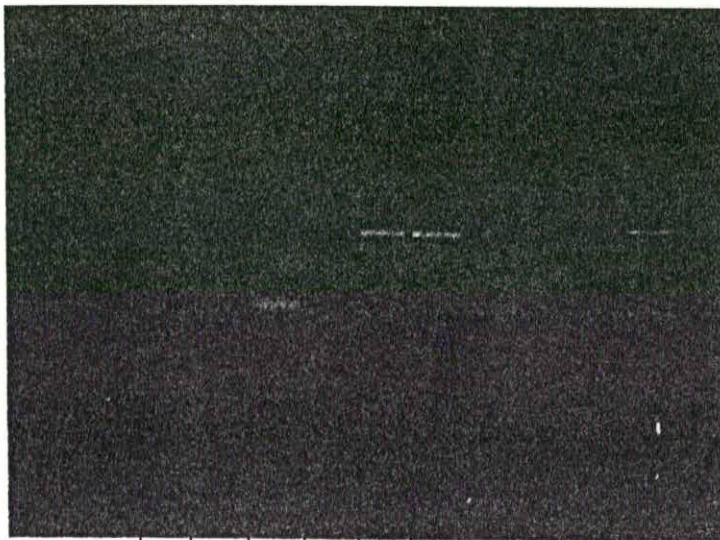
52.- V. vul. 95%

53.- V. tub. 95%

54.- V. tub. 100%

Gel de electroforesis # 2

Foto 3



55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

- 55.- V. tub. 100%
- 56.- V. ang. 95%
- 57.- V. vul. 100% (S₂)
- 58.- No salio
- 59.- V. cam. 88%
- 60.- V. cam. 88%
- 61.- V. alg. 82%
- 62.- V. spl. II 95%
- 63.- V. spl. I 95%
- 64.- V. vul. 89% (**)

Foto 4

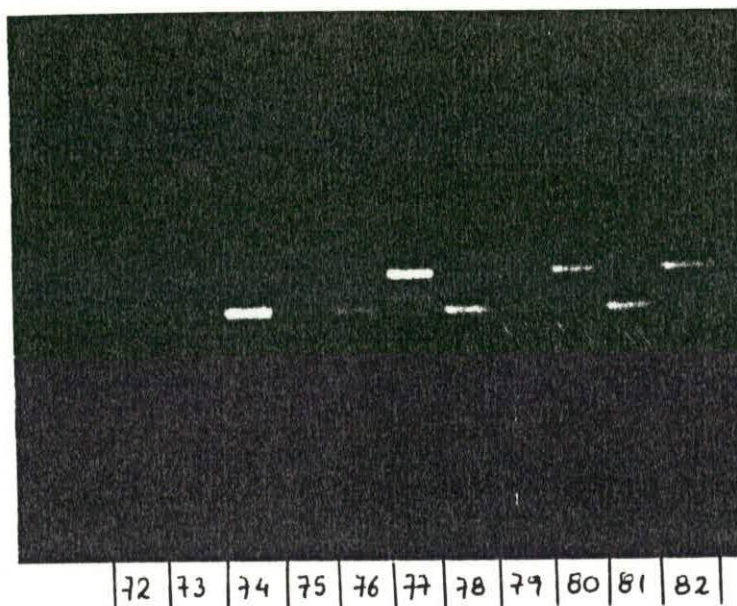


65	66	67	68	69	70	M.P.M.
----	----	----	----	----	----	--------

- 65.- V. vul. 94% (**)
- 66.- V. tub. 90%
- 67.- V. tub. 95%
- 68.- V. har. 88% (S₂)
- 69.- V. vul. 89%
- 70.- V. tub. 95%
- M.P.M.

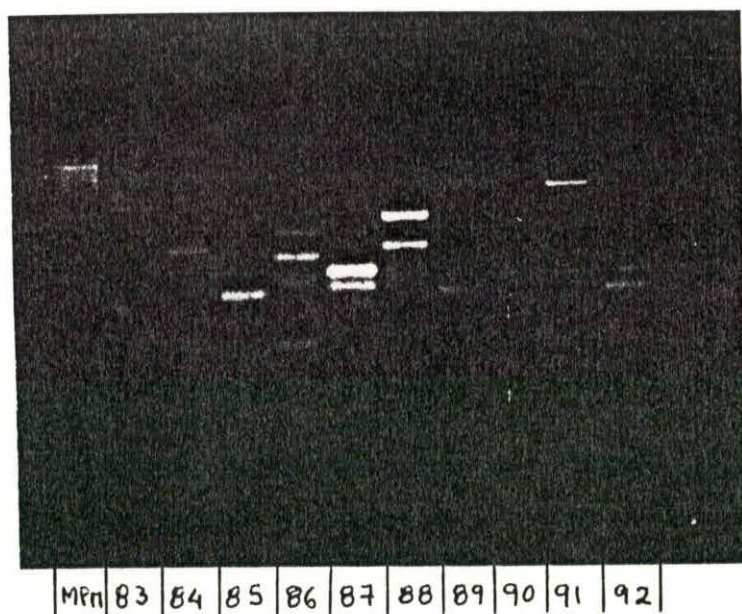
Gel de electroforesis # 3

Foto 1



- 72.- Aerom. 90%
- 73.- V. vul. 89%
- 74.- V. vul. 89% (S₂)
- 75.- V. har. 94%
- 76.- V. vul. 100% (S₂)
- 77.- V. spl. I 90%
- 78.- V. tub. 95% (S₂)
- 79.- V. tub. 95%
- 80.- V. tub. 100%
- 81.- V. har. 94% (S₂)
- 82.- V. tub. 90%

Foto 2

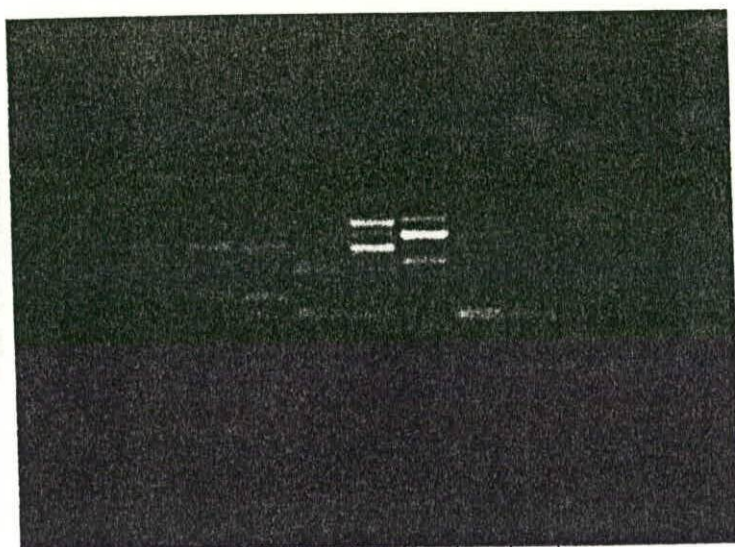


M.P.M.

