

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales**



**“Estudio del Control de *Vibrio vulnificus* en muestras de
Crassostrea gigas utilizando cepas aisladas del suelo
antártico y biol”**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentado por:

**Jhon Lenin Estrella Avila
Andrea Alejandra Insuasti Hidalgo**

Guayaquil – Ecuador

2015

Estudio del control de *Vibrio vulnificus* en muestras de *Crassostrea gigas* utilizando cepas bacterianas aisladas del suelo antártico y biol

Jhon Lenin Estrella Avila^a, Andrea Alejandra Insuasti Hidalgo^a, Lizette Serrano Mena^b, Susana Llivisaca Contreras^b, Juan Manuel Cevallos Cevallos^b

^a Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales; Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador
jestrell@espol.edu.ec, ainsuast@espol.edu.ec

^b Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador
lizveser@espol.edu.ec, susalliv@espol.edu.ec, jmcveva@espol.edu.ec

Resumen. Este estudio pretende evaluar la eficacia de bacterias aisladas de biol y de suelo antártico en la inactivación del *Vibrio vulnificus* en ostras (*Crassostrea gigas*) extraídas de sus valvas. Se considera que el *V. vulnificus* es un patógeno humano que se transmite a través del consumo de mariscos crudos o por exposición de heridas abiertas. Teniendo en cuenta que es una costumbre el consumo de ciertos mariscos, como moluscos bivalvos, de manera cruda; se pretende encontrar formas de biocontrol para futuros tratamientos de depuración previo al consumo del producto. Para la determinación de las concentraciones del ensayo se realizó un enfrentamiento en medio líquido de la bacteria del biol y suelo antártico frente al *V. vulnificus*. Posteriormente, las ostras extraídas fueron inoculadas artificialmente con *V. vulnificus*. Las ostras inoculadas (5g de peso) fueron sumergidas en 150 ml del agente antagonista por 14 h. y 1 semana, para el tratamiento con bacterias del biol y suelo Antártico respectivamente. Finalmente, la población superviviente de *V. vulnificus* en las ostras extraídas fue determinada en placas de TCBS 2% NaCl en unidades de log UFC/g. Los datos obtenidos del enfrentamiento en medio líquido mostraron que al usar concentraciones de similares para el enfrentamiento entre el antagonista contra el patógeno se obtiene una reducción de 1log en un tiempo de 2 h. Sin embargo, solo se observó una reducción significativa del patógeno al emplear el tratamiento con bacteria aislada de suelo antártico sometidas al autoclave "Ant A", al cabo de los 8 días, con una reducción total de 3,14 log.

Palabras Clave: *Vibrio vulnificus*, bacteria suelo antártico, bacteria biol, ostras, *Crassostrea gigas*, biocontrol.

Abstract. This study aims to evaluate the effectiveness of bacteria isolated from biol and Antarctic soil during the inactivation of *Vibrio vulnificus* in shucked oysters (*Crassostrea gigas*). It is considered that the *V. vulnificus* is a human pathogen that is transmitted through the consumption of raw shellfish or from exposure of open wounds. Considering that we use to eat certain seafood, including oysters, raw; it is critical to find ways of biocontrol for future treatments of purification prior to consumption of the product. To determine the assay concentrations, we made a confrontation assay in liquid medium using the Biol and Antarctic soil bacteria against *V. vulnificus*. Subsequently, the oysters were shucked and artificially inoculated with *V. vulnificus*. The inoculated oyster (of 5g in weight) were immersed in 150 ml of the antagonist for 14 hours and 1 week, for the treatment with bacteria of biol and Antarctic

soil respectively. Finally, the surviving population of *V. vulnificus* in shucked oysters was determined on TCBS plates 2% NaCl in units of log CFU/g. The data obtained from the confrontation assay in liquid medium showed that using a similar concentration of the antagonist and the pathogen achieved a 1 log reduction in a time of 2 h. However, the only significant reduction of the pathogen was observed when using the treatment with bacteria isolated from Antarctic soil autoclaved "Ant A", after 8 days, with a total reduction of 3.14 log.

Keywords: *Vibrio vulnificus*, Antarctic soil bacteria, biol bacteria, oysters, *Crassostrea gigas*, biocontrol.

