



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA
Y CIENCIAS DEL MAR

OPTIMIZACION DE UN MODELO EXPERIMENTAL EN LARVAS
DE CAMARON *Penaeus vannamei* PARA EL CONTROL DE
INFECCIONES POR *Vibrio harveyi* (CEPA E22) MEDIANTE
LA UTILIZACION DE *Vibrio alginolyticus* (CEPA ILI).

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de:
ACUICULTOR

Presentada por

Javier Serrano Marín

GUAYAQUIL - ECUADOR

1996

DEDICATORIA

A DIOS y a mis padres : Tomás y Jenny

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar tengo que agradecerle a DIOS y a Nuestra Santísima Virgen María por darme la vida y la inteligencia para poder desarrollar esta tesis de grado. A Ellos les debo todo esto.
- A mis padres Tomás y Jenny por el apoyo paternal, moral y económico y darles mil gracias por la herencia más preciada que un hijo puede recibir : el estudio. Gracias Papás. También a mis 3 hermanos y a mi abuelita.
- A Carmen Ontano Moreno por su apoyo sentimental e incondicional y darme esa fuerza que un hombre debe tener para soportar cerca de un año en un Centro de investigación y alejado de su familia. Por creer en mí y soportarme todo este tiempo. T.E. A.M.O.
- Al CENAIM y al Dr. Jorge Calderón por darme la oportunidad de realizar mi tesis de grado.
- A mi director de tesis Dr. Eric Louis Mialhe por su guía en mi trabajo. Quiero agradecer aunque no nos acompañe más en este mundo a Lucía Carrera, mi primera directora. QEPD.
- Un agradecimiento especial a Lorena y Mara por enseñarme muchas cosas. Gracias.
- Otro agradecimiento especial a Lorena Schwarz por luchar por los derechos de los estudiantes de tesis.
- Y a mis **AMIGOS** que realmente crean tener derecho sobre este trabajo (No digo nombres para evitar resentimientos y OJO : ¡No todos que creen ser mis amigos lo son!).

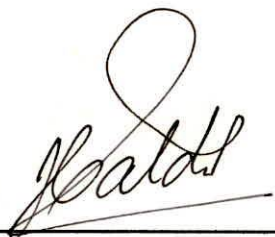
DECLARATORIA EXPRESA

" 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".

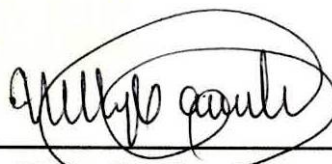
(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



Javier Serrano Marín



Jorge Calderón, Ph.D.
Presidente del Tribunal



Nelly Camba, Dra.
Miembro del Tribunal



Eric Mialhe, Ph.D.
Director de tesis

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. Larvicultura del camarón en Ecuador.....	4
1.2. Problemas patológicos en larvicultura de camarón.....	5
1.2.1. Enfermedades virales en larvicultura de camarón.....	6
1.2.2. Enfermedades bacterianas en larvicultura de camarón.....	7
1.3. Prevención y control de enfermedades bacterianas en cultivo de camarón.....	9
1.3.1. Diagnóstico.....	9
1.3.1.1. Técnicas clásicas de diagnóstico bacteriano.....	10
1.3.1.2. Nuevas técnicas de diagnóstico bacteriano.....	11
1.3.2. Utilización de antibióticos.....	15
1.3.3. Utilización de probióticos.....	16
2. MATERIALES Y METODOS	19
2.1. Material Biológico..	19
2.1.1. Animales.....	19
2.1.2. Cepas bacterianas.....	19

2.1.3. Anticuerpos.....	20
2.2. Metodología.....	20
2.2.1. Diseño Experimental.....	20
2.2.2. Infecciones Experimentales.....	21
2.2.3. Técnicas de bacteriología.....	22
2.2.3.1. Preparación de medios de cultivo.....	22
2.2.3.2. Siembra y preparación de bacterias para infecciones experimentales.....	23
2.2.3.3. Siembra de bacterias para colony-blot.....	24
2.2.4. Técnica de inmunodiagnóstico.....	25
2.2.4.1. Preparación de reactivos.....	25
2.2.4.2. Técnica de colony-blot.....	26
2.2.5. Análisis estadístico.....	27
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	28
3.1. Experimento n. 1.....	29
3.2. Experimento n. 2.....	32
3.3. Experimento n. 3.....	35
3.4. Experimento n. 4.....	38
3.5. Experimento n. 5.....	41
CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES.....	50
ANEXOS.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquematización del experimento n. 1.....	30
Figura 2.	Esquematización del experimento n. 2.....	33
Figura 3.	Esquematización del experimento n. 3.....	36
Figura 4.	Esquematización del experimento n. 4.....	39
Figura 5.	Esquematización del experimento n. 5.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Concentraciones de diferentes antibióticos y agentes quimioterapéuticos utilizados usualmente en laboratorios de larvas de camarón.....	16
Tabla 2.	Experimento n.1: Interacción de ILI y E22 con larvas de <i>P. vannamei</i> . Concentración utilizada : 1×10^3 UFC /ml con un tiempo de exposición de 24 horas. El estadio de infección inicial fue en nauplio 5. Los macerados de larvas y siembra de agua se realizaron en agar TCBS con análisis de porcentajes de colonias amarillas y verdes. El colony blot y las observaciones sintomatológicas se efectuaron a las 48 horas de la primera infección.....	31
Tabla 3.	Experimento n. 2: Interacción de ILI con E22 a intervalos de tiempo de 24 horas. Concentración utilizada para ILI : 1×10^3 UFC / ml y para E22 : 1×10^7 UFC / ml. El estadio de infección inicial fue en nauplio 5. Macerados de larvas y siembra de agua se realizó en Agar marino y las observaciones al microscopio se efectuó 48 y 72 horas después de la primera infección.....	34
Tabla 4.	Experimento n. 3: Interacción de ILI con E22 a intervalos de tiempo de 48 horas a concentraciones de 1×10^3 UFC / ml y 1×10^7 UFC / ml respectivamente. El estadio de infección inicial fue en nauplio 5 y se realizaron controles sin bacterias infectados en Zoea 1 con ILI y E22. Macerados y siembra de agua se realizaron en agar TCBS y pruebas de colony blot se realizaron 72 horas después de la primera infección.....	37
Tabla 5.	Experimento n. 4: Evaluación de diferentes concentraciones de cepa E22 (1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 UFC/ml) interactuando con cepa ILI (1×10^3 UFC / ml) a intervalos de 24 horas en estadio de infección nauplio 5. Estimación del efecto patógeno de E22 (1×10^7 UFC / ml) en estadio Zoea 1.....	40

Tabla 6. Experimento n. 5: Evaluación de dos concentraciones de cepa E22 (1×10^3 y 1×10^7 UFC/ml) interactuando con cepa ILI (1×10^3 UFC / ml) a intervalo de 24 horas con estadio de infección inicial en nauplio 5. Estimación del efecto patógeno de E22 en estadio Zoea 1 con análisis de macerados de larvas sembrados en TCBS después de la primera infección.....	43
---	----

ABREVIATURAS

Ac	: Anticuerpo
ADN	: Acido Desoxirribonucleico
ARN	: Acido Ribonucleico
BALBC	: Cepa de ratones susceptibles
BCIP	: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato en Dimethylformamida
BP	: <i>Baculovirus penaei</i>
DO	: Densidad óptica
EDTA	: Etilén diamino tetra-acético
E22	: Cepa de <i>Vibrio harveyi</i>
IHHNV	: Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus
ILI	: Cepa de <i>Vibrio alginolyticus</i>
KCl	: Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	: Fosfato de Potasio Monobásico
MgCl ₂	: Cloruro de Magnesio
NBT	: Nitro blue tetrazolium
NaCl	: Cloruro de Sodio
Na ₂ HPO ₄	: Fosfato de Sodio Dibásico
PBS	: Tampón fosfato salino sin Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺
RAPD	: Random Amplified polymorphism DNA (Patrones de polimorfismos por amplificación aleatoria)
SRD	: Síndrome del rostro deforme
S2	: Cepa de <i>Vibrio harveyi</i>
μl	: Microlitro
UV	: Ultravioleta
Tween 20	: Polyoxyethylene-sorbitán monolaurate

- 2B6 : Anticuerpo monoclonal contra *Vibrio harveyi*
2C9 : Anticuerpo monoclonal contra *Vibrio alginolyticus*
158 : Cepas de *Vibrio alginolyticus*

RESUMEN

En laboratorios de larvas de camarón, como una alternativa a los antibióticos para el control de enfermedades bacterianas está la utilización de bacterias probióticas.

Recientemente, fue desarrollado un modelo de estudio de las interacciones de la larva de *Penaeus vannamei*, en estadio zoea 1, con la cepa ILI (*Vibrio alginolyticus*) y/o cepa E22 (*Vibrio harveyi*) sospechosas de probiosis y patogenicidad respectivamente. Sin embargo, fue difícil controlar las experimentaciones debido a procesos de precolonización por bacterias contaminantes presentes en las larvas o el agua.

El presente trabajo tuvo como primer objetivo la determinación de parámetros experimentales que permitan obtener la monocolonización del tubo digestivo de la larva y subsecuentemente, facilitar el análisis de las interacciones bacteria probiótica-patógena-camarón. Un criterio importante fue el de utilizar larvas desinfectadas con Argentine y en estadio nauplio 5 considerando que el tubo digestivo es axénico.

En la práctica, se ha demostrado que es posible controlar los procesos de monocolonización a pesar de la existencia de bacterias contaminantes que pueden ser capaces de participar más o menos en dicho proceso.

Para la determinación de la naturaleza patógena de la cepa E22 de *Vibrio harveyi*, parecería necesaria una fuerte infección (1×10^7 UFC/ml) para reproducir entre 2 y 4 días los síntomas de "bolitas".

La cepa ILI de *Vibrio alginolyticus* es no patógena para las larvas en el estadio nauplio 5, al menos cuando es introducida a una concentración relativamente baja (1×10^3 UFC/ml). Los resultados del colony-blot demuestran que la cepa ILI tiene una buena capacidad de colonización.

Basado en la modificación del modelo nauplio 5 desinfectado con Argentine es casi posible controlar la monocolonización y evitar la presencia de bacterias contaminantes. La monocolonización por parte de E22 resulta más o menos patógena en duración de 2 a 4 días. La monocolonización por parte de ILI es aparentemente no patógena y no tiene efecto negativo sobre las larvas. La infección ILI/E22 a intervalos de tiempo, demuestra que ILI tiene capacidad de evitar, en un gran porcentaje, la colonización secundaria de E22 y, la infección E22/ILI a intervalos de tiempo demuestra que ILI tiene capacidad de desplazar en menor grado a E22.

En base a los resultados de este trabajo, se considera que la cepa ILI podría ser utilizada como posible probiótico teniendo la capacidad de competir con cepas de *Vibrio harveyi* en larvas de *Penaeus vannamei*.

INTRODUCCION

El cultivo de camarón en el Ecuador constituye una de las principales industrias generadoras de divisas ocupando el tercer lugar en importancia económica después del petróleo y del banano.

Al inicio de la industria en los años 70, las granjas acuícolas se abastecían de postlarvas del medio natural. A partir de 1979, fue necesario explorar alternativas al aprovisionamiento de larvas silvestres debido a la demanda cada vez mayor ligada al rápido crecimiento del sector camaronero y a las fluctuaciones cuantitativas y espacio-temporales de este tipo de larvas. Así, se emprendió la construcción de laboratorios debidamente equipados para obtener regularmente larvas en sistemas artificiales.

Sin embargo estos sistemas artificiales, caracterizados por altas densidades de larvas y altas concentraciones de alimento, mostraron ser favorables para la proliferación de microorganismos, en particular bacterianos, introducidos en los laboratorios por los reproductores o por los dispositivos de aprovisionamiento de agua.

Los datos relacionados a bacterias asociadas a larvas de camarones son limitados. Por una parte, esta carencia es a causa de que las herramientas de identificación no están bien adaptadas a estudios epidemiológicos de gran envergadura necesarios para una determinación muy amplia de las asociaciones bacteria-camarón. Por otra parte, existe una carencia de estudios sobre la naturaleza de estas asociaciones. Sin embargo por referencia a los datos disponibles relacionados a las bacterias de camarón y de manera más general a la bacteriología médica, se puede considerar que ciertas bacterias son patógenas mientras que otras son constituyentes de la flora normal del camarón, siendo algunas eventualmente competitivas con cepas patógenas y consideradas por ello como probióticas.

Ante los problemas de mortalidades de larvas en los laboratorios y teniendo en cuenta la ausencia de métodos de diagnóstico, los productores adoptaron como estrategia de prevención la utilización sistemática de antibióticos a dosis relativamente bajas, y esto sin tomar en consideración la diversidad de bacterias presentes en el tubo digestivo de las larvas. Esta práctica no discriminatoria ha conducido a fenómenos de resistencia bacteriana a los antibióticos, haciendo que enfermedades bacterianas tales como el síndrome de "bolitas" se vuelvan casi imposible de controlar.