- 83.- V. tub. 100%
- 84.- V. alg. 77%
- 85.- V. spl. I 95% (S₂)
- 86.- V. tub. 95%
- 87.- V. pel 95%
- 88.- V. spl. II 95%
- 89.- V. vul. 100% (S₂)
- 90.- V. tub. 95%
- 91.- V. tub. 95%
- 92.- V. vul. 100% (S₂)

Gel de electroforesis # 3

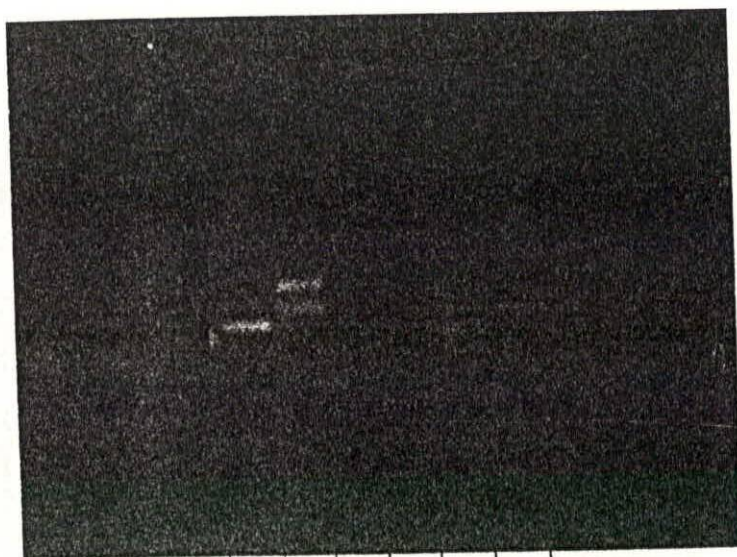
Foto 3



34	35	36	37	38	93	94
----	----	----	----	----	----	----

- 34.- V. spl I 90%
- 35.- V. pel. 100%
- 36.- V. vul. 95%
- 37.- V. tub. 100%
- 38.- V. fls. 90%
- 93.- V. tub. 95%
- 94.- V. fis. 95%

Foto 4

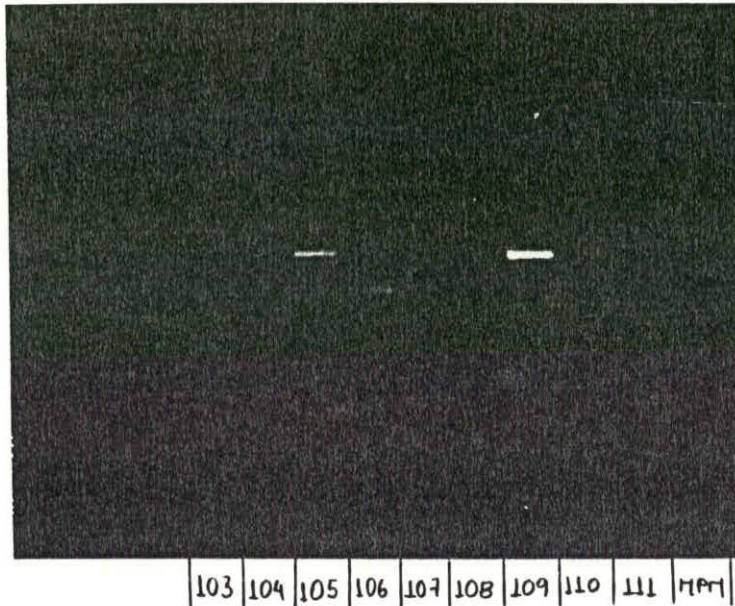


95	96	97	98	99	100
----	----	----	----	----	-----

- 95.- V. vul. 100% (S₂)
- 96.- V. spl. I 90%
- 97.- V. tub. 100%
- 98.- V. ang. 95%
- 99.- V. tub. 95%
- 100.- V. tub. 100%

Gel de electroforesis # 4

Foto 1



103.- No salio.

104.- No salio.

105.- V. vul. 100% (S₂)

106.- V. ang. 85%

107.- V. hol. 79%

108.- V. tub. 90%

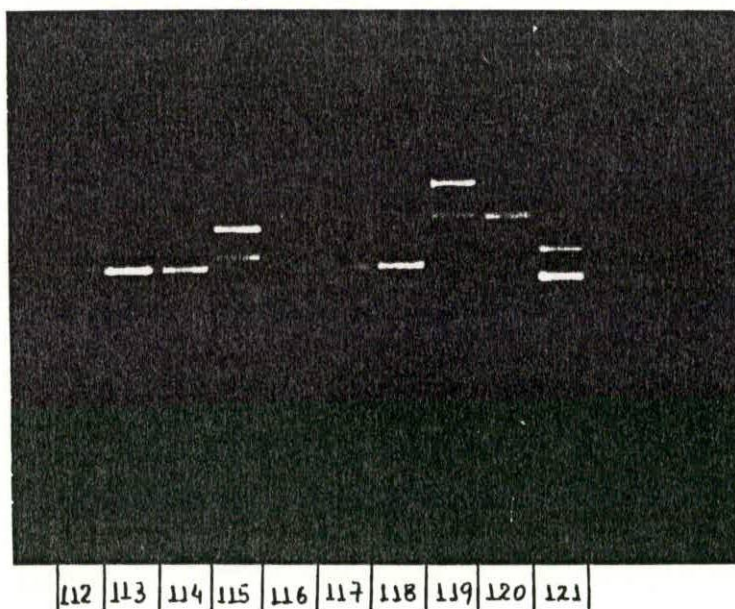
109.- V. vul. 95% (S₂)

110.- V. tub. 100%

111.- V. cam. 94%

M.P.M.