1 Introducción

El cultivo de Ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) surgió en el Centro Nacional de Investigaciones Marinas (CENAIM) en el Ecuador hace más de dos décadas, introducida desde Chile y apoyado por la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA); siendo esta la primera especie de moluscos bivalvos que se empezó a cultivar en el país [1] [2], con el fin de crear una alternativa de producción, además del cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) y de esta manera diversificar la acuicultura en el Ecuador.

Actualmente la actividad comercial es apoyado por el gobierno de forma legal, mediante un Acuerdo Ministerial (N° 023) [3], ofreciéndole así a la Ostricultura una oportunidad para posicionarse con más fuerza en el mercado local ecuatoriano, y a futuro en el mercado mundial. Considerando que la producción mundial de moluscos por actividades acuícolas ha ido en aumento, con un promedio de 5% anual, según la base de datos de 1950-2013 de la FAO publicados en marzo de este año. En el 2013 hay una producción de moluscos un poco más de 15,5 Millones de Toneladas, generando más de USD\$17 Mil Millones de dólares; del cual solo el 3,6% corresponde a la producción de Ostras [4].

La ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), se convirtió en parte de la gastronomía ecuatoriana, y generalmente se la ha consumido cruda sin ningún tipo de tratamiento en especial o depuración, convirtiéndose un factor de posible infección por patógenos marinos que son filtrados por estos moluscos en el medio.

A nivel mundial existen varios reportes de contaminación por ingesta de alimentos marinos. A pesar de la variedad de mariscos que consumimos, son las ostras, la fuente principal de casos de infección, abarcando un 96% de los mismos [5]. Estados Unidos posee un sistema de vigilancia de enfermedades de este tipo llamada COVIS (Cholera and Other Vibrio Illness Surveillance), el cual tiene reportado los casos de brotes de infección por bacterias de la familia *Vibrionaceae*. En el año de 2013 hubo 1,176 infecciones por *Vibrios* entre los cuales se suscitaron hospitalizaciones y hasta muertes [6]. Al igual que en EEUU, en Europa existen serios brotes de contaminación por parte de esta familia de bacterias. Según la OMS, las infecciones por alimentos en América Latina representan un 70%, donde el 60% de las mismas, representan a estas bacterias como agente etiológico según SIRVETA [7] [8].

Las bacterias del género *Vibrio spp.* son de tipo Gram-negativas y halófilas, es decir, habitan de forma natural en aguas salobres y saladas, siendo estos principalmente las aguas de los golfos [9] [10] [11] [12]. De este género, 11 especies son considerados patógenos para el ser humano, sin embargo resaltan los siguientes: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, como agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por alimentos [13] [14]. De todas las especies del género *Vibrio*, el *V. vulnificus* se caracteriza por su capacidad invasiva fuerte [13] y se le asocia tres principales síndromes clínicos: gastroenteritis, infección por heridas y septicemia como el más importante ya que puede causar la muerte [10], esta bacteria provoca altas tasas de mortalidad (50%). Esta bacteria es inusual entre las bacterias patógenas puesto que posee más de una vía de entrada, haciéndola posible de causar infecciones potencialmente fatales en heridas abiertas y septicemia primaria resultante por la ingesta de la bacteria [5] [9]. En el 2013 hubo dos casos de septicemia causado por el *V. vulnificus* en el Ecuador y ambos pacientes fallecieron a causa de esto [15].

Ante tantos percances ocasionados por estas formas de contaminación se han desarrollado diferentes tipos de técnicas, adoptadas en muchas partes del mundo, para la eliminación de contaminantes biológicos; dichas técnicas van desde el tratamiento con Dióxido de carbono, gas de Dióxido de Cloruro, tratamiento con alta presión, Irradiación con electrones, Rayos X [9] y la Depuración, que es la más acogida por la mayoría de empresas. Sin embargo, las prácticas comerciales que utilizan esta técnica apuntan a que no es efectiva para la eliminación de vibrios marinos naturales, entre ellas el *V. vulnificus* [16]. Por lo cual se vuelve fundamental el encontrar otro método de manejo o biocontrol.

En la acuicultura es conocido el uso de antibiótico para controlar agentes patógenos, incluyendo los vibrios, en todos los cultivos de especies marinas.