Los productores exploraron una estrategia alternativa basada en la utilización de cepas de bacterias, que estén presentes en situaciones normales en el tubo digestivo de las larvas y que podrían ser capaces de limitar el desarrollo de bacterias patógenas. Este concepto de cepa "probiótica" ha sido practicado de manera empírica con éxito variable. La falta de confiabilidad de esta práctica es ciertamente debida en parte al hecho de que las cepas bacterianas eran escogidas solamente en base de su presencia en situación normal, sin que fuera demostrado previamente una capacidad probiótica real. Por otra parte, la falta de confiabilidad debe también ser relacionada con el hecho de que la bacteria, incluso si ella era efectivamente probiótica, era utilizada sin considerar el momento de la puesta en contacto con las larvas, la duración de esta contaminación y sin determinar la concentración óptima de utilización de la bacteria probiótica. De hecho, era imposible demostrar la capacidad probiótica de una cepa bacteriana y luego elaborar y optimizar un protocolo de utilización de esta cepa, debido a la falta de un método que permita detectarla y cuantificarla específica, rápida y fácilmente. Tal método es absolutamente necesario para analizar experimentalmente las interacciones entre la bacteria probiótica y el camarón, en ausencia o en presencia de bacterias patógenas. Estos diferentes requisitos han sido progresivamente cumplidos por una cepa de *Vibrio alginolyticus* denominada III, cuya capacidad probiótica ha sido inicialmente intuída en base de datos de laboratorio (Morales, 1992) y para la cual se ha puesto a punto una inmunopruueba de tipo colony-blot con anticuerpos monoclonales específicos (Donoso, com. pers.).

En base a estas informaciones y métodos, se desarrolló un modelo de estudio de las interacciones de la larva de *Penaeus vannamei* en los estadios zoea I y zoea II con la cepa ILI de *Vibrio alginolyticus* y/o la cepa E22 de *Vibrio harveyi*, responsable del síndrome de "bolitas". *In vitro*, mediante cultivos mixtos de bacterias ILI y E22, se estableció que la bacteria ILI no tiene actividad bactericida contra E22 pero crece mucho más rápidamente (Zhermandt, 1996). *In vivo*, la patogenicidad de la cepa E22 ha sido confirmada, mientras que la cepa ILI se ha mostrado no patógena. Sin embargo, estos experimentos revelaron que las larvas en los estadios zoea I y zoea II ya tienen su tubo digestivo colonizado por bacterias que están presentes en el medio y que interfieren con las bacterias ILI y/o E22, lo que no permitió demostrar con seguridad la capacidad probiótica de la cepa ILI frente a la cepa E22 (San Miguel, 1996).

Basándose en estos diferentes resultados se consideró primordial intentar de controlar el proceso de colonización del tubo digestivo de las larvas, siendo más fácil determinar la naturaleza de cualquier bacteria en situación de monocolonización. En lo que respecta a una bacteria intuída como probiótica su monocolonización del tubo digestivo, previa a la puesta en contacto de la larva con una bacteria patógena, corresponde también a una situación ideal en términos de demostración de la capacidad probiótica de una cepa dada. Teniendo en cuenta que en las larvas de camarón la boca no es funcional hasta el estadio de Nauplio V, se emprendió el presente trabajo teniendo como primer objetivo la determinación de parámetros experimentales que permitan controlar la monocolonización del tubo digestivo en este estadio larvario y posteriormente el análisis de las interacciones bacterias probióticas-bacterias patógenas-camarón.

1. ANTECEDENTES

1.1. LARVICULTURA DEL CAMARON EN ECUADOR

El cultivo del camarón se inició en Ecuador a finales de los años 60 con la especie *Penaeus vannamei* que fue determinada como la más adecuada en base a estudios y ensayos preliminares (Horna, 1987). En 1968 existían 283 hectáreas de piscinas construídas, superficie que aumentó progresivamente hasta alcanzar 6.475 hectáreas en 1976. En 1977 el cultivo de camarón experimentó un desarrollo acelerado que llevó a una fuerte estructuración del sector camaronero convirtiéndose en una actividad industrial (Cámara Nacional de Acuicultura, 1995).

En 1979, en Anconcito (Guayas), se construyó el primer laboratorio de larvas de camarón (Semacua), bajo tecnología y asesoría francesa (Akamine, 1993). Seguidamente la construcción de laboratorios fue relativamente lenta ya que en 1984-85 se contaba apenas con cuatro nuevos laboratorios correspondientes a una producción anual de 300 millones de postlarvas. La mayoría de estos laboratorios fueron diseñados para la obtención de nauplios de maduración lo que enfrentó problemas debido a la ausencia en el país de técnicos especializados en el proceso de maduración de *Penaeus vannamei*. (Dpto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991).

En el año 1983-84 la costa ecuatoriana se vio afectada por el fenómeno de "El Niño", que ocasionó abundancia de larvas silvestres seguida en 1984-85 por una gran escasez. Esto obligó a importar larvas de otros países y a construir laboratorios, estando el 70% de ellos ubicados en la Península de Santa Elena (Guayas) (Arellano, 1993). Así en 1986, operaban alrededor de 40 laboratorios a lo largo de la costa ecuatoriana con una producción anual aproximada de 2 billones de postlarvas (Dpto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991).

De 1986 a 1989 proliferaron laboratorios muy rudimentarios con personal técnico entrenado localmente, tales instalaciones funcionaban a bajo costo contribuyendo así a la baja del precio de las larvas (Barniol, 1995). El largo período de escasez de larvas silvestres condujo, a partir de 1989, al aumento del número de laboratorios y de su producción (Libro blanco del camarón, 1993). Hoy en día, de las 343 instalaciones existentes, 122 son “desovaderos” o nauplieras, 197 laboratorios de cría larvaria y 24 de tipo integrado con departamentos diseñados para la maduración de los reproductores (Barniol, 1995). Esta proliferación de laboratorios hizo que las larvas de laboratorio, que abastecían el 16% de la demanda en 1988, representaran el 60% en 1992, es decir 8.4 millones de larvas (Libro blanco del camarón, 1993).

1.2. PROBLEMAS PATOLOGICOS EN LARVICULTURA DE CAMARON

Con el desarrollo de la larvicultura aparecieron y se multiplicaron varios problemas patológicos que han afectado grandemente al sector camaronero. En efecto, la larvicultura depende de nauplios o de reproductores colectados en el medio silvestre y susceptibles consecuentemente de ser infectados, lo que puede ocasionar la introducción de microorganismos a través del agua, algas y/o artemia. Su transmisión es luego favorecida por la alta densidad de cultivo de larvas y, debido a la riqueza en materia orgánica contribuye a la proliferación de las bacterias (Ukeles and Bishop, 1975; Leibovitz, 1979; Austin and Allen, 1981; Igarashi et al., 1989 y Dehasque et al., 1993 *fide* Garriques y Arévalo, 1995).

Los virus y las bacterias son responsables de las principales enfermedades en larvas de peneidos mientras que protozoarios y hongos son de menor importancia y se conoce muy poco sobre las enfermedades no infecciosas por ejemplo de origen tóxico o nutricional (Lightner, 1992).

1.2.1. Enfermedades virales en larvicultura de camarón

Cerca de 11 virus han sido reportados como agentes causantes de enfermedades en cultivos de larvas de peneidos (Lightner, 1990). Conviene señalar en particular el *Baculovirus penaei* BP que afecta el hepatopáncreas y ocasiona mortalidades, ocasionalmente de tipo epidémicas, en laboratorios de larvas de *Penaeus vannamei*. (Akamine y Moores, 1989 *fide* Lightner, 1984). La otra enfermedad viral particularmente importante es ocasionada por el densovirus IHHNV (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus), y corresponde al síndrome del rostrum deforme (SRD) asociado a fenómenos de enanismo.

Es importante indicar que el impacto real de enfermedades virales sobre la producción de larvas de laboratorio es probablemente subestimado debido a la falta de métodos de diagnóstico confiables. En efecto el diagnóstico de virus de camarones reposa en la actualidad esencialmente sobre exámenes microscópicos de preparaciones histológicas para detectar la presencia de viroplasmas que corresponden a la acumulación de proteínas y de ácidos nucleicos virales, y que contienen también, en el caso particular de baculovirus, proteínas cristalizadas bajo la forma de poliedros. Sin embargo, el reconocimiento del viroplasma puede mostrarse difícil y corresponde a un criterio de diagnóstico poco confiable. Por este hecho el diagnóstico puede concernir solamente estados tardíos de la multiplicación viral lo que conduce a subestimar la tasa de infección debido a que todos los animales en fase inicial de la infección no serán reconocidos. Una alternativa al diagnóstico microscópico reposa sobre la utilización de sondas moleculares, anticuerpos o sondas nucleicas, que permiten practicar pruebas extremadamente sensibles. Recientemente, este tipo de tecnología ha sido introducida para el diagnóstico de ciertos virus de camarón (Barniol, 1995).

1.2.2. Enfermedades bacterianas en larvicultura de camarón

En Ecuador, varias enfermedades bacterianas han afectado la producción de laboratorios de cría larvaria causando mortalidades en peneidos cultivados, especialmente en estadios larvales, postlarvales y juveniles (Johnson, 1978; Lightner, 1983 *fide* Lightner, 1984). Estas enfermedades se presentan como septicemias generalizadas, erosiones de la cutícula de la superficie del cuerpo, apéndices, lesiones internas como en músculos, vísceras y agallas, septicemias generalizadas o como infecciones del tubo digestivo asociadas a fenómenos de diarreas (Lightner, 1983 *fide* Lightner, 1984). En microscopía fotónica y electrónica, es posible observar a nivel del tubo digestivo y del hepatopáncreas lesiones asociadas a estas infecciones. (Mialhe, com. pers.)

Bacterias aisladas a partir de larvas enfermas han sido identificadas frecuentemente como miembros del grupo de vibrios (Egidius, 1987 *fide* Hameed, A.S. Sahul, 1995). En base a veinte y uno pruebas bioquímicas y morfológicas se han determinado como asociadas al camarón aproximadamente veinte especies de *Vibrios spp* : *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. damsela*, *V. fischeri*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. nereis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius*, *V. penaeicida*, *V. splendidus I.*, *V. splendidus II.*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus* (Solis, 1996).

De las especies de vibrios descritos en Bergey's Manual Systematic Bacteriology, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, y *V. harveyi* han sido catalogados como patógenos en camarones peneidos (Vanderzant et al., 1970; Lightner and Lewis, 1975; Lightner, 1983 and 1988; Takahashi et al., 1984 and 1985 *fide* Hameed, A.S. Sahul, 1995).

La especie *Vibrio harveyi* es particularmente importante desde el punto de vista de su impacto sobre la producción de larvas en Ecuador y en otros países de América Latina. En efecto, esta bacteria parece ser la responsable del síndrome conocido inicialmente

como "bolitas" y posteriormente también como "luminiscencia" y que ha sido observado desde 1988 en laboratorios de larvas de *Penaeus vannamei*. Los síntomas de la enfermedad consisten en una descamación de las células del hepatopáncreas e intestino de la larva, que en pocas horas mueren perdiendo casi el 100% de la población. Estas células están libres en el tubo digestivo y se presentan bajo forma globosa, de allí el nombre de síndrome de "bolitas" (Morales, 1993).

Se considera que esta enfermedad parece correlacionarse con los cambios experimentados en la calidad del agua, lo que a su vez afectan a las algas y que se ve agravada por los altos contajes bacterianos, bajas temperaturas y nauplios débiles. Se ha reportado el uso de altas concentraciones de antibióticos y filtración del agua para el control de las "Bolitas" con relativo éxito (Dpto. de Comercio de los Estados Unidos, 1991).

La importancia de esta enfermedad bacteriana ha conducido a tomar en cuenta criterios que permiten sobrepasar el estatus de especie que es establecido en base a la identificación bioquímica. Por referencia a la bacteriología médica y en menor grado a la bacteriología de peces y de moluscos está la utilización de criterios antigénicos y genéticos. Así, se han preparado en Ecuador anticuerpos contra *V. harveyi* (Mendoza, com.pers.) y posteriormente contra *V. alginolyticus* (Donoso, com.pers.). Recientemente se han realizado los primeros trabajos sobre la caracterización genética de las mismas bacterias, basada en diferentes tipos de marcadores moleculares (Motte E., com.pers.).

Una alternativa para el control de enfermedades causadas por bacterias consiste en la utilización de bacterias probióticas. Aprovechando los conocimientos sobre la utilización de este tipo de bacterias en otras áreas como en salud humana, en donde los resultados de sus beneficios están bien documentados, por ejemplo el uso de bacterias digestivas beneficiosas (Gilliland 1979, Sandine 1979 *fide* Garriques and Arévalo 1995).

1.3. PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES BACTERIANAS EN CULTIVO DE CAMARÓN

Las técnicas y control de las enfermedades bacterianas de camarón han sido practicadas de manera empírica desde los inicios de su cultivo a excepción de algunos laboratorios sofisticados, con una falta evidente de análisis adecuados referente a metodologías bacteriológicas utilizadas para la caracterización, identificación y cuantificación de las bacterias asociadas al camarón. De hecho, la mayoría de estas bacterias son mal conocidas desde un punto de vista taxonómico y biológico, lo que vuelve difícil la definición de métodos de prevención y de control de enfermedades cuando no se conoce bien contra qué bacteria hay que luchar.

La prevención y control de enfermedades bacterianas en cultivo de camarón deben ser considerados, de manera crítica para las prácticas utilizadas hasta la actualidad, y de manera estratégica para las prácticas recomendables en el futuro.