Foto 2



112.- V. vul. 84% (S₂)

113.- V. vul. 100% (S₂)

114.- V. har. 94% (S₂)

115.- V. ang. 95%

116.- V. har. 94% (S₂)

117.- V. vul. 95% (S₂)

118.- V. vul. 100% (S₂)

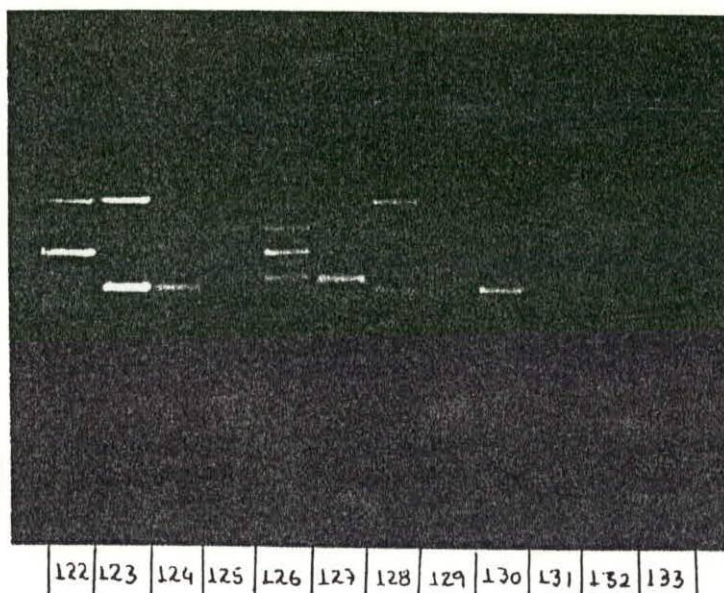
119.- V. cam. 94%

120.- V. ang. 90%

121.- V. log. 95%

Gel de electroforesis # 4

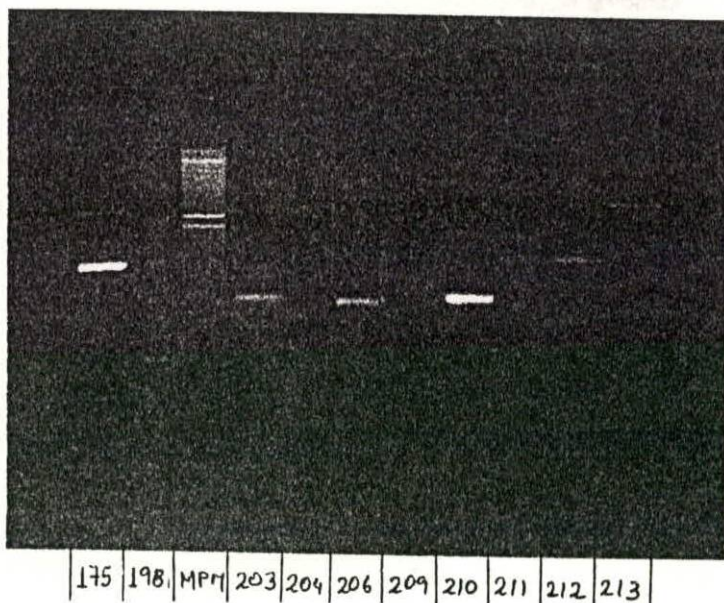
Foto 3



- 122.- V. tub. 95%
- 123.- V. vul. 95% (**)
- 124.- V. har. 88% (S₂)
- 125.- No salio
- 126.- V. tub. 90%
- 127.- V. tub. 90%
- 128.- V. tub. 95%
- 129.- No salio
- 130.- V. vul. 94% (S₂)
- 131.- V. vul. 94%
- 132.- V. vul. 94%
- 133.- V. har. 88%

Gel de electroforesis # 5

Foto 1

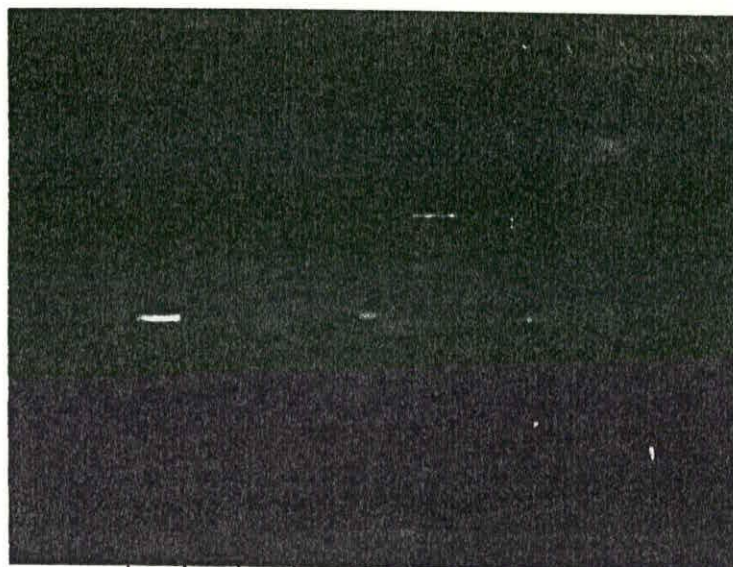


- 175.- V. har. 88%
- 198.- V. tub. 95%
- M.P.M.
- 203.- V. tub. 90% (S₂)
- 204.- V. tub. 90%
- 206.- V. vul. 94% (S₂)
- 209.- V. tub. 100%
- 210.- V. vul. 89% (S₂)
- 211.- V. vul. 89%
- 212.- V. tub. 90%
- 213.- V. tub. 90%



Gel de electroforesis # 6

Foto 1



E ₂₂	S ₂	158 PATR	153	154	155	156	159	160
-----------------	----------------	-------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

E₂₂

S₂

158.- Patrón

153.- V. pel. 95%

154.- V. dam. 91%

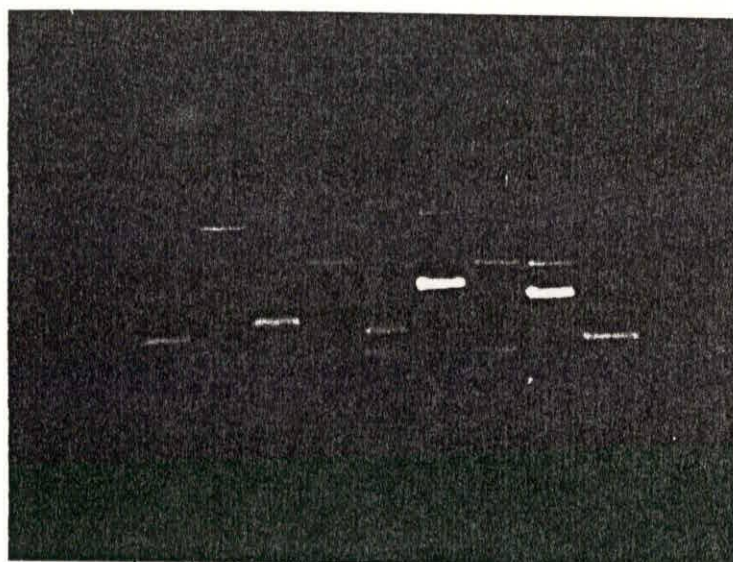
155.- V. ner. 86%

156.- V. tub. 95%

159.- V. vul. 100% (S₂)

160.- V. tub. 90%

Foto 2



161	162	163	164	165	166	167	168	169
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

161.- V. vul 89% (S₂)