Sin embargo, es conocido que los antibióticos representan un impacto negativo a largo plazo en los mismos cultivos, ambientalmente y en salud humana [17] [18]. El continuo uso de los antibióticos puede generar o incrementar la resistencia de las bacterias, además de que puede ser bioacumulado en la carne de los animales acuáticos que se estén cultivando, causando un impacto en la salud del consumidor [17]. En un estudio realizado específicamente en *V. vulnificus* por Baker-Austin et al., demuestra que este organismo presenta actualmente un amplio rango de resistencia frente a antibióticos que son usados en los diferentes tratamientos frente a este patógeno. Los estudios probados para un total de 151 aislados de *V. vulnificus* frente a 26 antibióticos, mostraron como resultado que en promedio cada aislado es resistente a 5.88 antibióticos. Entre los antibióticos se encontraban la tetraciclina y su derivado doxiciclina, los más comunes fueron penicilina, aminoglicósidos, etc. [18] Zanetti et al probaron seis diferentes aislados de *V. vulnificus* de la costa italiana frente a 11 antibióticos [19]. Por otro lado, Ottaviani et al. realizaron pruebas con 8 aislados frente a 27 antibióticos [20].

En la actualidad se está optando por el uso de agentes de biocontrol como opción para manejar patógenos, los cuales recientemente se están considerando como

amigables con el ambiente. Referente a *Vibrio* se han llevado a cabo varios estudios de biocontrol, entre los cuales constan el uso de *Carnobacterium sp.* Como un probiótico en cultivos de salmón del atlántico y trucha arcoiris [21]. Villamil et al prueban tratamientos con bacterias ácido lácticas (LAB) como probiótico en cultivos de artemia frente a *V. alginolyticus* [22]. Vijayan et al encontraron actividad significativa frente a vibrios usando *Pseudomonas sp* PS-102 aisladas de Muttukkadu, una laguna de agua salobre ubicada al sur de Chennai [23]. Chynthanya et al confirmaron que una cepa de bacteria marina, *Pseudomonas* I-2, produce compuestos inhibitorios contra vibrios patógenos de camarón incluyendo al *V. vulnificus* [24]. Mahmoud prueba diferentes antibacterianos naturales entre ellos extracto de uvas, ácido cítrico y ácido láctico para inactivar *V. vulnificus* en ostras extraídas [25].

El presente estudio lo realizaremos en base a resultados obtenidos previamente por la Ing. Lizette Serrano en “Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida.” [26]. Para la selección de las cepas aisladas del biol y de suelo de la Antártida a utilizar en el presente ensayo, elegimos aquellas que presentaron el mayor antagonismo *in vitro* frente al patógeno, para así enfrentarlos en ostras frescas extraídas y observar si en estas condiciones el antagonismo sigue presentándose de la misma manera y con la misma eficiencia.

Se espera como resultado final que la cepa seleccionada, tanto del suelo de la Antártida como del biol, presenten una inhibición (biocontrol) en el crecimiento del *V. vulnificus* luego de un tiempo determinado de exposición sobre el tejido (*C. gigas*) previamente infectado con dicho patógeno. Buscando así la comprobación del antagonismo anteriormente probado aplicando métodos *in vitro* [26].

2 Materiales y Métodos

Agente Patógeno. Es una cepa bacteriana de *Vibrio vulnificus*, patógeno humano y de camarón, aislado en el Centro de Servicio para la Acuicultura; seleccionada debido a su alta patogenicidad en humanos, presentada principalmente con la ingesta de mariscos crudos o exposición en el medio natural.

Agentes Antagónicos. Se utilizaron dos cepas bacterianas, ambos aislados en el Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE), estos son:

- La cepa A⁻⁴ (1) del Biol
- La cepa 97 de Suelo Antártico

Fueron seleccionadas por su respuesta antagónica positiva frente al *V. vulnificus* en estudios previos. Preservada en medio PDB al 15% de glicerol a -80°C de Temperatura.

Organismo de Prueba. Se utiliza muestras de Ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) proporcionada por el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas – CENAIM; procurando tener tallas similares con poca variación. Se

transportaron en una hielera hacia las instalaciones del CIBE e inmediatamente congeladas a -20°C hasta su utilización.

2.1 Metodología

Reactivación de las bacterias. Las bacterias deben ser reactivadas en medios nutritivos que cumplan con los requerimientos de cada una. Se utilizó Agar Sangre 2% NaCl para el patógeno y PDA para los antagonistas.