1.3.1. Diagnóstico

En todas las situaciones de enfermedades, el diagnóstico debe ser considerado de dos maneras diferentes, la primera cuando se trate de caracterizar e identificar el agente responsable de una nueva enfermedad, o la segunda cuando se trata de detectar un agente previamente identificado y caracterizado como causante de una enfermedad dada. Esta consideración es particularmente importante en patología de camarón donde muy pocas enfermedades tienen una etiología claramente establecida, siendo solamente unas cuantas de origen bacteriano. Para caracterizar y finalmente identificar una bacteria relacionada a una nueva enfermedad, se puede poner en práctica un conjunto amplio de técnicas para determinar un número suficiente de criterios. Al contrario, para detectar una bacteria responsable de una enfermedad conocida, la técnica de diagnóstico debe ser específica y sensible pero también lo más simple y rápida posible.

En bacteriología del camarón, el diagnóstico se ha basado hasta el momento en técnicas clásicas, mientras que aparecen progresivamente técnicas modernas.

1.3.1.1. Técnicas clásicas de diagnóstico bacteriano

Los biólogos de la mayoría de laboratorios de cultivo de larvas efectúan en rutina controles bacteriológicos de sus instalaciones, es decir sistemas de bombeos, filtros, algas, tanques de cultivo y las larvas. Sin embargo, los análisis son muy simples y limitados a contajes de bacterias sobre medios no selectivos de tipo agar marino paralelamente a contajes sobre el medio TCBS, selectivo para vibrios. Sobre este medio las colonias aparecen de color amarillo o verde según la capacidad de las bacterias a metabolizar o no la sacarosa. En base a este criterio, la mayoría de técnicos se han habituado a considerar la presencia de una mayoría de colonias verdes como sintomático de una situación anormal. Esta costumbre es explicada esencialmente por las observaciones hechas luego de mortalidades causadas por *Vibrio harveyi* en el síndrome de "bolitas". La validez de esta asunción evidentemente es equívoca ya que ella consiste en considerar que todos los vibrios no capaces de metabolizar la sacarosa son patógenos lo que puede conducir frecuentemente a los técnicos a tomar medidas totalmente erróneas ya que no reposan en ninguna recomendación confiable.

Las técnicas de identificación bioquímica son puestas en práctica de manera ocasional por los técnicos del laboratorio cuando se encuentran confrontados a problemas de mortalidades. En esta situación, un pequeño número de colonias aisladas de animales enfermos pueden ser analizadas, por ejemplo con la ayuda de sistemas tipo galería API 20E.

Este tipo de herramienta para identificar bacterias de camarón, en particular vibrios, tiene sus limitaciones ya que está ligada al hecho de que estas herramientas han sido concebidas para el diagnóstico de bacterias de interés médico, esencialmente de

enterobacterias patógenas del hombre. Por ello, hay una gran falta de conocimiento sobre las bacterias asociadas al camarón, esto desde un punto de vista taxonómico y subsecuentemente desde el punto de vista epidemiológico y biológico.

Finalmente, estos métodos de bacteriología clásica tienen limitaciones, principalmente relacionadas con el tiempo requerido para la preparación de muestras y la obtención de resultados a corto plazo; por tanto no son útiles para aplicarlos en gran escala. Además no son adecuados para cuantificar infecciones y para diagnóstico de enfermedades causadas por virus (Mialhe et al., 1995).

1.3.1.2. Nuevas técnicas de diagnóstico bacteriano

Además de la modernización de las técnicas de diagnóstico, la bacteriología de camarones se ha abierto hacia diversas tecnologías con miras a mejorar la caracterización, la identificación y el diagnóstico. Estas nuevas tecnologías se basan esencialmente en tomar en cuenta caracteres antigénicos y genéticos de las bacterias con la ayuda de anticuerpos y de sondas nucleicas.

Microplacas de identificación

En lo que concierne a la modernización de técnicas de identificación bacteriana, se han iniciado trabajos para los grupos bacterianos de mayor importancia en larvicultura de camarón. Inspirándose en los sistemas miniaturizados puestos a punto para la bacteriología médica, se ha elaborado una nueva herramienta basada en la utilización de una microplaca de 96 (noventa y seis) pozos en la cual se disponen 6 series de 16 medios de cultivo dispuestos en doble columna. Estos medios permiten caracterizar con confiabilidad las especies bacterianas de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Photobacterium* asociadas a camarones (Solís Arturo,

1996).

Anticuerpos e inmunopruebas

Por referencia a los trabajos en bacterias de importancia médica y en bacterias de peces, los criterios antigénicos son particularmente interesantes de considerar para las bacterias de camarones en términos de caracterización, identificación y detección, esto con la ayuda de anticuerpos específicos que deben ser preparados en animales de laboratorio debido a que solo los vertebrados tienen un sistema inmunitario en el que intervienen inmunoglobulinas. Conviene además considerar la naturaleza policlonal o monoclonal de los anticuerpos ya que sus características y subsecuentemente sus usos son muy diferentes.

Los anticuerpos policlonales son cualquier antisuero preparado al inyectar a un animal con un antígeno y que contiene una heterogeneidad de población de anticuerpos (Singleton & Sainsbury, 1993). Estos anticuerpos corresponden a inmunosueros, es decir que las inmunoglobulinas que ellos contienen reaccionan de manera más o menos fuerte frente a antígenos presentes, en el inicio de las inmunizaciones y, finalmente en las muestras. Así, si la inmunización es efectuada con suspensiones bacterianas, los inmunosueros van a contener una mezcla compleja de anticuerpos que reaccionan frente a numerosos antígenos presentes en las bacterias.(Anexo 1)

Los anticuerpos monoclonales son poblaciones de anticuerpos idénticos que reconocen el mismo determinante específico en un antígeno simple o complejo (Singleton & Sainsbury, 1993). Estos anticuerpos corresponden a un solo tipo de inmunoglobulinas que tienen una estricta especificidad frente a un solo antígeno o epítipo, es decir una parte de una molécula presente por ejemplo en una bacteria dada (Anexo 2).

En lo que concierne a la bacteriología de camarones, aún existen solo unos pocos anticuerpos policlonales y monoclonales que hayan sido producidos contra vibrios (Song et. al., 1992).

Teniendo en cuenta la relación antigénica existente entre las diferentes especies y cepas de vibrios, los anticuerpos policlonales no constituyen buenos reactivos de diferenciación sino por el contrario son buenos reactivos para poner en evidencia similitudes antigénicas. En efecto, la reacción de anticuerpos policlonales con antígenos existentes en diferentes cepas va a impedir reconocer la reacción de estos anticuerpos con antígenos específicos. Al contrario, los anticuerpos monoclonales son excelentes reactivos para distinguir cepas en base de antígenos específicos que son reconocidos estrictamente por estos anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja sobre los policlonales de poder ser purificados y preparados bajo la forma de solución homogénea y altamente concentrada, lo que permite desarrollar inmunopruebas estandarizadas y altamente sensibles (Mialhe et al. 1992). En el caso del diagnóstico bacteriano, en particular en los laboratorios de larvas de camarón, el tipo de inmunoprueba mejor adaptada corresponde al colony-blot (Anexo 3). En efecto, éste permite poder determinar, en una muestra dada, el número de bacterias de un tipo antigénico dado, y la proporción de estas bacterias en relación a la población bacteriana total. Inmunopruebas basadas en colony-blot han sido desarrolladas para cepas patógenas de *Vibrio harveyi* y la cepa ILI de *Vibrio alginolyticus*, estudiada como probiótica.

Las pruebas de tipo colony-blot, utilizando anticuerpos monoclonales específicos de bacterias patógenas, van a permitir detectar de manera precoz la aparición de estos agentes en todos los puntos de los laboratorios. Así, podrán ser puestas en marcha las medidas mejor adaptadas a cada tipo de contaminación: desinfección de filtros, cambio de cepas de algas, desinfección de nauplios con antibióticos, tratamiento con antibióticos,

aplicación de probiótico.

En el caso de utilización de probiótico, las pruebas colony-blot con anticuerpos monoclonales serán bastante útiles para controlar su presencia mayoritariamente en los tanques de cultivo y en las larvas.

Sondas nucleicas

Una sonda nucleica consiste en un fragmento monocatenario de un ácido nucleico (ADN o ARN) marcado, que tiene la propiedad de hibridarse por complementariedad de las bases nucleotídicas con el ADN o ARN complementario. Este fragmento es específico de la secuencia que complementa, de ahí su gran interés en el diagnóstico para detectar directamente la presencia de esa secuencia, por ejemplo un gen de toxina. La técnica se basa en la detección de una porción específica de material genético del microorganismo.

La elaboración de una sonda nucleica como un instrumento de diagnóstico posibilita poder detectar una enfermedad antes de la aparición de los primeros síntomas y poder tomar medidas zooprofilácticas a fin de evitar la propagación del patógeno. Las sondas nucleicas representan una tecnología relativamente reciente para la caracterización y la identificación de cepas bacterianas y es posible reconocer cepas patógenas y no patógenas de una especie bacteriana.

Actualmente esta herramienta ha comenzado a ser aplicada en la identificación de bacterias asociadas al camarón, especialmente cepas de *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus* asociados a *Penaeus vannamei*.

En conclusión, las técnicas de diagnóstico en sus versiones modernas, van a contribuir grandemente a la prevención y al control de enfermedades bacterianas del camarón.

1.3.2. Utilización de antibióticos

Se han utilizado diferentes tipos de antibióticos y compuestos antimicrobianos para tratar de controlar las bacterias patógenas o reducir su número total (Austin & Austin, 1993 *fide* Austin B. et al., 1995).

El control de los problemas bacterianos se ha realizado de forma muy empírica, basándose en el uso rutinario de antibióticos a bajas concentraciones, generalmente subletales, lo que ha conducido al desarrollo de cepas resistentes. Además prácticamente nunca se ha intentado detener la aparición de fenómenos de resistencia utilizando los antibióticos de manera combinada y alternativa, esto considerando sus diferentes modos de acción (Mialhe, et al, 1995).

Una de las desventajas en la utilización de antibióticos es su efecto no específico por el cual son eliminadas además de las bacterias patógenas, bacterias de la flora normal o bacterias probióticas. Por otra parte, el uso masivo y generalizado de antibióticos conducen a problemas de contaminación ambiental y de su presencia en estado de trazas en tejidos de camarones lo que va a constituir un obstáculo para la comercialización (Garriques & Arévalo, 1995).

En la tabla a continuación, son presentados los antibióticos y agentes quimioterapéuticos más utilizados en laboratorios comerciales así como sus concentraciones y modo de acción :

	Acción	conc.ppm	Observaciones
•Cloranfenicol	Antibacteriano	1-10	Bacteriostático e inhibe la transferencia de péptidos
•Entromicina	Antibacteriano	0.5 - 1.3	Bacteriostático e inhibe la elongación de la cadena de péptidos durante la síntesis de proteína.
•Tetraciclina	Antibacteriano	1-10	Bacteriostático e inhibe la síntesis de proteína
•Verde Malaquita	Antiprotozoario	5-9 ppb	Controla crecimientos de protozoos
•Treflán	Antifúngico	0.01-0.1	Fungicida y peturba los fosfolípidos de la membrana
•Formalina	Antiséptico	10 - 25	Bactericida y fungicida, desnaturalizan las proteínas y disuelven las membranas de lípidos
•EDTA	Antibacteriano	10 - 50	Complejo de iones de Ca^{++} y Mg^{++}

TABLA 1.- Concentraciones de diferentes antibióticos y agentes quimioterapéuticos utilizados usualmente en laboratorios de larvas de camarón (Lightner 1977 y 1988, Sunaryanto 1986, Baticados 1988 *fide* Brock & Lightner 1990), (Bell & Lightner 1991), (Prescott, Harley and Klein, 1993) y (Wyban & Sweeney 1991).

1.3.3. Utilización de probióticos

El término probiótico es definido por Smoragiewicz (1993) como: "Preparaciones que contienen microorganismos y cuando sus metabolitos son utilizados como aditivos alimenticios afectan al huésped de una manera beneficiosa. En la mayoría de los casos, los probióticos incluyen microorganismos que son capaces de crecer y/o funcionar en el tracto digestivo del animal".

Algunas teorías explican el incierto papel del mecanismo de acción de los probióticos en sistemas acuícolas :

- Competitividad por sitios de fijación con bacterias patógenas
- Mejoramiento de la nutrición por nutrientes esenciales suplementarios
- Mejoramiento de la digestión por enzimas esenciales suplementarias
- Eliminación directa de materia orgánica disuelta mediada por la bacteria
- Producción de sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas

(Garriques y Arévalo, 1995).

Uno de los factores más importantes para el uso de bacterias probióticas es que permiten la posibilidad de reemplazar el uso de antibióticos para el control de enfermedades. Los probióticos no matan otras bacterias pero compiten con ellas, inhibiendo su desarrollo y conllevando a la restauración del balance biológico (Smoragiewicz, 1993).

En agricultura, el uso de probióticos para el control de enfermedades, sobre todo bacterias Gram-negativas como *Lactobacillus*, ha sido reportado con resultados satisfactorios como una alternativa al uso de antibióticos (Fuller & Turvey, 1971; Parker, 1974, Roach & Tannock, 1980; Smoragiewicz, Bielecka, Boutard y Dubeau, 1993 *fide* Austin B. et al., 1995).