162.- V. tub. 95%

163.- V. V. spl. I 90%

164.- V. tub. 95%

165.- V. log. 89%

166.- Pseud. 100%

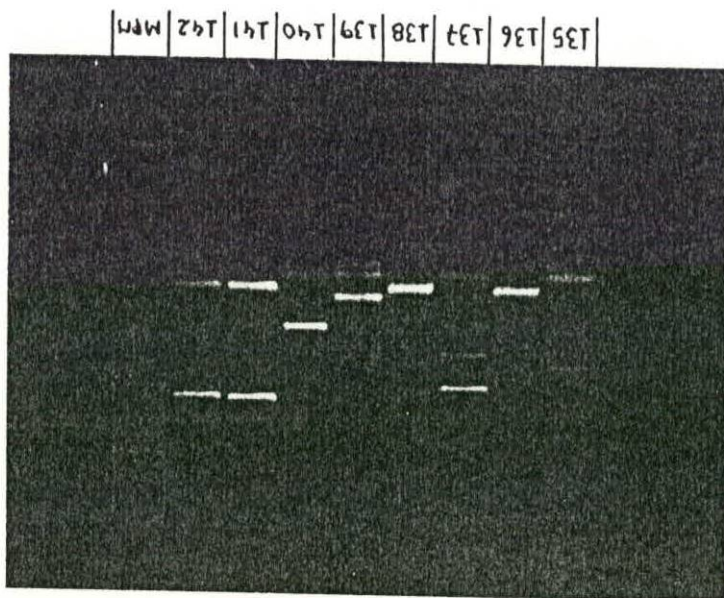
167.- V. tub. 90%

168.- V. spl. I 95%

169.- V. par. 90% (S₂)

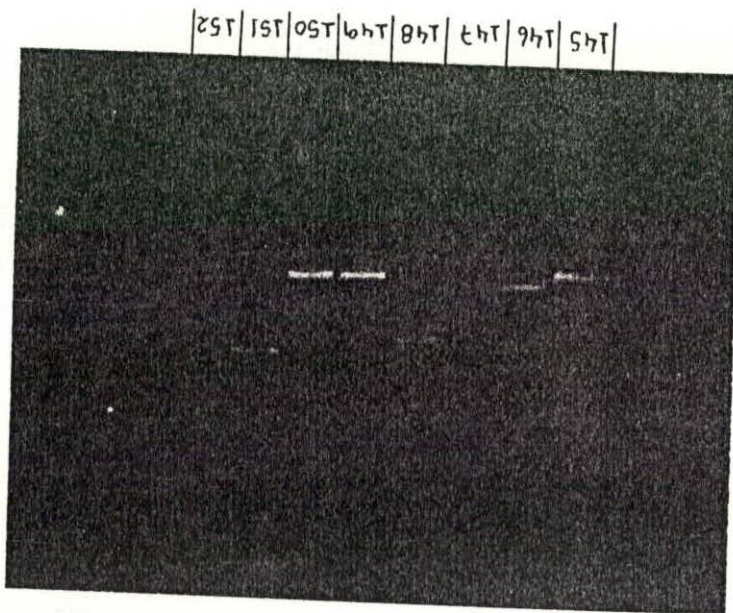
Gel de electroforesis # 6

Foto 3



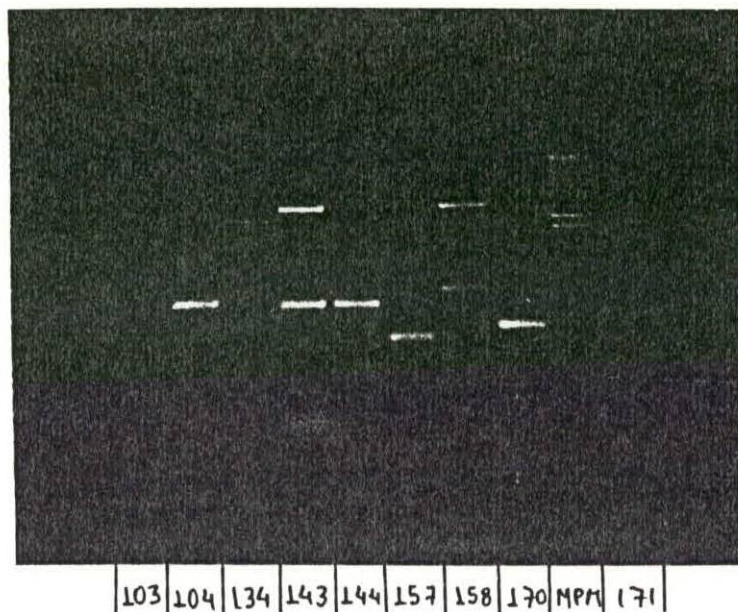
M.P.M.

Foto 4



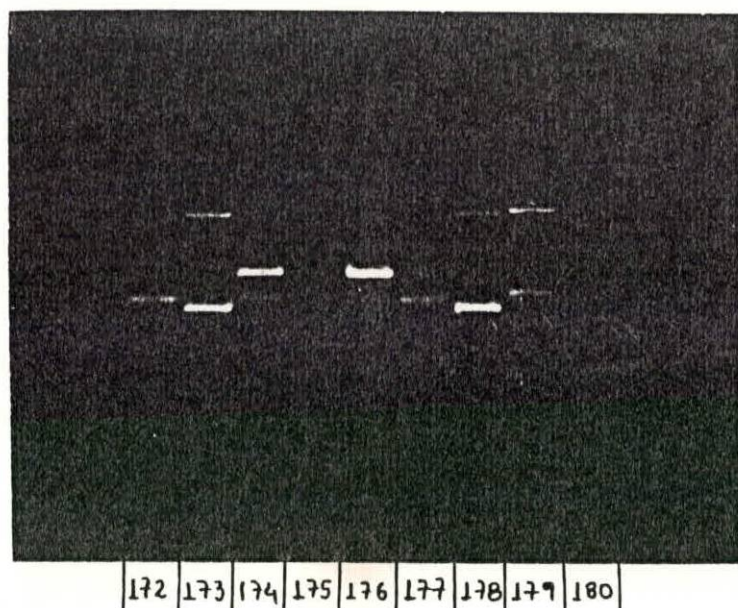
Gel de electroforesis # 7

Foto 1



- 103.- V. har. 94% (S₂)
- 104.- V. vul. 100% (S₂)
- 134.- V. spl. II 90%
- 143.- V. flu. 89% (**)
- 144.- V. flu. 89% (S₂)
- 157.- V. pel. 90%
- 158.- V. ang. 85%
- 170.- Pseud. 83%
- M.P.D.
- 171.- V. tub. 90%