Se siembran $50\ \mu\text{l}$ de la cepa preservada del patógeno, se dispersa, sella y se lleva a incubadora a 34°C . A las 24 h se procede a repicar las bacterias en caldo nutritivo, utilizando LB 2% NaCl, para obtener concentraciones de 10^8 , haciendo repiques graduales desde tubos de ensayo hasta alcanzar fiolas de 1L, se mantendrán a 34°C y constante agitación 100 rpm.

Para los agentes antagonistas se realiza el mismo procedimiento de activación y repique. Considerando emplear PDA, la bacteria de biol será traspasada a PDA 2% NaCl y para el repique se utilizará PDB 2% NaCl para biol y 0% NaCl Antártida. La incubación para los agentes antagonistas es 34°C para biol y 17°C para suelo antártico con agitación constante 100 rpm.

Para el enfrentamiento en medio líquido. Se emplean cultivos bacterianos en concentraciones de $5,4 \times 10^8$ cel/ml de la cepa de Biol y Antártica, y cultivos de estas bacterias llevados al autoclave por 5 min a 121°C . Una vez que estos se encuentren fríos, se preparan las diluciones de los cultivos antagonistas esterilizados y sin esterilizar (100%, 75%, 50%, 25%) en tubos de ensayo con 20 ml de agua ultra pura 0,5% NaCl. Luego, se procede a realizar el enfrentamiento en agua marina estéril usando una concentración del patógeno de $5,4 \times 10^8$ cel/ml versus las diferentes concentraciones por triplicado y su control respectivo. Transcurrido un tiempo de enfrentamiento de 2h, se preparan diluciones y se siembra en placas con TCBS con 2% NaCl para realizar el conteo del patógeno. Adicionalmente se realiza el conteo en cámara Neubauer.

Preparación del ensayo.

Inoculación del *V. vulnificus* en ostras extraídas. Las ostras, extraídas y pesadas (5g/muestra), fueron llevadas al autoclave por 10 min a 121°C . Una vez esterilizadas las ostras son inoculadas con el patógeno mediante inmersión en 100 ml de cultivo de *V. vulnificus* (medio LB con 2%NaCl) con 10^8 cel./ml de concentración por 30 min. Posteriormente las muestras son secadas al ambiente durante 30 min a 22°C previo a la inoculación del antagonista [9]. Todo el proceso se lleva a cabo en una cámara de bioseguridad tipo 2.

Tratamiento de las ostras inoculadas frente a bacteria biol o suelo antártico.

La concentración a emplearse para este tratamiento se determinó de acuerdo a los resultados obtenidos en el enfrentamiento en medio líquido. Las ostras inoculadas con el patógeno fueron sumergidas en 150 ml de uno de los cultivos de cepas

antagónicas de biol (medio PDB 2%NaCl) o suelo antártico (PDB 0%NaCl) con una concentración de 10^8 cel./ml por 14 h y 1 semana respectivamente, con agitación continua de 100 rpm [9].

La población de *V. vulnificus* en las ostras se determinó de acuerdo al Manual de Bacteriología Analítica del FDA [27]. Se homogeniza 5g de muestra en 45 ml Agua Ultrapura al 0,5% triturando las ostras, a partir de esta se procede a hacer diluciones hasta 10^{-4} . Las diluciones 10^{-1} - 10^{-4} son sembradas en TCBS 2%NaCl para realizar el conteo. La sobrevivencia del patógeno es expresada en log UFC g^{-1} .

Nota: Los controles fueron sumergidos en PDB al 2% NaCl para biol. La temperatura de enfrentamiento con el biol fue de 34°C y la Antártida a 16°C. En el enfrentamiento con la bacteria de suelo antártico se procedió a centrifugar a 5000 RPM por 20 min 50 ml por muestra, y se resuspendió en 5 ml de agua Ultrapura.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de las pruebas de antagonismo, se someterán a análisis estadísticos (ANOVA, etc.) para confirmar los supuestos y estudiar los resultados.

3 Resultados

Los resultados obtenidos a través del enfrentamiento en medio líquido mostraron una reducción de 1log sólo en concentraciones de 100% (usando concentraciones similares de 10^8 cel./ml) de bacteria aislada de biol y Antártica, por lo cual se decidió usar el 100% de la concentración del agente de biocontrol para el ensayo.