Ha sido bien documentado el uso de bacterias digestivas beneficiosas en nutrición de humanos y animales (Guilland & Speck, 1977; Sandine, 1979 *fide* Garriques & Arévalo, 1995). *Lactobacillus acidophilus* es utilizado comúnmente para controlar y prevenir infecciones por *Escherichia coli* y otros microorganismos patógenos en el tracto intestinal de muchos animales terrestres (Morishita et al., 1971; Tortuero, 1973; Muralidhara et al., 1977; Elliger et al., 1980 *fide* Garriques & Arévalo, 1995).

Maeda y Liao (1992) aislaron e identificaron una cepa de bacteria de un extracto de suelo que aumentó la supervivencia y el porcentaje de muda en larvas de *Penaeus monodon*. Se ha reportado el uso de probióticos en laboratorios comerciales de *P. vannamei* (Daniels, 1993; Garriques & Wyban, 1993 *fide* Garriques & Arévalo, 1995) surgiendo como una alternativa al uso de antibióticos en las estrategias de control de enfermedades en larvas de camarón (Austin et al., 1995).

Se han realizado estudios para aislar y desarrollar sistemas de cultivo masivo de cepas de *Vibrio alginolyticus* del mar para utilizarlas en tanques de larvas de *Penaeus vannamei*. El objetivo fue el de demostrar cómo la bacteria mejora el crecimiento y la supervivencia de la larva comparado con la utilización de antibióticos como profilaxis en infecciones experimentales. Las dos cepas de *Vibrios* utilizadas no mostraron efecto patógeno (Garriques y Arévalo, 1995).

La habilidad en el manejo de la flora bacteriana en sistemas de cultivo mediante la inoculación de bacterias beneficiosas es una alternativa viable para la industria del camarón en el futuro (Garriques y Arévalo, 1995). De esta manera, se podrá establecer progresivamente un catálogo de cepas presentes en situaciones normales y aquellas específicamente aisladas luego de fenómenos de mortalidades. Por referencia a la bacteriología médica, esta primera etapa conducirá a estudiar más en detalle la biología y la epidemiología de las cepas más importantes, patógenas o probióticas, estas informaciones van a permitir una lucha más eficaz contra las primeras y a explorar mejor estas últimas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. Animales

Para las infecciones experimentales se utilizaron larvas de *Penaeus vannamei*, en estadio larvario nauplio 5 de procedencia de dos laboratorios ubicados en la Península de Santa Elena : VANALARVA y PLAYAESPEC S.A..

2.1.2.- Cepas bacterianas

Se utilizaron dos cepas bacterianas para realizar las infecciones experimentales:

ILI (*Vibrio alginolyticus*)

E22 (*Vibrio harveyi*)

La cepa ILI fue aislada e identificada bioquímicamente como *Vibrio alginolyticus* por Ileana Morales en 1994, de una muestra de agua de mar en el laboratorio de larvas de camarón EBISA.

Esta cepa bacteriana ILI fue utilizada como probiótico en los experimentos de infecciones y tiene la característica que sus colonias que crecen en agar TCBS son de color amarillo.

La cepa bacteriana E22 fue aislada en 1994 por Jenny Aráuz (com. pers.) de un laboratorio de larvas de camarón con el síndrome de “bolitas” y fue identificada bioquímicamente como *Vibrio harveyi* .

La cepa E22 fue utilizada como la bacteria patógena en las infecciones experimentales y

tiene la característica de que sus colonias son de color verde en TCBS y presentan luminiscencia.

2.1.3. Anticuerpos

Se utilizaron dos anticuerpos monoclonales 2B6 y 2C9 para la detección específica de las cepas bacterianas IL1 y E22 respectivamente, que fueron obtenidos mediante la técnica de hibridación linfocitaria previo a la inmunización de ratones BALB-C.

El anticuerpo 2B6 es utilizado sin diluir debida que proviene del sobrenadante de hibridomas mantenidos en cultivos *in vitro*.

El anticuerpo 2C9 es utilizado a una dilución 1 / 10.000 porque proviene de hibridomas producidos en líquido ascítico de ratones BALB-C.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en este trabajo fue un sistema completamente aleatorio. Un sistema completamente aleatorio es cuando los tratamientos son asignados completamente al azar de modo que cada experimento tiene la misma oportunidad de recibir cualquiera de los tratamientos. Para este tipo de diseño experimental, cualquier diferencia entre las unidades experimentales que reciben el mismo tratamiento es considerado como error experimental.

Es de mencionar que el diseño completamente aleatorio es solamente apropiado para experimentos con unidades experimentales homogéneas, donde los efectos ambientales son relativamente fáciles de controlar.

2.2.2. Infecciones experimentales

Los nauplios de *Penaeus vannamei* llegaron a la sala de experimentaciones del CENAIM en fundas plásticas con agua a salinidad de 35 UPS y luego colocados en un recipiente-naupliera donde eran lavados y desinfectados con Argentine (1 ml/15 lt por 5 minutos). El agua de mar utilizada para los experimentos era filtrada por cartuchos de piola (filtros de 5, 1 y 0.5 μ) y esterilizada por tratamiento de lámparas ultravioleta UV (AQUANETICS SYSTEMS, INC).

Las botellas de capacidad de 3,5 litros fueron colocadas en bandejas de fibra de vidrio (90,7 x 71,2 x 29 cm) y se utilizó el sistema de baño María para mantener la temperatura a 28°C - 29°C regulada por un termostato (THERMAL COMPACT 200 W). En los cajones se utilizaba agua dulce desinfectada con una pastilla de cloro concentrada (15 gramos) para evitar contaminación de una botella a otra.

La aireación se suministró a las botellas por medio de mangueras que se conectaban a los orificios de salida de aire de una tubería de PVC que se encontraba encima del sistema, propiedad de la sala de experimentación. Estas mangueras, a su vez, se conectaban a las pipetas de pasteur que eran taponadas con algodón para evitar una posible contaminación de bacterias de botella a tubería o entre botellas. (Ver anexo 4)

Se procedió a la siembra de animales en las botellas a una densidad de 100 larvas / litro colocando 200 nauplios en los recipientes y su estadio inicial fue en nauplio 5. Las larvas se alimentaron con algas (*Chaetoceros* sp. y *Clorella* sp.) a una concentración de 50.000 células / ml y con zooplankton (rotíferos) a una densidad de 4-5 animales / larva solo en zoea 3 y mysis 1. La alimentación se proporcionó una vez al día.

Las bacterias se inocularon a las larvas en estadio nauplio 5 y zoea 1 siendo el tiempo de exposición de 24 y 48 horas dependiendo del experimento. Para eliminar las bacterias que no se fijaron a las larvas se efectuaron recambios cercanos al 100% y 20-30% en días

posteriores a la infección para desechar la materia orgánica y mantener una buena calidad de agua.

Conociendo que las larvas presentan fototropismo positivo se ubicó un foco de 60 W cerca de los recipientes y se recogían las larvas con una pipeta volumétrica de boca ancha, para evitar daños al animal, colocándolas en otra botella previamente lavada, desinfectada y con agua tratada con concentraciones de algas anteriormente indicada. Se utilizó este tipo de recambio para eliminar las bacterias no fijadas al animal y además se causaba un stress mucho menor a las larvas.

Los recambios posteriores a las infecciones se realizaron mediante sifoneo utilizando una manguera con varios agujeros dentro de un tubo de PVC y tapado con una malla de 200 μ , para disminuir la presión del agua sobre las larvas y evitar que las mismas se adhieran a la malla.

Los materiales utilizados para los bioensayos como mangueras, pipetas pasteur, llaves de paso de aire, etc., eran lavados y desinfectados con jabón neutro y autoclavados por 30 minutos a 121°C y 15 libras de presión. Las botellas se desinfectaron con cloro (1/2 pastilla / 20 litros) y Thiosulfato de Sodio (10 gramos / 20 litros), para luego ser lavadas con jabón neutro y secadas.

2.2.3. Técnicas de bacteriología

2.2.3.1. Preparación de medios de cultivo

Medio sólidos

Thiosulfate Citrate Bile Salts Agar, TCBS (BACTO[®], DIFCO LABORATORIES): Es un medio selectivo para vibrios. Para preparar se disuelven 89 gramos de agar TCBS en 1 litro de agua destilada ajustando la concentración de NaCl (WAKO PURE CHEMICAL

INDUSTRIES, LTD.) a un 2% del volumen y se lleva a ebullición hasta evitar la presencia de grumos. Este medio no debe ser autoclavado por lo que debe trabajarse con materiales completamente estériles.

Agar Marino (BACTO[®], DIFCO LABORATORIES) : Es un medio específico para bacterias marinas donde pueden crecer distintas especies. Para preparar se disuelven 55,1 gramos de agar marino en un litro de agua destilada ajustando la concentración de NaCl a un 2% del volumen y autoclavando (SIBATA SCIENTIFIC TECHNOLOGY LTD. modelo DS-300) por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión. Una de las características del agar marino es que al solidificarse es algo duro siendo necesario añadir Bacto-Agar (BACTO[®], DIFCO LABORATORIES) al 0,25 % del volumen total.

Medios líquidos

Tryptic Soy Broth, TSB (ACUMEDIA[™], MANUFACTURERS, INC) : Es un medio de cultivo que permite el crecimiento de distintas especies de bacterias. Se prepara disolviendo 30 gramos de TSB en un litro de agua destilada ajustando la concentración de NaCl a un 2% del volumen y autoclavando por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.

2.2.3.2. Siembra y preparación de bacterias para infecciones experimentales

Se tomaron 5 µl del stock de bacterias a -80 °C y se sembró en tubos con 5 ml de caldo de cultivo TSB. Esta siembra se incubó a 28°C en baño María con agitación constante durante 8 horas para recuperar a las bacterias del medio sólido a líquido. Como se debe realizar la siembra en condiciones de asepsia se trabajó en la cámara de flujo laminar (AIR TECH, modelo BC).

La suspensión bacteriana (5 ml) se sembró en 200 ml de TSB con 2% de NaCl incubando

a 28°C por 8 horas en agitación constante para luego ser centrifugado (KOKUSN ENSINKIB CO. LTD., modelo H-103 N) a 3.500 rpm por 10 minutos. El sedimento fue resuspendido en 40 ml de Solución salina al 2,5% de NaCl e incubado a 28°C por una hora en agitación constante para reactivar las bacterias.

Se realizó la lectura al espectofotómetro (SHIMADZU UV-2100) a 550 nm de longitud de onda para determinar el número de bacterias presentes en la suspensión. Una DO (densidad óptica) equivale a $1,2 \times 10^9$ bacteria / ml.

Se hacen los cálculos respectivos para determinar el volumen exacto de la suspensión bacteriana por botella y proceder a infectar las larvas.

2.2.3.3. Siembra de bacterias para colony-blot

Toma de muestras

De cada botella se tomaron 25 animales en estadio zoea y 10 larvas en mysis. Las muestras fueron tomadas a la recepción de los nauplios, 24-48-72 horas y al final de cada experimentación.

Las muestras de agua de cada botella se tomaron *in situ*.

Siembra de macerado de larvas y agua

Las larvas recogidas para macerar, fueron lavadas con agua de mar estéril para eliminar bacterias superficiales y restos de materia orgánica que se encuentren en la cutícula. Una vez limpias se procedió a macerarlas en microtubos Eppendorf hasta obtener una masa pastosa la cual se resuspendió en 100 µl de solución salina al 0.85% de NaCl.

El homogenizado de larvas fue sembrado en agar marino y TCBS y se lo expandió sobre el agar con una varilla de vidrio previamente flameada con alcohol, para luego incubarlo a

28°C por 8 horas. A continuación se efectuó la cuantificación utilizando el contador de colonias (SIBATA) y la observación de luminisecia en las cajas Petri y se colocaron las membranas de nitrocelulosa para el Colony-blot.

De la muestra de agua de las botellas se sembraron 100 μ l en agar marino y TCBS haciendo diluciones 10^{-2} y 10^{-3} e incubando a 28°C por 8 horas.

2.2.4. Técnica de inmunodiagnóstico

2.2.4.1. Preparación de reactivos

Tampón PBS (phosphate buffer saline), por 1 litro :

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	2,9 g
KCl	0,2 g
Azida de Sodio	0,2 g

Tampón Fosfatasa alcalina , por 1 litro :

NaCl	5,84 g
MgCl ₂	0,5 g
Tris-base	12,11 g

BCIP : Disolver 25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoly fosfato en 0,5 ml de dimethyl-formamida.

NBT : Disolver 25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua desionizada.

EDTA 2 mM : 50 ml de EDTA 0,5 M diluído en 25 ml de PBS.

Tween 20 (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.).

2.2.4.2. Técnica de Colony - Blot

Después de incubar de 6-8 horas el cultivo bacteriano realizado en cajas Petri con agar TCBS y agar marino, se colocaron las membranas de nitrocelulosa (82,5 mm de diámetro con poros de 0,45 μ m) durante 5 minutos en la superficie del agar donde crecieron las colonias bacterianas. Estas membranas fueron mantenidas en una caja Petri vacía, con las colonias de bacterias en la parte superior, dejándolas secar por 30 minutos y conservándolas en refrigeración hasta su utilización para realizar el test.