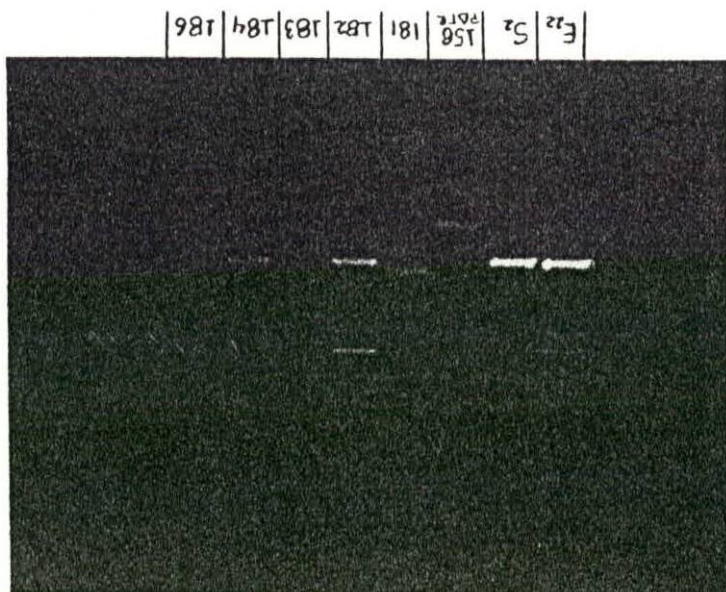
Foto 2



- 172.- V. tub. 95%
- 173.- V. vul. 89% (**)
- 174.- V. har. 94%
- 175.- No salio
- 176.- V. spl. I 95%
- 177.- V. tub. 100%
- 178.- V. vul. 94% (**)
- 179.- V. alg. 88%
- 180.- V. tub. 95%

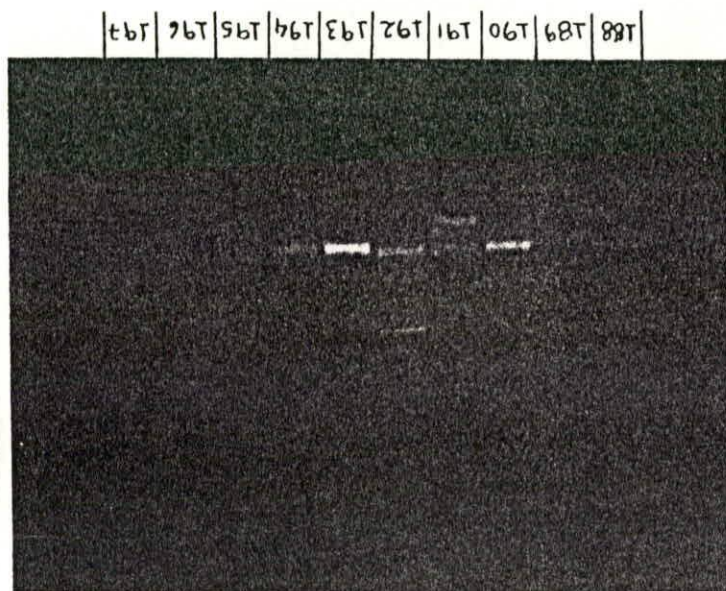
Gel de electroforesis # 7

Foto 3



E22
S2
158.- Patrón
181.- V. fur. 90%
182.- V. par. 90% (**)
183.- V. tub. 95%
184.- V. par. 90% (**)
186.- V. fis. 95%

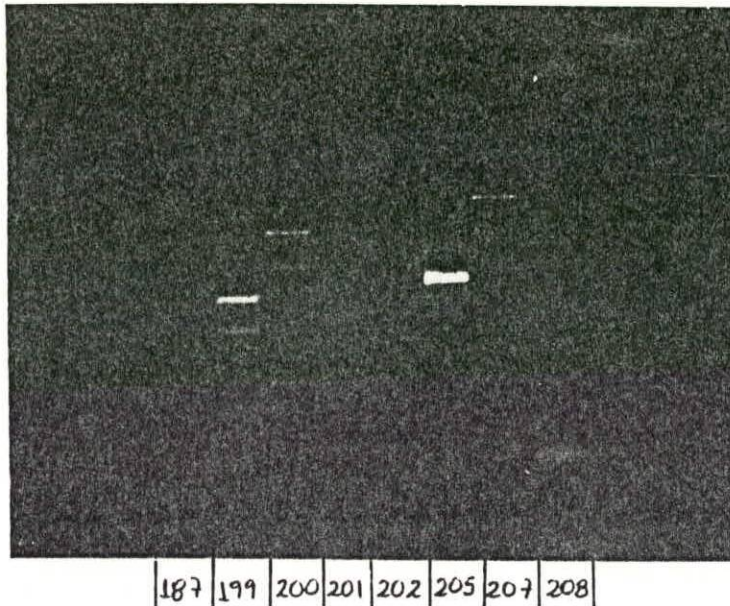
Foto 4



188.- V. tub. 90 (S2)
189.- V. fis. 90%
190.- V. par. 90% (S2)
191.- V. par. 90%
192.- V. ner. 86% (**)
193.- V. tub. 90% (S2)
194.- V. tub. 90% (S2)
195.- V. tub. 90%
196.- V. cam. 94%
197.- V. flu. 94% (S2)

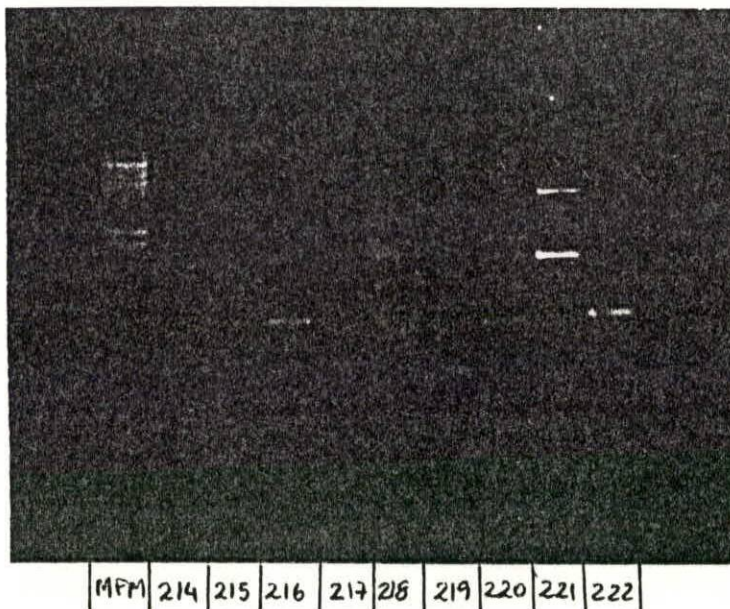
Gel de electroforesis # 8

Foto 1



- 187.- V. ang. 85%
- 199.- V. tub. 100%
- 200.- V. tub. 95%
- 201.- V. tub. 95%
- 202.- V. tub. 95%
- 205.- V. tub. 95%
- 207.- V. log. 94%
- 208.- V. pel. 95%