Los resultados de la inhibición del *V. vulnificus* en las ostras extraídas se muestran en las figuras 1 y 2. Para la inoculación del *V. vulnificus* en las ostras extraídas se usaron concentraciones similares de 10^8 cel./ml para ambos tratamientos (biol y suelo Antártico).

El tratamiento realizado con “Biol NA” y “Biol A” presentaron una reducción de la población de *V. vulnificus* de 0,24 y 0,75 log, respectivamente. Por otro lado, el tratamiento realizado con “Ant A” y “Ant NA” dio una reducción a los 3 días de 0,24 log y 0,27 log respectivamente; y una reducción final de la población de *V. vulnificus* de 3,14 log y 1,64 log, respectivamente. Mostrando así una reducción representativa del patógeno por parte del tratamiento con “Ant A”.

Tabla1. Resultados del tratamiento con la bacteria de Biol.

Muestra	Concentración Promedio [log]	Error Estándar	T-Test	Disminución del patógeno
Control 1	3,294	0,163	---	---
Biol NA 1	3,054	0,539	0,433	0,24
Biol A 3	2,543	0,284	0,051	0,75

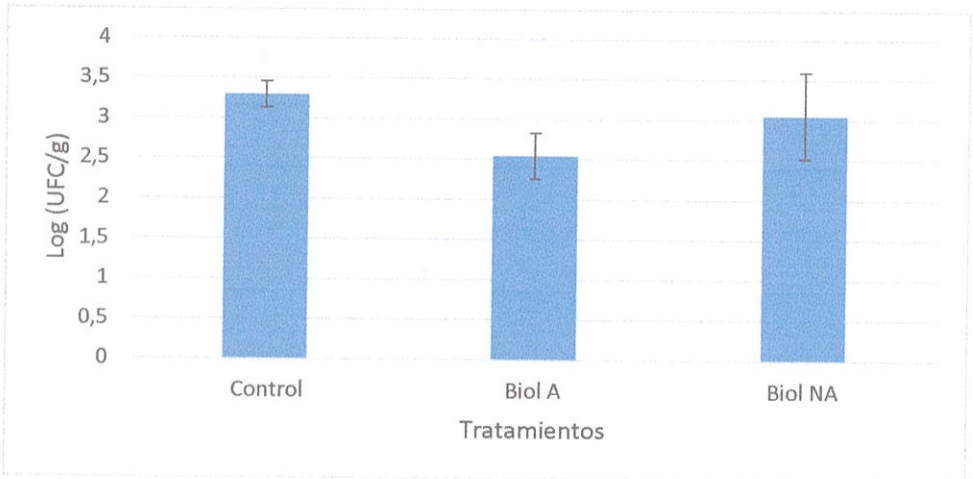


Figura 1 Inhibición del *V. vulnificus* inoculado en las ostras extraías por parte de bacterias del biol

Tabla2. Resultados del tratamiento con la bacteria de suelo Antártico.

Muestra	Concentración Promedio [log]	Error Estándar	T-Test	Disminución del patógeno
Conteo a 0 días				
Control	1,36	0,06	---	---
Conteo a 3 días				
Control	2,44	0,96	---	---
Ant. A	2,19	0,35	0,83	0,24
Ant. NA	2,16	0,56	0,83	0,27
Conteo a 8 días				
Control	3,14	0,43	---	---
Ant. A	*	*	0,02	3,14
Ant. NA	1,50	0,20	0,07	1,64

(*) No existe logaritmo de 0

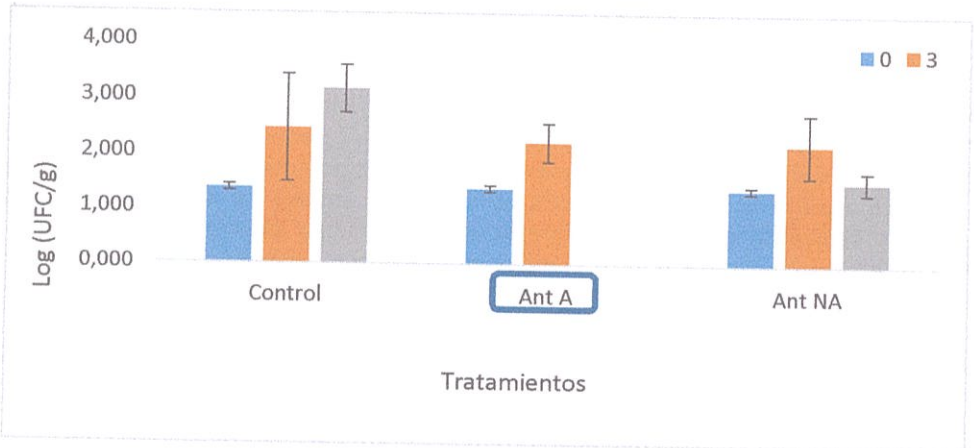


Figura 2 Inhibición del *V. vulnificus* inoculado en las ostras extraídas por parte de bacterias de suelo antártico