Para bloquear las membranas, a fin de evitar reacciones inespecíficas, se incubaron con una solución de PBS - leche descremada (MIRAFLORES) al 5 % del volumen, una por caja Petri, agitando suavemente por 60 minutos a temperatura ambiente (Ver anexo 4). Después de la incubación se realizó 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS-Tween 20 (0,1%).

Se depositó el primer anticuerpo monoclonal (2B6, 2C9) sobre las membranas, diluido en solución de PBS-Tween 0,1%-leche descremada 0,5% para 2C9 (específico para E22) y sobrenadante de cultivo sin diluir para 2B6 incubando por 60 minutos a temperatura ambiente y agitando suavemente. Posteriormente se efectuaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS-Tween 2 (0,1%).

Las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo, conjugado a la enzima fosfatasa alcalina por 45 minutos a temperatura ambiente y la dilución utilizada para el anticuerpo fue de 1 / 10.000 en PBS-Tween 20 (0,1%)-leche descremada 0,5%. Fueron realizados 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS-Tween 20 (0,1%) para eliminar el excedente de anticuerpos.

Finalmente, las membranas fueron incubadas con la solución sustrato preparada al instante:

- BCIP(5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato).....33 μ l
- NBT (Nitro Blue Tetrazolium).....66 μ l
- Tampón Fosfatasa Alcalina.....10 ml

Este proceso se efectuó cubriendo las membranas en oscuridad y cuando las manchas alcanzaron la intensidad deseada, la reacción enzimática se detuvo lavando la membrana con EDTA 2mM (50 ml de EDTA 0,5 M diluido en 25 ml de PBS).

Técnica del Protocolo Manual Antibodies con algunas modificaciones descritas en tesis de grado de E. Donoso (1996) (CENAIM).

2.2.5. Análisis Estadístico

Solo se analizaron los datos de supervivencia por medio de un 1-way Análisis de Varianza (ANOVA). Cuando se encontraba diferencia significativa entre tratamientos, se procedió a utilizar el test Duncan de rangos múltiples. El nivel de significancia utilizado fue de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

El conjunto de experimentos descritos en este capítulo han sido realizados con las dos cepas bacterianas, una intuída como probiótica y denominada ILI (*Vibrio alginolyticus*), la otra intuída como patógena y denominada E22 (*Vibrio harveyi*).

Este trabajo es la continuación de los realizados por San Miguel (1996) que estudió recientemente estas dos cepas en larvas *P. vannamei* en estadio zoea I y zoea II mediante infecciones experimentales simples o dobles. Se confirmó, de manera relativamente reproducible, la no patogenicidad de la cepa ILI y la patogenicidad de E22 en condiciones experimentales establecidas. El efecto probiótico de ILI frente a E22 no pudo ser demostrado claramente pero se sugirió la existencia de una competencia entre los dos tipos de bacterias en el proceso de colonización y de ocupación del tubo digestivo. Sin embargo se observó una variabilidad cualitativa y cuantitativa de las infecciones, lo que fue atribuído a la influencia de las bacterias presentes en el tubo digestivo en el momento de las infecciones con las cepas consideradas.

En el presente trabajo fue considerado prioritariamente la colonización monoespecífica, lo que ha conducido a realizar infecciones experimentales en nauplio 5, es decir antes de que la boca se abra. Se ha realizado el análisis de las interacciones entre las dos cepas bacterianas y la larva, teniendo siempre como objetivo determinar por una parte la naturaleza no patógena y patógena de ILI y E22 respectivamente, y por otra parte si la cepa ILI puede ejercer un efecto probiótico sobre la cepa E22.

Los bioensayos han sido analizados basándose en observaciones secuenciales que no fueron efectuadas en su totalidad para cada experimentación: (1) observación mediante microscopía de luz de los animales para detectar síntomas de "bolitas" y otras anomalías, (2) cantidad de UFC (unidad formadora de colonias) por larva o por ml. de agua de las

botellas, (3) estimación del porcentaje de las colonias amarillas y verdes, como posibles indicadores de la representación de las bacterias ILI y E22 respectivamente, (4) determinación del porcentaje de sobrevivencia al final del bioensayo, y (5) cuantificación de las bacterias inoculadas mediante inmuno-pruebas de tipo colony-blot.

3.1. EXPERIMENTO N. 1

Esta primera experiencia (ver figura 1) fue concebida principalmente para determinar si la contaminación de larvas en estadio nauplio 5, previamente desinfectadas por inmersión en una solución yodada (Argentine), conduce a una monocolonización del tubo digestivo, siendo las bacterias contaminantes (ILI ó E22) introducidas a una concentración de 1×10^3 UFC/ml. Luego de 24 horas se realizó un recambio del agua del 100%.

En el caso de dos contaminaciones sucesivas (ILI/E22 ó E22/ILI) la segunda bacteria fue introducida luego de la eliminación de la primera después del recambio de agua.

A fin de analizar los procesos de colonización, las colonias aisladas en agar TCBS fueron numeradas considerando su color, pudiendo las verdes corresponder a la cepa E22 de *Vibrio harveyi* posiblemente patógena, mientras que las amarillas podrían corresponder a la cepa ILI de *Vibrio alginolyticus*, intuída como probiótica.

La identificación confiable de las colonias fue realizada efectuando inmuno-pruebas en colony blot con los anticuerpos monoclonales específicos de cada cepa.

Otro objetivo de esta experimentación consistió en la verificación de la naturaleza patógena de E22 y probiótica de ILI, esta última habiendo sido puesta en contacto con las larvas un día antes o después que la bacteria E22.

Los resultados a 48 horas de todos los análisis son presentados en la tabla 2, así como las supervivencias a 72 horas. Según el análisis estadístico de los datos de supervivencia los resultados no mostraron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$). Las supervivencias

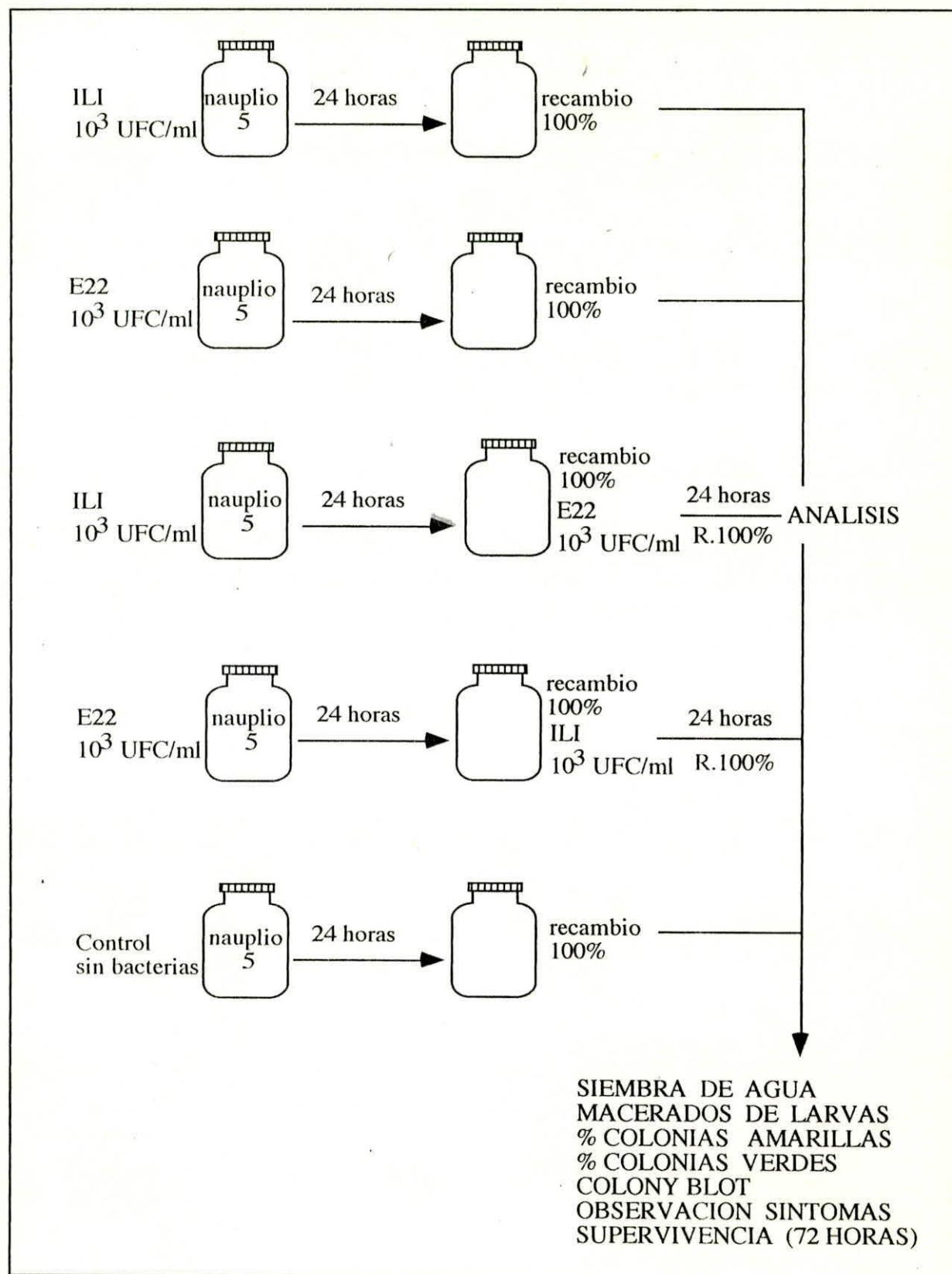


FIGURA 1. ESQUEMATIZACION DEL EXPERIMENTO N. 1

TABLA 2.- Experimento n.1 : Interacción de ILI y E22 con larvas de *P. vannamei*. Concentración utilizada : 1×10^3 UFC /ml con un tiempo de exposición de 24 horas. El estadio de infección inicial fue en nauplio 5. Los macerados de larvas y siembra de agua se realizaron en agar TCBS con análisis de porcentajes de colonias amarillas y verdes. El colony blot y las observaciones sintomatológicas se efectuaron a las 48 horas de la primera infección

Tratamiento réplica		48 horas									72 horas								Spv.	
		UFC/ml agua x 10 ³	% CA	% CV	UFC/ larva	% CA	% CV	Obs. síntomas Bolitas	Colony blot %col. + al ac. 2B6 2C9	UFC/ml agua x 10 ³	% CA	% CV	UFC/ larva	% CA	% CV	% Spv.	Promedio ± desviación estándar			
ILI	1	6.6	95	5	4	100	0	0,0%	70	-	-	-	-	-	-	93,6	85±7,6 a			
	2	1.6	100	0	3	100	0	0,0%	86	-	-	-	-	-	-	79,3				
	3	2.4	100	0	1	100	0	0,0%	-	-	-	-	1	100	0	82,1				
E22	1	7.2	95	5	4	30	70	20,0%	80	-	-	-	-	-	-	83,6	79,5±7 a			
	2	1.2	35	65	4	70	30	0,0%	50	-	-	-	-	-	-	83,6				
	3	0.6	0	100	6	20	80	0,0%	75	-	-	-	2	60	40	71,4				
ILI - E22	1	1,0	100	0	9	100	0	0,0%	-	-	-	-	1	100	0	86,4	84±3,5 a			
	2	1,6	90	10	9	45	55	0,0%	-	-	0,4	65	35	-	-	85,7				
	3	4,4	100	0	10	100	0	0,0%	-	-	-	-	3	100	0	80,0				
E22 - ILI	1	1,2	85	15	48	80	20	10,0%	38	45	-	-	2	65	35	74,3	76,4± 2,6 a			
	2	1,2	85	15	40	80	20	0,0%	21	42	0,4	75	25	1	100	0		75,7		
	3	0,2	100	0	36	100	0	0,0%	16	29	-	-	2	100	0	79,3				
CONTROL	1	-	-	-	13	100	0	0,0%	22	20	-	-	-	-	-	90,7	84,7 ±8,6 a			
	2	0,4	75	25	18	5	95	9,1%	0	0	0,2	70	30	-	-	78,6				
	*3	0,2	100	0	37	99	1	0,0%	80	20	-	-	1	100	0	*120,7				
ALGAS ESTADIO		7	100	0	ZOEIA 1						18	100	0	ZOEIA 2						

NOTA : ILI-E22 : Se infectó con E22 24 horas después de haber infectado con ILI previo a un recambio del 100%
E22-ILI : Se infectó con ILI 24 horas después de haber infectado con E22 previo a un recambio del 100%
UFC : Unidad formadora de colonias
% CA : porcentaje de colonias amarillas
% CV : porcentaje de colonias verdes
- : no hubo crecimiento
* : Sobrevivencia sobre el 100 %, es probable que se haya sembrado un excedente de nauplios
a : Las sobrevivencias no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$)

fueron similares entre los tratamientos observándose resultados del 70% y 90%. Igualmente, no se puede hacer ninguna conclusión sobre la patogenicidad de E22 en base a los síntomas de "bolitas" que fueron observados raramente en larvas correspondientes, pero también ocasionalmente en las larvas de las botellas control.