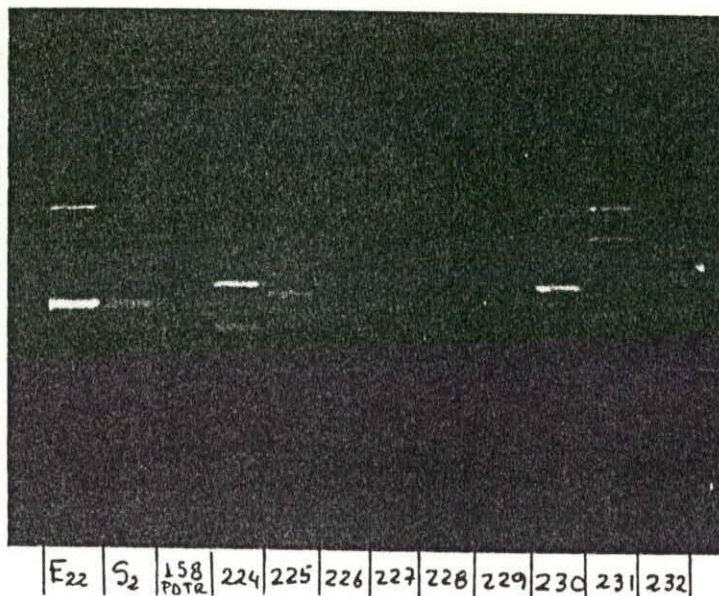
Foto 2



- M.P.M.
- 214.- No salio
- 215.- V. flu. 100%
- 216.- V. tub. 90%
- 217.- V. ner. 86%
- 218.- Aerom. 95%
- 219.- V. vul. 90%
- 220.- V. cam. 95%
- 221.- V. vul. 94%
- 222.- V. ang. 88%

Gel de electroforesis # 8

Foto 3



E22

S2

158.- Patrón

224.- V. tub. 90%

225.- V. alg. 88%

226.- No salio

227.- V. spl. I 90%

228.- V. log. 95%

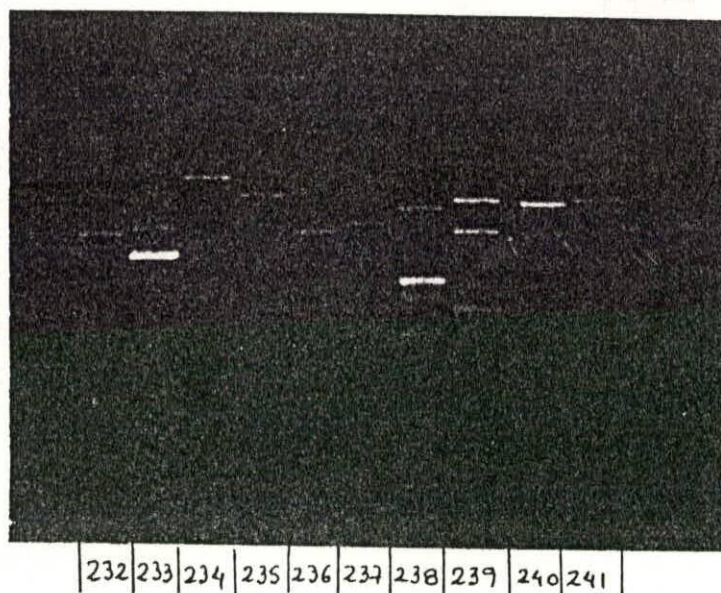
229.- No salio

230.- V.- vul. 89%

231.- V. tub. 100%

232.- V. tub. 95%

Foto 4



232.- V. tub. 95%

233.- V. tub. 95%

234.- V. vul. 94% (**)

235.- V. vul. 94% (**)

236.- V. tub. 95%

237.- V. cam. 88%

238.- V. vul. 94%

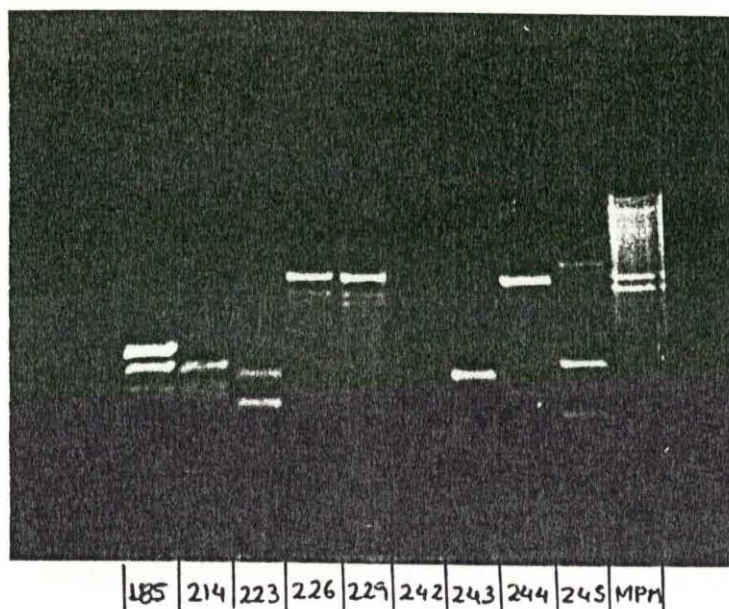
239.- V. tub. 95%

240.- V. cam. 88%

241.- V. par. 90%

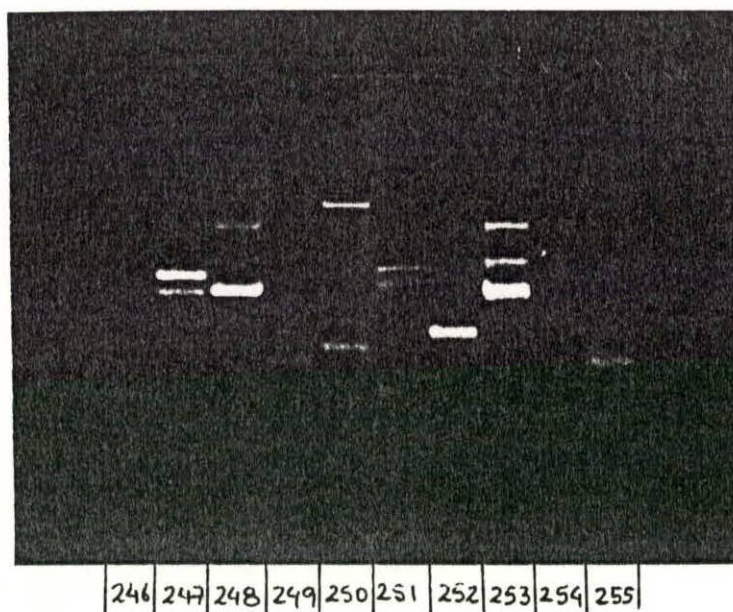
Gel de electroforesis # 9

Foto 1



- 185.- V. pel. 90%
- 214.- V. tub. 95%
- 223.- V. cho. 79%
- 226.- V. cam. 88%
- 229.- V. cam. 94%
- 242.- V. tub. 90%
- 243.- V. vul. 100% (S₂)
- 244.- V. tub. 95%
- 245.- V. ang. 85%
- M.P.M.