4 Discusión

La prueba de biocontrol que abarca el uso de las bacterias aisladas de biol como agente antagonista, no pudo observarse una reducción significativa de la población

final de *V. vulnificus*, puesto que los resultados obtenidos a través del t-test mostraron valores de 0.43 para el enfrentamiento con "Biol NA" (no llevado al Autoclave) y 0.051 para el enfrentamiento con "Biol A" (llevado al Autoclave). Por otro lado, lo que logramos observar es una mayor reducción del patógeno al emplear el tratamiento de "Biol A", lo cual puede deberse a que al ser sometida a alta presión y temperatura en el autoclave, se produce el rompimiento de la membrana celular de las bacterias cultivadas y se liberan metabolitos intracelulares y componentes antimicrobianos que son producidos por la bacteria pero no son liberados [28] [29].

La prueba de biocontrol realizada con las bacterias aisladas de suelo antártico como agente antagonista, mostraron una reducción significativa sólo en el tratamiento "Ant A" (llevada al autoclave) al cabo de 8 días de enfrentamiento. Sin embargo, la reducción obtenida en el tratamiento "Ant NA" (no llevada al autoclave), no mostró resultados significativos. Estos datos están respaldados por el t-test que mostró como resultados, valores de 0.02 y 0.07 para los tratamientos de "Ant A" y "Ant NA" respectivamente. Como anteriormente se resaltó, el previo sometimiento de la bacteria antagonista a las condiciones proporcionadas por el autoclave, puede influenciar positivamente en el tratamiento mostrando mejores resultados. Estudios varios expuestos en el Boletín Antártico Chileno, corroboran la producción de compuestos de naturaleza proteica, como bacteriocinas, que actúan como biocontroladores frente a *Vibrios*. Estudios en conjunto con el Dr. Wong, encontraron bacterias con la capacidad de inhibir patógenos transmitidos por alimentos. Llevando incluso a la obtención de un compuesto producido por una de ellas con capacidad antagonica, frente bacterias Gram-negativas, a concentraciones de 0.5 a 16 µg/ml [32].

Se conoce que uno de los primeros métodos de acción que un agente antagonista tiene frente a un patógeno es la capacidad de éste de adherirse a tejidos. De esta manera, el agente de biocontrol ejerce una competencia contra el patógeno. Teniendo en cuenta que la ostra es un organismo filtrador por naturaleza, facilita la entrada de microorganismos a su sistema. Al llevar a cabo este ensayo se utilizan ostras extraídas, lo que elimina por consiguiente la acción del filtrado, obligando a las bacterias a ingresar por difusión, pudiendo demorar el tiempo de acción del agente de biocontrol ya que necesita más tiempo para alcanzar al patógeno y ejercer competencia contra éste como primer recurso. Lo cual puede verse reflejado en la poca reducción del patógeno al final de los tratamientos en los que el antagonista no fue expuesto al autoclave [30].

Según Verschuere et al., en general los efectos antimicrobianos están ligados a los siguientes factores: bacteriocinas, lisozimas, proteasas, y/o ácidos orgánicos que alteren los niveles de pH, sea por separado o combinación, [30]. Sin embargo, los efectos de estos compuestos antimicrobianos pueden verse disminuidos bajo la presencia de materia orgánica, ya que estos se fijarían a dicha materia y no actuarían contra el patógeno [31] [29]. Puesto que el tratamiento con biol se lleva a cabo a temperaturas de 34°C, se puede presentar una mayor cantidad de materia orgánica por descomposición de las ostras, afectando la efectividad del mismo. Por otro lado, el tratamiento con bacteria de suelo antártico se realizó a temperaturas de 16°C

pudiendo ralentizar la antes mencionada descomposición, evitando la presencia de materia orgánica, teniendo un mejor desempeño en el biocontrol.