Según sobrevivencias y sintomatología del bioensayo la concentración de E22 a 1×10^3 UFC/ml es demasiada baja para inducir síntomas y mortalidades en 2 a 3 días. En lo referente a la colonización, parece que a pesar de la introducción precoz de las bacterias, ciertos contaminantes fueron capaces de participar activamente en el proceso de colonización. Sin embargo, como lo demuestra el colony - blot , las bacterias introducidas a una concentración de 1×10^3 UFC/ml en todos los casos fueron mayoritariamente representadas en las floras bacterianas de las larvas.

En fin, parece que la presencia de ILI previa a la introducción de E22 limita considerablemente la capacidad de colonización de esta última ya que en los dos casos solo las colonias amarillas fueron observadas y en el tercero un 45% correspondió a dichas colonias (ILI/E22). Además ILI parece capaz de desplazar a E22 (tratamiento E22/ILI) y de ser bien representada en las larvas como lo demuestran los colony-blot con los anticuerpos monoclonales 2B6 específicos de ILI.

3.2. EXPERIMENTO N. 2

Los objetivos de esta experimentación (ver figura 2) fueron similares de aquellos del bioensayo anterior, pero la bacteria E22 fue introducida a una concentración de 1×10^7 UFC/ml a fin de tratar de reproducir los síntomas de "bolitas" hasta 72 horas de haber iniciado el bioensayo, siendo las experimentaciones de esta duración fáciles de realizar. Mientras que en las larvas de las botellas controles y aquellas infectadas con ILI, prácticamente no fue posible observar casos de "bolitas", los síntomas fueron frecuentes en los casos de infecciones con E22 desde el segundo día y de manera más importante en ausencia de bacteria ILI.

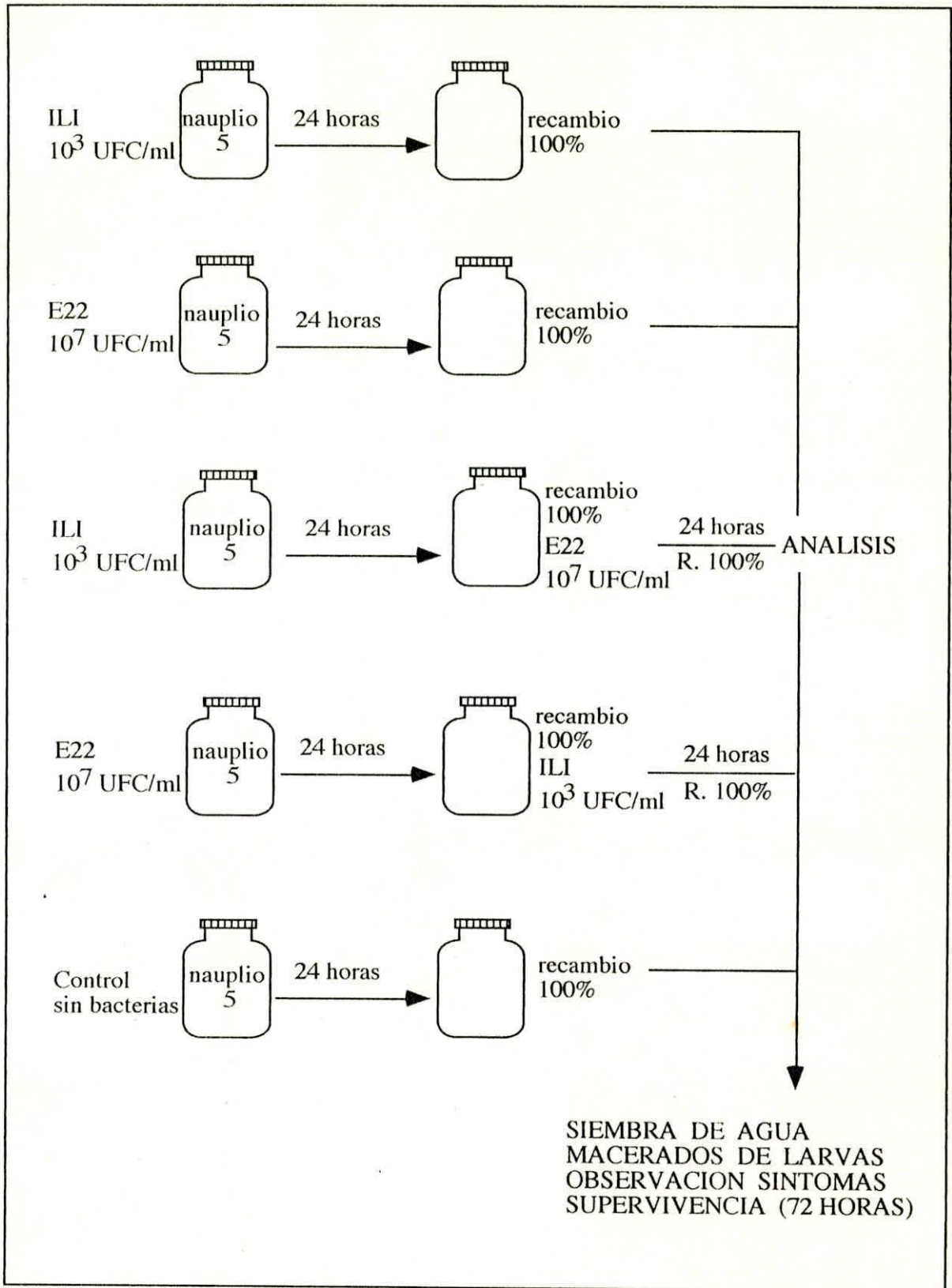


FIGURA 2. ESQUEMATIZACION DEL EXPERIMENTO N. 2

TABLA 3.- Experimento n. 2: Interacción de ILI con E22 a intervalos de tiempo de 24 horas.
 Concentración utilizada para ILI : 1×10^3 UFC / ml y para E22 : 1×10^7 UFC / ml.
 El estadio de infección inicial fue en nauplio 5. Macerados de larvas y siembra de agua se realizó en Agar marino y las observaciones al microscopio se efectuó 48 y 72 horas después de la primera infección

Tratamiento	Replicado	24 horas		48 horas			72 horas				Spv. Promedio ± desviación estándar
		UFC/ml agua	UFC/ larva	UFC/ml agua	UFC/ larva	Obs. síntomas Bolitas	UFC/ml agua	UFC/ larva	Obs. síntomas Bolitas	% Spv.	
		$\times 10^3$		$\times 10^3$			$\times 10^3$				
ILI	1	7,0	12	26,8	5	0,0%	91,0	10	11,1 %	68,4	65,2 ± 3,9 a
	2	4,0	14	20,2	13	10,0%	8,8	3	-	66,4	
	3	9,2	11	34,2	10	0,0%	5,8	4	-	60,7	
E22	1	64,0	38	20,4	7	40,0%	11,8	6	50,0%	42,9	40,7 ± 3,1 b
	2	42,0	37	12,8	7	75,0%	6,4	3	42,9%	37,1	
	3	30,0	41	10,6	4	12,5%	12,4	7	25,0%	42,1	
ILI - E22	1	10,0	13	258,0	3	42,9%	22,0	3	25,0%	36,4	46,9 ± 14,6 c b
	2	3,6	18	112,0	3	16,7%	-	2	-	40,7	
	3	3,8	12	30,0	6	22,2%	1316,0	1	-	63,6	
E22 - ILI	1	152,0	30	26,2	6	14,3%	19,0	5	28,6%	24,3	34 ± 9 b
	2	68,0	31	62,8	8	37,5%	12,6	3	40,0%	35,7	
	3	60,0	27	14,0	5	12,5%	19,4	4	25,0%	42,1	
CONTROL	1	12,0	8	16,2	3	0,0%	11,8	1	0,0%	70,0	66,7 ± 3,2 ca
	2	9,0	6	6,8	3	0,0%	10,4	1	0,0%	66,4	
	3	16,0	4	9,0	1	0,0%	12,4	1	14,3%	63,6	
ALGAS		1,4		5,2			5				
ESTADIO		ZOEA	1			ZOEA 1-2				ZOEA 2	

NOTA : ILI-E22 : Se infectó con E22 24 horas después de haber infectado con ILI, previo a un recambio del 100%

E22-ILI : Se infectó con ILI 24 horas después de haber infectado con E22, previo a un recambio del 100%

UFC : Unidad formadora de colonias

- : no hubo crecimiento

acb : Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$)

Estos resultados se reflejan en las tasas de supervivencia a las 72 horas que según el análisis estadístico de los datos (Tabla 3), mostró que las larvas infectadas con ILI y el control no infectado con bacterias no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre sí y obtuvieron porcentajes más elevados que las réplicas tratadas con el patógeno E22 y con las interacciones ILI/E22 y E22/ILI ($p < 0.05$).

Es de mencionar que los tratamientos ILI/E22 y el control sin bacterias no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Esto parece indicar que la cepa sospechosa de patogenicidad indujo a una menor supervivencia de 40,7 % comparada con los animales inoculados con ILI y los controles sin bacterias (61,2% y 66,7%) y en cuanto al efecto "protector" de ILI en las interacciones, se observaron aparentemente mejores supervivencias cuando se inocula primero ILI y después E22 aunque estadísticamente no hay diferencias significativas.

3.3. EXPERIMENTO N. 3

Esta experiencia (ver figura 3) fue realizada siguiendo los mismos objetivos que la precedente, dos lotes suplementarios fueron considerados para determinar el futuro de las bacterias ILI y E22 cuando son introducidas tardíamente, en el momento correspondiente a la eliminación de las bacterias de la primera infección y la adición de las bacterias de la segunda infección.

Las larvas infectadas con ILI (1×10^3 UFC/ml), precoz o tardíamente, tuvieron un desarrollo excelente y según el análisis estadístico (Tabla 4) la tasa de supervivencia fue alta (81,6%) y no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a los animales de los lotes de control.

La infección precoz por E22 (1×10^7 UFC/ml), se tradujeron en una aparición rápida de síntomas de "bolitas", siendo observadas en el 70% de los animales a las 48 horas. El porcentaje de colonias verdes consideradas *Vibrio harveyi* fue más elevado en las larvas

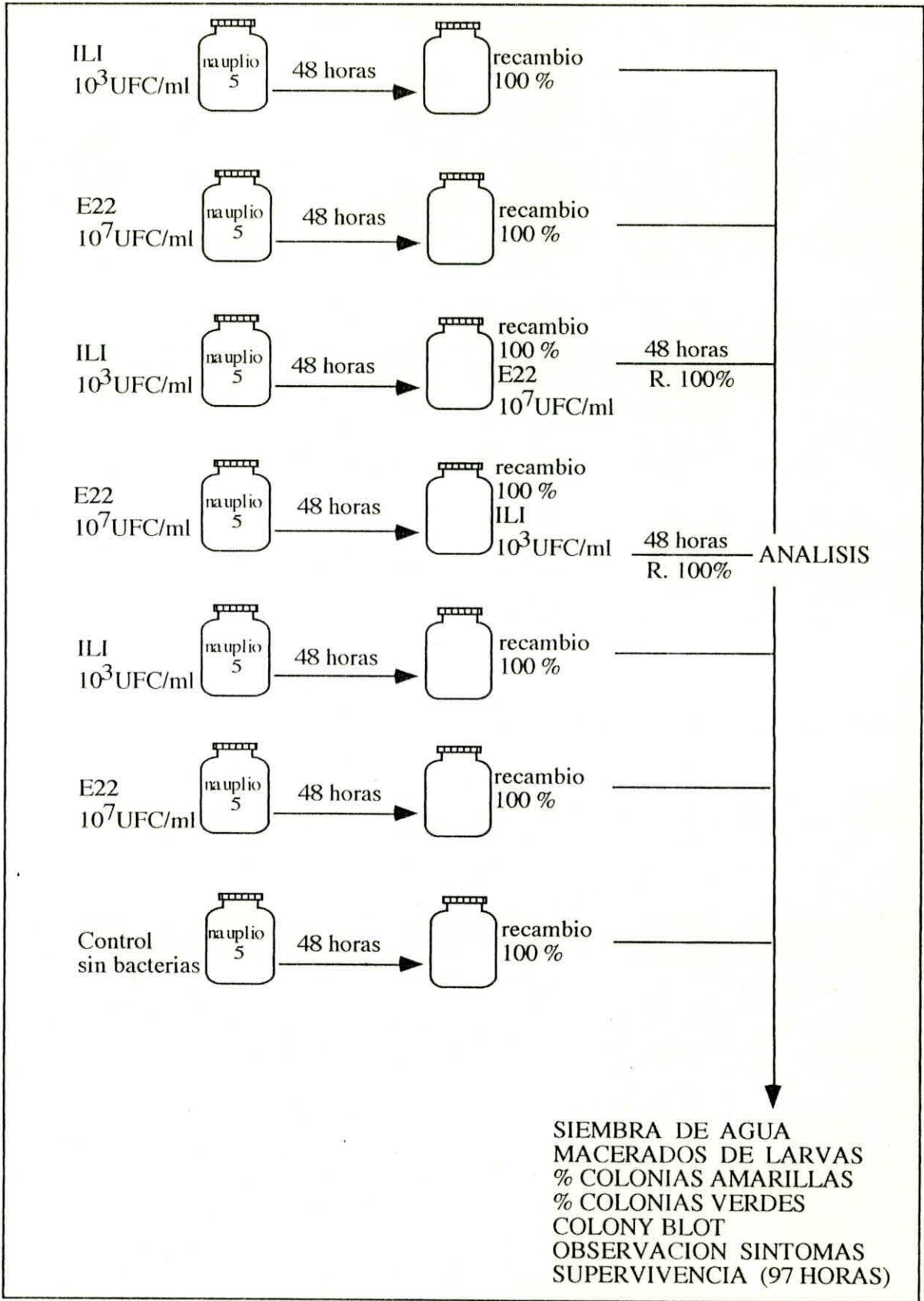


FIGURA 3. ESQUEMATIZACION DEL EXPERIMENTO N. 3

TABLA 4.- Experimento n. 3 : Interacción de ILI con E22 a intervalos de tiempo de 48 horas a concentraciones de 1×10^3 UFC / ml y 1×10^7 UFC / ml respectivamente. El estadio de infección inicial fue en nauplio 5 y se realizaron controles sin bacterias infectados en Zoea 1 con ILI y E22. Macerados y siembra de agua se realizaron en agar TCBS y pruebas de colony blot se realizaron 72 horas después de la primera infección