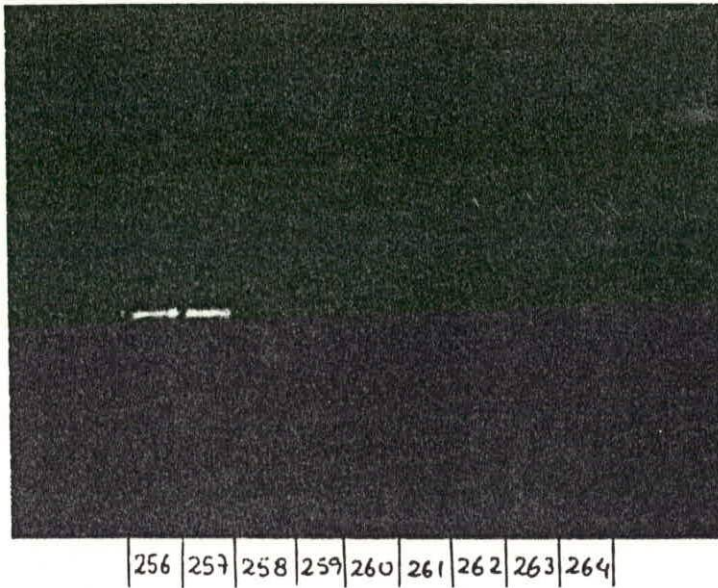
Foto 2



- 246.- V. ang. 90%
- 247.- V. fis. 95%
- 248.- V. har. 88%
- 249.- V. fis. 95%
- 250.- V. tub. 100%
- 251.- V. vul. 94%
- 252.- V. vul. 94% (S₂)
- 253.- V. vul. 94%
- 254.- V. tub. 90%
- 255.- V. vul. 94%

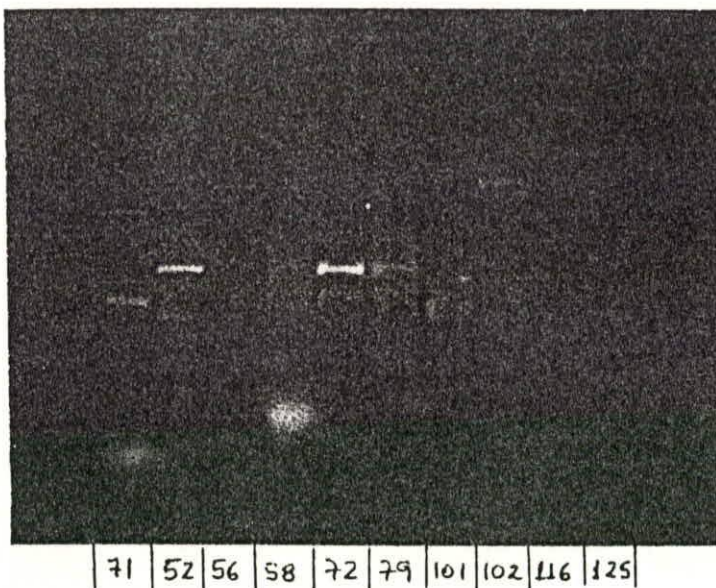
Gel de electroforesis # 9

Foto 3



- 256.- V. vul. 89% (S₂)
- 257.- V. vul. 94% (S₂)
- 258.- No salio
- 259.- No salio
- 260.- V. vul. 90% (S₂)
- 261.- No salio
- 262.- No salio
- 263.- V. vul. 94%
- 264.- V. cam. 88%

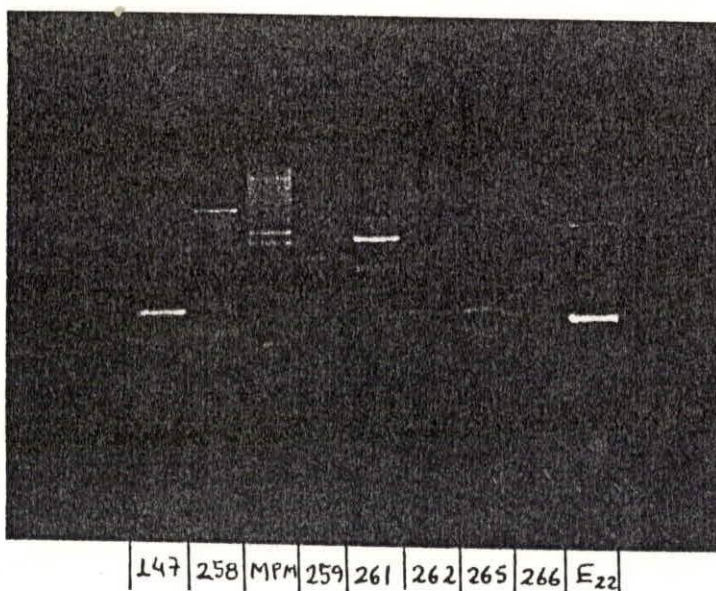
Foto 4



- 71.- V. dam. 91%
- 52.- V. vul 95% (**)
- 56.- V. ang. 95% (**)
- 58.- No salio
- 72.- Aerom. 90%
- 79.- V. tub. 95%
- 101.- No salio
- 102.- V. tub. 90%
- 116.- No salio
- 125.- No salio.