5 Conclusiones

Finalmente, el tratamiento “Ant A” es el que demostró mejor desempeño de antagonismo hacia el *Vibrio vulnificus*, tanto para el periodo de exposición de 3 días como para el de 8 días. Aunque de acuerdo al t-test el tratamiento con un periodo de exposición de 8 días es el único que demostró reducir significativamente la presencia de *V. vulnificus*, este no puede ser considerado un tratamiento de biocontrol efectivo debido a que, para poder ser considerado como tal, este tratamiento debería reducir en 5 log la presencia del patógeno.

Por otro lado, los resultados de los tratamientos con la bacteria de Biol no fueron significativos, es decir, no redujeron significativamente la presencia de *V. vulnificus*.

6 Agradecimientos

Agradecemos a Dios y nuestros padres Manuel Estrella Angueta y Yolanda Avila Gomez; Julio Insuasti Secaira y Jina Hidalgo Zambrano, por el apoyo constante que nos dieron a lo largo de nuestros estudios y en la vida. A nuestras familias y amigos en general que se han presentado con buenos deseos.

A nuestros Tutores, Juan Manuel Cevallos y Lizette Serrano por el apoyo y guía constante a lo largo de este estudio, y también para todos los integrantes del CIBE que de una u otra forma estuvieron involucrados con el trabajo y en especial a la Directora de la institución Daynet Sosa por permitimos realizar el proyecto en sus instalaciones. De igual manera agradecemos al CENAIM y CSA por sus colaboraciones en este trabajo.

7 Referencias Bibliográficas

- [1] R. Alvarez, L. Cobo y S. Sonnenholzner, «Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador,» Food and Agriculture Organization, FAO, n° 12, pp. 129-133, 2008.
- [2] A. Lovatelli, A. Fariás y I. Uriarte, «Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina,» Food and Agriculture Organization, FAO, n° 12, pp. 129-133, 2008.

- [3] MAGAP, «Acuerdo Ministerial N° 023: Instructivo para el ordenamiento, control de concesiones y fomento de las actividades de maricultura en el Ecuador,» Guayaquil, 2015.
- [4] FishStatsJ Software. FAO, Capture Production: Quantity and Value 1950-2013, Roma, 2015.
- [5] J. D. Oliver, «Vibrio vulnificus: Death of the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology, » *Microbial Ecology*, vol. 65, n° 4, pp. 793-799, 2013.
- [6] C. o. D. C. a. P. CDC, «National Enteric Disease Surveillance: COVIS Annual Summary, 2013, » Atlanta, 2015.
- [7] Pulsenet, PulseNet America Latina y Caribe, 2015. [En línea]. Disponible: <http://fos.panalimentos.org/Default.aspx?alias=fos.panalimentos.org/pulsenet>
- [8] E. Pérez, «Inocuidad de Alimentos,» 2009. [En línea]. Disponible: http://bvs.panalimentos.org/local/file/CD_CURSO_%20AVANZADO_WH0_GSS_COSTA_RICA_2009/05_viernes_1%20mayo/Atribucion_Sirveta_Enrique%20Perez.pdf.
- [9] B. S. Mahmoud, «Controlling Vibrio vulnificus and spoilage bacteria in fresh shucked oyster using natural antimicrobials, » *Letters in Applied Microbiology*, vol. 58, pp. 1-7, 26 Agosto 2013.
- [10] N. Bisharat, V. Agmon, R. Finkelstein, R. Raz, B.-D. G, L. L, S. Soboh y e. all, «Clinical, epidemiological, and microbiological features of Vibrio vulnificus biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteremia in Israel, » *THE LANCET*, pp. 1421-1424, 1999.
- [11] U. Messelhäuser, J. Colditz, D. Thäringen, W. Kleih, C. Höller y U. Busch, «Detection and differentiation of Vibrio spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods, » *International Journal of Food Microbiology*, vol. 142, n° 3, pp. 360-364, 2010.
- [12] A. Newton, M. Kendall, D. J. Vujia, O. L. Henna y B. E. Mahon, «Increasing Rates of Vibriosis in the United States, 1996-2010: Review of Surveillance Data from 2 Systems, » *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, pp. 5391-5395, 2012.
- [13] G. J. C. Murillo y S. C. F. Tamayo, «Análisis comparativo de los halos de inhibición d dos probióticos comerciales en Vibrio vulnificus, Vibrio harveyi y Vibrio parahaemolyticus,» Guayaquil, 2010.
- [14] A. Palou, J. J. A. A. Badiola, A. Bosch, J. Cacho, A. Cameán, A. Cepeda, L. Domínguez, R. Farré, M. Juárez, B. Martín, A. Más, T. Ortega, A. Otero, P. Paeiro y E. Rodríguez, «Informe del Comité Científico de la Agencia

Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección,» España, 2010.