		24 horas					48 horas					72 horas							97 horas	Spv.
Tratamiento	réplica	UFC/ larva	%CA	%CV	Obs. síntomas Bolitas	UFC/ larva	%CA	%CV	Obs. síntomas bolitas	UFC/ml agua x 10 ³	%CA	%CV	UFC/ larva	%CA	%CV	Colony blot %col. + al ac. 286 2C9		% Spv.	Promedio ± desviación estándar	
ILI	1	1	100	0	0,0%	-	-	-	0,0%	6,0	100	0	-	-	-			80,8	79,4 ± 2,5 a	
	2	*			*	*			*	5,0	100	0	1	100	0			76,5		
	3	*			*	*			*	4,2	100	0	-	-	-			81,0		
E22	1	*			*	*			*	3,8	90	10	4	15	85		100	13,0	20,8 ± 7,1 b	
	2	*			*	*			*	1,8	89	11	20	0	100		30	27,0		
	3	56	22	78	16,7%	1	80	20	70,0%	5,2	93	7	11	5	95		86	22,3		
ILI - E22	1	-	-	-	0,0%	2	35	65	11,1%	2,0	100	0	2	100	0	50	60	72,3	80,8 ± 11,6 a	
	2	-	-	-	0,0%	-	-	-	12,5%	10,0	40	60	3	70	30	57	40	89,2		
	3	*			*	*			*	XXXXX								XXXX		
E22 - ILI	1	-	-	-	10,0%	1	10	90	77,8%	1,6	62	38	3	27	73	66	50	33,8	41,4 ± 6,6 c	
	2	1	0	100	33,3%	-	-	-	14,3%	1,6	12	88	28	30	70	90	85	45,4		
	3	*			*	*			*	0,6	100	0	3	50	50	90	100	45,0		
ILI TARDIO	1	*			*	*			*	3,2	100	0	3	91	9	50		77,5	81,6 ± 8,2 a	
	2	*			*	*			*	0,6	100	0	2	95	5	36		91,0		
	3	-	-	-	0,0%	-	-	-	11,1%	3,4	100	0	1	50	50			76,2		
E22 TARDIO	1	*			*	*			*	0,4	100	0	12	90	10		31	74,5	64,2 ± 14,6 a	
	2	-	-	-	0,0%	-	-	-	28,6%	0,2	100	0	10	95	5		35	53,8		
	3	*			*	*			*	XXXXX								XXXX		
CONTROL	1	*			*	*			*	14,4	93	7	2	100	0	25	0	69,5	79,5 ± 9,7 a	
	2	1	100	0	11,1%	1	50	50	44,4%	25,8	100	0	-	-	-			81,5		
	3	*			*	*			*	3,8	100	0	4	98	2	84	37	87,5		
ESTADIO		ZOE 1				ZOE 1				ZOE 2							ZOE 2-3			

NOTA : ILI-E22 : Se infectó con E22 48 horas después de haber infectado con ILI, previo a un recambio del 100%

E22-ILI : Se infectó con ILI 48 horas después de haber infectado con E22, previo a un recambio del 100%

ILI TARDIO : Se infectó con ILI en Zoea 1, 48 horas después de haber iniciado el experimento

E22 TARDIO : Se infectó con E22 en Zoea 1, 48 horas después de haber iniciado el experimento

UFC : Unidad formadora de colonias

% CA : porcentaje de colonias amarillas

% CV : porcentaje de colonias verdes

- : no hubo crecimiento

XXXXX : 100% de mortalidad a las 48 horas, como causa posible descuidos en el manejo

* : 24 y 48 horas se eligieron al azar 3 réplicas inoculadas con sus respectivas bacterias y las de control

abc : Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$)

a las 72 horas de la infección, siendo esta observación confirmada por la prueba colony-blot con el anticuerpo 2C9. Según el análisis estadístico la supervivencia de este tratamiento tuvo diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a todos los demás tratamientos y fue la más baja (20,8%).

La infección tardía de las larvas con E22 no es eficaz, siendo el porcentaje de bacterias verdes o reconocidas por el anticuerpo 2C9 mucho más bajo que en el caso de infecciones precoz. Esto sugiere que las bacterias contaminantes colonizaron de manera eficaz las larvas y ejercen un efecto "probiótico". La supervivencia no fue significativamente diferente a aquellas de los controles y larvas infectadas por ILI.

Estos resultados se pueden relacionar a aquellos obtenidos por infecciones dobles. En el caso de infecciones ILI/E22 se acumula el efecto probiótico de ILI y la menor infección de E22 en contaminaciones tardías. Así, las tasas de supervivencia fueron normales (80,8%) y de acuerdo al análisis estadístico realizado no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a los tratamientos infectados con ILI, ILI y E22 TARDIO y los controles. También el porcentaje de colonias verdes fueron bajas y cercanas al 50% según los resultados de colony - blot.

Por el contrario, en el caso de infecciones E22/ILI se acumulan la fuerte infectividad de E22 en contaminación precoz y la menor eficiencia de ILI para desplazar a E22 e impedirle colonizar. Así, las supervivencias son más bajas (41,4%). Cabe señalar, un problema de no especificidad de los colony - blot.

3.4. EXPERIMENTO N. 4

Esta experiencia (ver figura 4) tuvo por objetivo evaluar la capacidad de ILI como probiótico frente a infecciones más o menos fuertes de E22, a intervalos de tiempo de 24 horas. Las concentraciones utilizadas fueron 1×10^3 UFC/ml para ILI y 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 UFC/ml para E22. También se realizaron infecciones en zoea 1 con 1×10^7

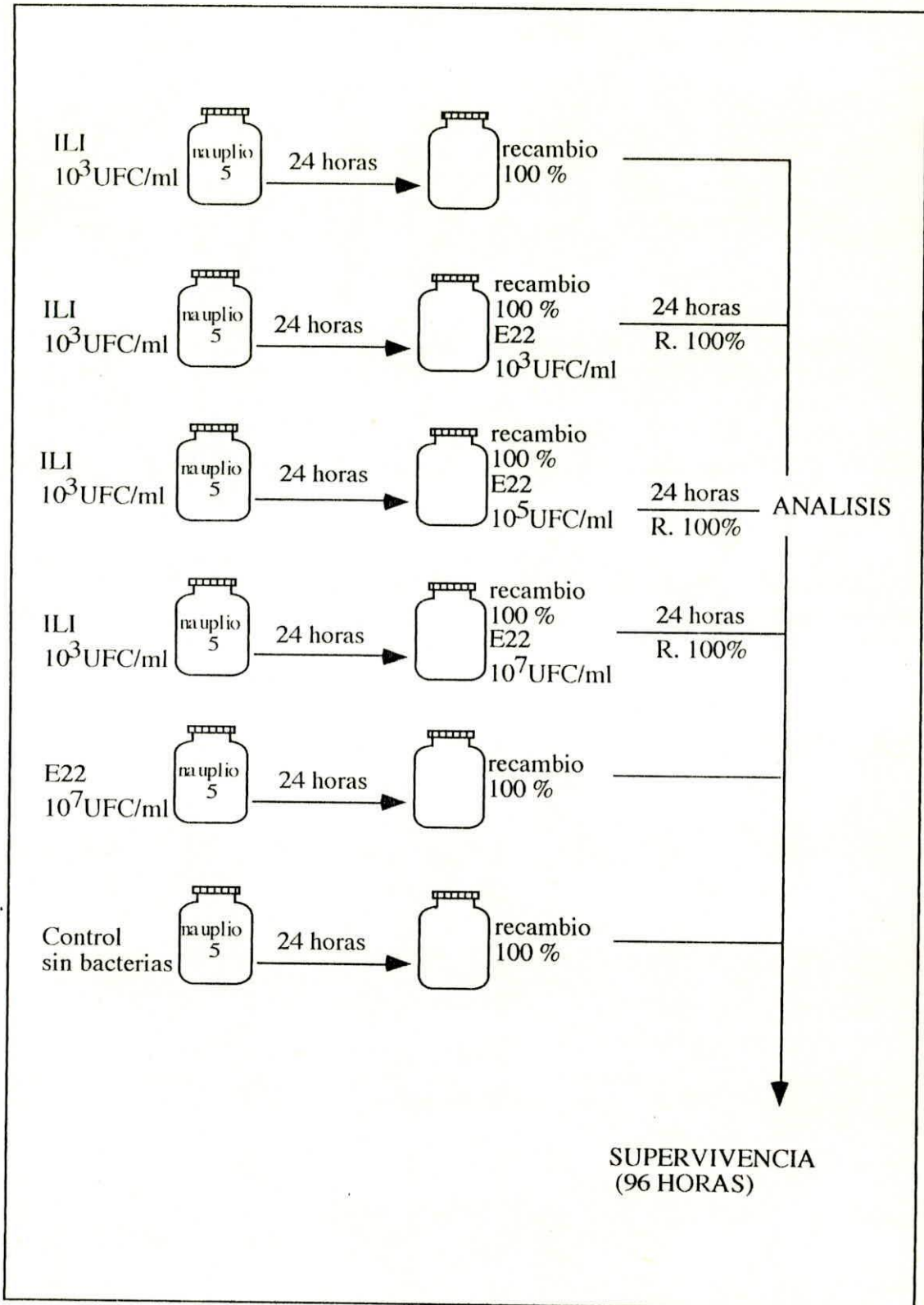


FIGURA 4. ESQUEMATIZACION DEL EXPERIMENTO N. 4

TABLA 5.- Experimento n. 4 : Evaluación de diferentes concentraciones de cepa E22 (1x10³,1x10⁵,1x10⁷ UFC/ml) interactuando con cepa ILI (1x10³ UFC / ml) a intervalos de 24 horas en estadio de infección nauplio 5. Estimación del efecto patógeno de E22 (1x10⁷ UFC / ml) en estadio Zoea 1

Tratamiento réplica		% Supervivencia 96 horas	Spv. promedio ± desviación estándar	Spv. promedio vuelta a analizar
ILI	1	83*	64,3 ± 33,2 a	83,5 ± 0,7 a
	2	84*		
	3	26		
ILI-E22 10 ³	1	89*	65 ± 39 a	87,5 ± 2,1 a
	2	86*		
	3	20		
ILI-E22 10 ⁵	1	64*	54,7 ± 28,2 a	70,5 ± 9,2 b
	2	23		
	3	77*		
ILI-E22 10 ⁷	1	53*	39 ± 31,4 a	57 ± 5,7 c
	2	3		
	3	61*		
E22 10 ⁷ TARDIO	1	37*	39,3 ± 2,1 a	39,3 ± 2,1 d
	2	40*		
	3	41*		
CONTROL	1	85*	80,3 ± 4,5 a	80,3 ± 4,5 a
	2	80*		
	3	76*		
ESTADIO		ZOEIA 2-3		

NOTA : ILI-E22 (10³-10⁵-10⁷ UFC / ml) : Se infectó con E22 en Zoea 1 con las concentraciones señaladas, 24 horas después de haber infectado con ILI, previo a un recambio del 100%
E22 TARDIO(10⁷ UFC / ml) : Se infectó con E22 a esta concentración 24 horas después de haber iniciado el experimento, previo a un recambio del 100%
a : No existe diferencias significativas (p >0,05)
* : Datos vueltos a analizar considerando que los datos excluidos fueron afectados por el manipuleo de las larvas

UFC/ml de E22 para evaluar el efecto patógeno de la cepa en dicho estadio.

El criterio de la posible patogenicidad o inocuidad de E22 e ILI respectivamente se determinó solamente en base a resultados de supervivencia a 96 horas de la infección inicial del experimento.

El análisis estadístico según los resultados de la tabla 5, indican que los valores de las supervivencia no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Si se hubiese analizado los resultados de esta experiencia considerando preferentemente las tasas de supervivencia similares entre dos o tres botellas de cada lote parecería que ILI ejerce un fuerte efecto probiótico preventivo frente a E22, efecto que disminuye con la carga infecciosa de E22.

Las tasas que ocasionalmente fueron netamente más bajas en este experimento no pueden ser explicadas, al no encontrarse un factor que haya inducido dichas mortalidades.

En lo que concierne a E22 sola, es probable que las bacterias contaminantes hayan ejercido un cierto efecto probiótico pero más bajo que aquel de ILI.