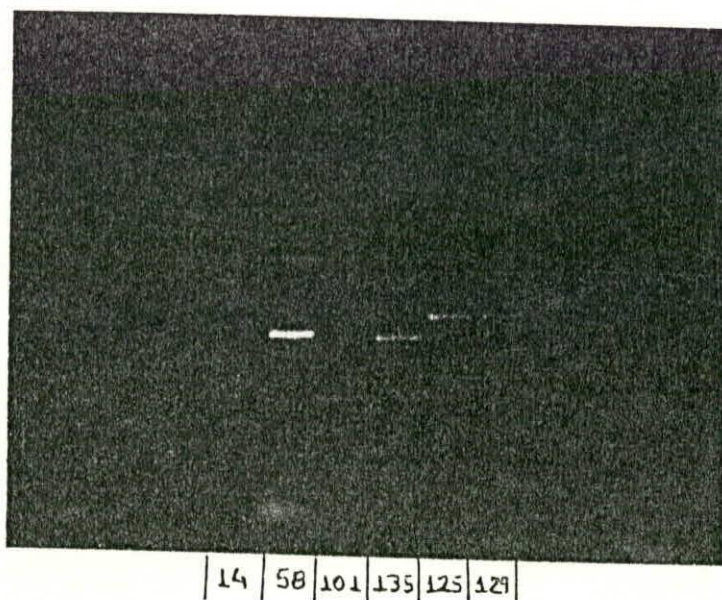
Gel de electroforesis # 10

Foto 1



- 147.- V. tub. 95%
- 258.- V. tub. 100%
- M.P.M.
- 259.- V. tub. 90%
- 261.- V. cam. 88%
- 262.- V. vul. 100%
- 265.- V. pel. 95%
- 266.- V. vul. 94% (S₂)
- E₂₂

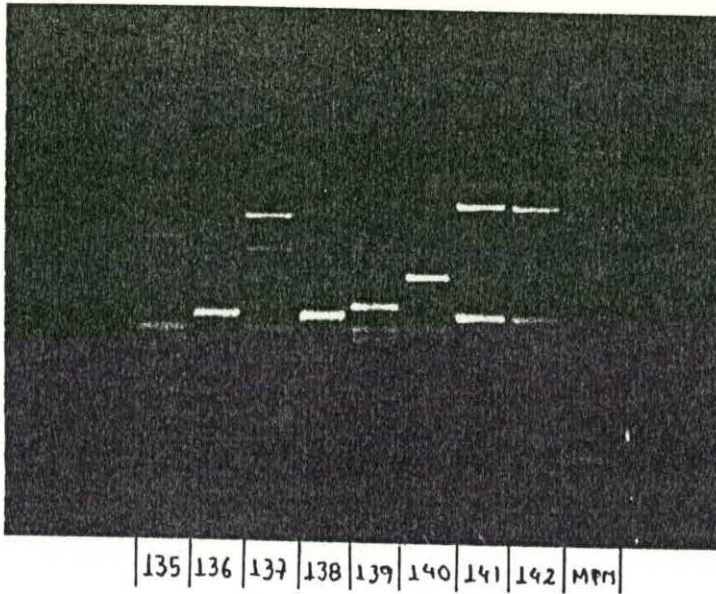
Foto 2



- 14.- V. spl. I 95%
- 58.- V. tub. 95%
- 101.- V. vul. 100% (S₂)
- 135.- V. har. 94%
- 125.- V. tub. 95%
- 129.- V. har. 90%

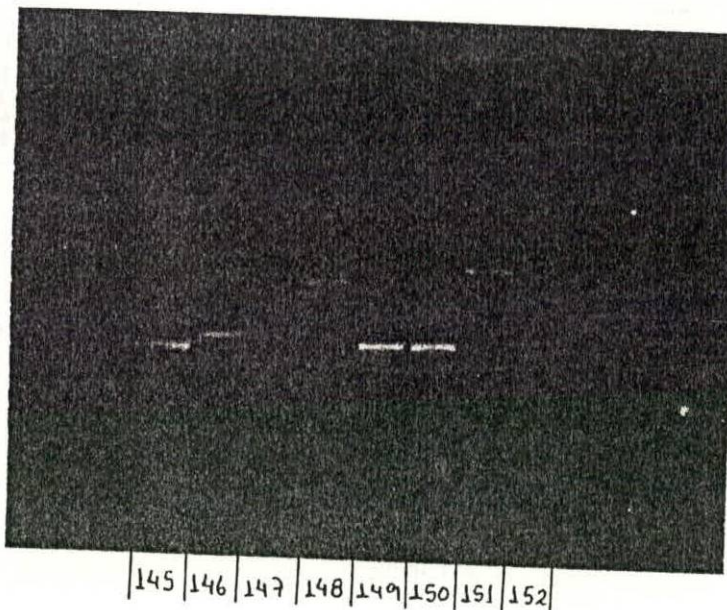
Gel de electroforesis # 6

Foto 3



- 135.- V. har. 94%
- 136.- V. log. 79% (S₂)
- 137.- V. tub. 90%
- 138.- V. vul. 100% (S₂)
- 139.- V. tub. 95%
- 140.- V. vul. 89%
- 141.- V. vul. 100% (**)
- 142.- V. flu. 94% (**)
- M.P.M.

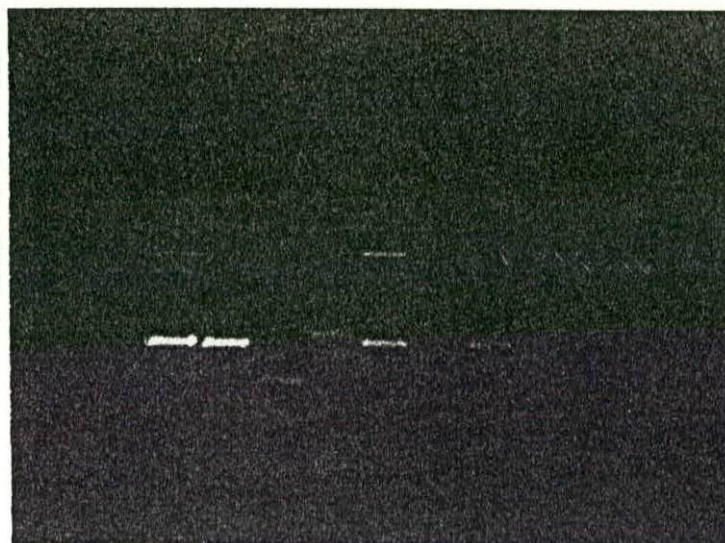
Foto 4



- 145.- V. vul. 100% (S₂)
- 146.- V. tub. 95%
- 147.- V. tub. 95%
- 148.- V. cam. 88%
- 149.- V. vul. 100% (S₂)
- 150.- V. vul. 100% (S₂)
- 151.- V. har. 88%
- 152.- V. ner. 91%

Gel de electroforesis # 7

Foto 3



E ₂₂	S ₂	158 POTR	181	182	183	184	186
-----------------	----------------	-------------	-----	-----	-----	-----	-----

E₂₂

S₂

158.- Patrón

181.- V. fur. 90%

182.- V. par. 90% (**)

183.- V. tub. 95%

184.- V. par. 90% (**)

186.- V. fis. 95%

Foto 4



188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

188.- V. tub. 90 (S₂)

189.- V. fis. 90%

190.- V. par. 90% (S₂)

191.- V. par. 90%

192.- V. ner. 86% (**)

193.- V. tub. 90% (S₂)

194.- V. tub. 90% (S₂)

195.- V. tub. 90%

196.- V. cam. 94%

197.- V. flu. 94% (S₂)