- [15] D. Villacréz, L. I. Díaz, P. Herrera, F. Naranjo, A. Vargas, E. Sierra, D. Freire, P. Edgar, J. Paez y J. Zurita, «Sepsis por *Vibrio vulnificus*: reporte de dos casos en ciudades de altura en el Ecuador,» *Revista Médica Vozandes*, vol. 24, n° 1-2, pp. 53-58, 2013.
- [16] R. Lee, A. Lovatelli y L. Abadouch, «Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos,» FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), n° 511, p. 153, 2010.
- [17] A. Isnansetyo, I. Istiqomah, S. Sinansari y e. al., «A potential biocontrol agent, strain S2V2 against pathogenic marine *Vibrio* in aquaculture, » *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, n° 6, pp. 1103-1113, 2009.
- [18] C. Baker-Austin, J. McArthur, A. Lindell y e. al., «Multi-site analysis reveals widespread antibiotic resistance in the marine pathogen *Vibrio vulnificus*, » *Microbial Ecology*, vol. 57, pp. 151-159, 2009.
- [19] S. Zanetti, T. Spanu, A. Deriu, L. Romano, L. Sechi y G. Fadda, «In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment, » *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 17, n° 5, pp. 407-409, 2001.
- [20] D. Ottaviani, I. Bacchiocchi, L. Masini, F. Leoni, A. Carraturo, M. Giammarioli y G. Sbaraglia, «Antimicrobial susceptibility of potencial pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood, » *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 18, pp. 135-140, 2001.
- [21] P. Robertson, C. Dowd, C. Burrels, P. Williams y B. Austin, «Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, » *Walbaum. Aquaculture*, vol. 185, pp. 235-243, 2000.
- [22] L. Villamil, A. Figueras, M. Planas y B. Novoa, «Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics, » *Aquaculture*, vol. 219, pp. 43-56, 2003.
- [23] K. Vijayan, I. Brigh Singh, N. Jaayaprakash, S. Alavandi, S. Somnath Pai, R. Preetha, J. Rajan y T. Santiago, «A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potencial antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems, » *Aquaculture*, vol. 251, pp. 192-200, 2006.

- [24] R. Chythanya, I. Karunasagar y I. Karunasagar, «Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain, » *Aquaculture*, vol. 208, n° 1-2, pp. 1-10, 2002.
- [25] B. S. Mahmoud, «Controlling *Vibrio vulnificus* and spoilage bacteria in fresh shucked oysters using natural antimicrobials, » *Letters in Applied Microbiology*, vol. 58, pp. 1-7, 2014.
- [26] L. Serrano Mena, *Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida*, Guayaquil, 2014.
- [27] C. Kaysner y A. DePaola, *Bacteriological Analytic Manual*, Estados Unidos: 8th Edition, Food and Drug Administration (FDA), 2004.
- [28] A. Ravi, K. Musthafa, G. Jegathammbal y S. Pandian, «Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture, » *Letters in Applied Microbiology*, vol. 45, n° 2, pp. 219-223, 2007.
- [29] A. L.-M. Vigil, E. Palou y S. Alzamora, «Naturally Occurring Compounds - Plant Sources, » de *Antimicrobial in Food*, Estados Unidos de América, Taylor and Francis Group, 2005, pp. 429-452.
- [30] G. Gonzalez-Rocha, R. K. Sanchez y K. Alegría, «Bacterias antárticas: un potencial para la producción de compuestos con actividad entibacteriana,» *Boletín Antártico Chileno*, vol. 29, n° 1, pp. 9-10, 2010.
- [31] L. Verschuere, G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Verstraete, «Probiotic Bacteria as Biological Control Agent in Aquaculture, » *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, n° 4, pp. 655-671, 2000.
- [32] M. Loretz, R. Stephan y C. Zweifel, «Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: a literature survey, » *Food Control*, vol. 21, pp. 791-804, 2010.