3.5. EXPERIMENTO N.5

Este último experimento (ver figura 5) tuvo como meta confirmar los resultados de la precedente. El bioensayo consistió en estudiar la interacción de ILI con 2 concentraciones de E22 a un intervalo de 24 horas infectando larvas de estadio nauplio 5. Las concentraciones utilizadas para ILI fueron de 1×10^3 UFC/ml y para la cepa E22 fueron de 1×10^3 y 1×10^7 UFC/ml. También se realizó una experimentación infectando larvas en Zoea 1 con E22 a una concentración 1×10^3 y 1×10^7 UFC/ml para estudiar el efecto patógeno en dichos estadios. Este experimento también tuvo 3 réplicas inoculadas con ILI (1×10^3 UFC/ml), con E22 (1×10^7 UFC/ml) y los controles sin bacterias.

El criterio de una posible inocuidad o patogenicidad de las cepas ILI y E22

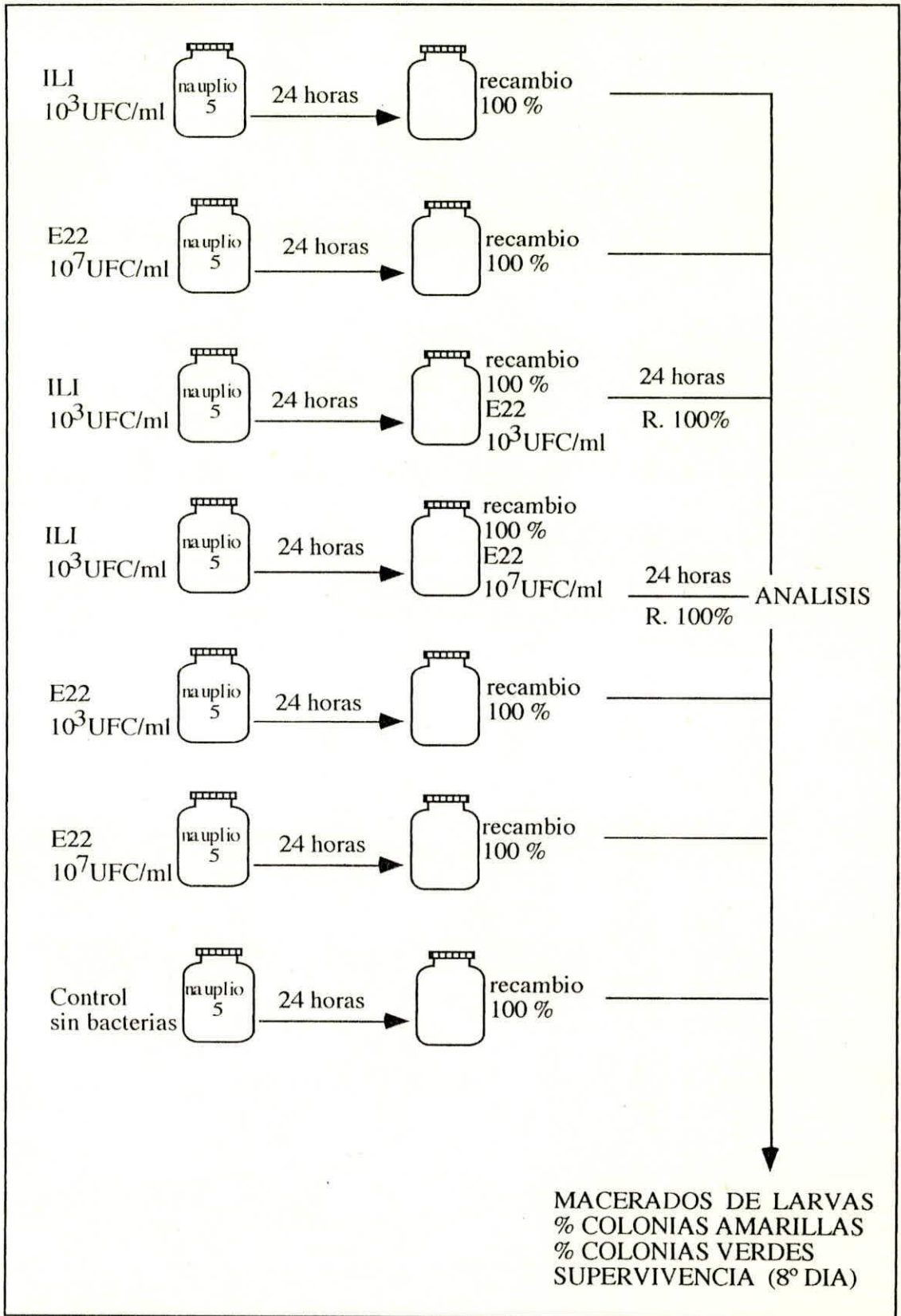


FIGURA 5. ESQUEMATIZACION DEL EXPERIMENTO N. 5

TABLA 6.- Experimento n. 5 : Evaluación de dos concentraciones de cepa E22 (1×10^3 y 1×10^7 UFC/ml) interactuando con cepa ILI (1×10^3 UFC / ml) a intervalo de 24 horas con estadio de infección inicial en nauplio 5. Estimación del efecto patógeno de E22 en estadio Zoea 1 con análisis de macerados de larvas sembrados en TCBS después de la primera infección

Tratamiento réplica		8° día				Spv. promedio ± desviación estándar
		UFC/ larva	%CA	%CV	% Supervivencia	
ILI	1	1	100	0	77	75,3 ± 2,1 a
	2	15	55	45	73	
	3	3	100	0	76	
E22 10^7	1	9	100	0	66	74 ± 7 a
	2	11	90	10	77	
	3	1	100	0	79	
ILI-E22 10^3	1	1	100	0	81	76,3 ± 9,9 a
	2	1	100	0	65	
	3	3	100	0	83	
ILI-E22 10^7	1	1	100	0	78	71,3 ± 6,1 a
	2	17	95	5	66	
	3	4	88	12	70	
E22 10^3 TARDIO	1	17	95	5	76	76,7 ± 1,2 a
	2	2	100	0	76	
	3	6	82	18	78	
E22 10^7 TARDIO	1	1	100	0	62	66,3 ± 5,9 a
	2	1	100	0	73	
	3	-	-	-	64	
CONTROL	1	1	100	0	70	78,3 ± 7,2 a
	2	4	90	10	82	
	3	-	-	-	83	
ESTADIO		MYSIS 2				

NOTA : ILI - E22 (10^3 - 10^7 UFC / ml) : Se infectó con E22 a la concentración indicada 24 horas después de haber infectado con ILI, previo a un recambio del 100%

E22 TARDIO (10^3 - 10^7 UFC / ml) : Se infectó con E22 a la concentración indicada 24 horas después de haber iniciado el experimento, previo a un recambio del 100 %

UFC : Unidad formadora de colonias

- : no hubo crecimiento

a : No hubo diferencias significativas entre las réplicas ($p > 0,05$)

respectivamente, se determinó en base a los resultados de supervivencia de las larvas a 8 (ocho) días de iniciado el experimento y porcentajes de colonias amarillas y verdes de los macerados de larvas sembrados en agar TCBS.

Todos los tratamientos presentaron entre el 80 y 100% de colonias amarillas a excepción de una réplica de ILI (55%).

El análisis estadístico de los valores de supervivencia (Tabla 6) de los diferentes tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí ($p>0,05$). Las supervivencias son similares y oscilan entre 66,3% y 78,3%. La explicación más probable implica una contaminación de larvas o del agua por bacterias cuyas colonias son amarillas en TCBS. Estas bacterias contaminantes fueron eficaces desde el punto de vista de la colonización ya que incluso en los casos de infección precoz por E22 solo las colonias amarillas son observadas desde el 8° día. Estas bacterias tal vez impidieron y/o desplazaron a las bacterias E22 inoculadas.

CONCLUSIONES

La larvicultura se sitúa al principio de la cadena de producción de camarón en cautiverio y constituye un elemento primordial en términos cuantitativo y cualitativo. En Ecuador, la larvicultura contribuye actualmente con alrededor del 60% de las necesidades de post-larvas, es decir aproximadamente 12 mil millones por año, sin embargo estas post-larvas son generalmente consideradas como de menor calidad que aquellas llamadas "salvajes", colectadas en el medio. La escasez de estas últimas, debido a una sobreexplotación de las poblaciones naturales, y la presión de movimientos ecologistas, para evitar esta sobreexplotación, hacen de la larvicultura el elemento clave para la sustentabilidad económica y ecológica de la camaronicultura.

Entre los factores que afectan más duramente la larvicultura, desde el punto de vista de la cantidad y de la calidad de las larvas, las enfermedades bacterianas se sitúan en primer plano. En efecto, las bacterias son omnipresentes, favorecidas por las condiciones de cultivo intensivo en los laboratorios. Hoy en día son casi incontables en razón de fenómenos de resistencia a los antibióticos que han sido masivamente utilizados sin tratar de discriminar entre cepas patógenas y no patógenas.

Actualmente, la prevención y el control de bacteriosis depende del progreso en el diagnóstico y sobretodo en la utilización de cepas probióticas que interfieran con las bacterias patógenas y que puedan permitir cultivar, sin antibióticos, larvas de buena calidad gracias a una flora intestinal conveniente para la fisiología nutritiva de los animales.

Es dentro de este contexto que se ha puesto en marcha una estrategia de investigación en el CENAIM en el transcurso del año 95. En base a los trabajos preexistentes, en

en particular aquellos de Iliana Morales en el laboratorio EBISA, se pudo establecer un modelo de estudio. En efecto, se disponía de cepas de *Vibrio alginolyticus*, ILI y 158, aisladas en el mismo laboratorio, siendo sospechada su capacidad probiótica en razón a su presencia en condiciones normales de cultivo y de una aparente prevención del síndrome de "bolitas" luego de que la bacteria fue introducida en los tanques de cultivo.

Sin embargo, la utilización eficiente de esta cepa se mostró difícil en razón de la falta de herramientas para analizar y controlar las poblaciones de bacterias "probióticas", siendo estas mismas herramientas indispensables para demostrar el efecto probiótico de una cepa bacteriana dada y seguidamente para optimizar los parámetros de utilización.

Con la preparación de anticuerpos monoclonales específicos de bacterias de cepas S2 y E22 (Mendoza, com. pers.) y de la cepa ILI (Donoso, com. pers.) y gracias a la puesta a punto de inmunopruebas de tipo colony-blot, se hizo posible recientemente emprender la elaboración de un modelo de estudio de las interacciones entre la larva de camarón y bacterias probióticas y patógenas.

Este modelo fue inicialmente estudiada por San Miguel (1996) considerando los estadios larvarios Zoea 1 y Zoea 2 de *P. vannamei* y diversas cepas bacterianas para focalizarse finalmente en las cepas E22 de *Vibrio harveyi* e ILI de *Vibrio alginolyticus*.

Estos trabajos han puesto en evidencia la influencia, en los procesos de colonización, de bacterias contaminantes provenientes del agua o de la misma larva. En efecto, siendo las experiencias realizadas en larvas de los estadios zoea 1 y zoea 2 cuya boca está abierta, fue posible que una flora intestinal esté ya constituida en el momento en que las bacterias ILI y/o E22 sean puestas en contacto con las larvas. Estos procesos de colonización precoz por bacterias no identificadas, podrían explicar las variaciones en las infecciones experimentales con miras a establecer la naturaleza patógena y probiótica de E22 e ILI respectivamente.

A fin de resolver estos problemas, el presente trabajo fue emprendido teniendo como primer objetivo la optimización del protocolo e infección experimental, esto con el fin de obtener la monocolonización de larvas contaminadas en el estadio nauplio 5 cuando la boca está todavía cerrada y por consecuencia el tubo digestivo axénico.

En la práctica, se ha mostrado difícil de controlar efectivamente los procesos de monocolonización en la medida en que las bacterias contaminantes del agua y de las larvas persisten luego de los tratamientos. Estas bacterias intervienen solas en la colonización de las larvas en los tanques de control y en asociación con las bacterias E22 y/o ILI en los tanques experimentales. Sin embargo, como lo demuestran los resultados de las pruebas de colony-blot en las experiencias 1 y 3, la puesta en contacto precoz de las larvas (nauplio 5) con las bacterias de una cepa dada conduce a procesos de colonización correspondiendo la mayoría a estas bacterias.

Se necesitarán pruebas de optimización de tratamientos del agua y sobre todo de larvas para evitar estos problemas de bacterias contaminantes y tratar de obtener de manera confiable y reproducible monocolonizaciones perfectas.

En lo que concierne a la determinación de la naturaleza patógena de la cepa E22 de *Vibrio harveyi* parecería que sería necesaria una fuerte infección (1×10^7 UFC/ml) para reproducir los síntomas de "bolita" entre 2 y 4 días. Sin embargo, estas infecciones no parecen inducir mortalidades como lo indican los resultados de los experimentos 4 y 5 y esto incluso al cabo de ocho días. Estos resultados son un poco contradictorios con las observaciones clínicas y los datos epidemiológicos relacionados al síndrome de "bolitas", que es mortal al cabo de algunos días. Convendrá repetir las experiencias analizando la mortalidad en un período más grande a fin de explorar dos hipótesis que pueden ser avanzadas para explicar la aparente no patogenicidad de la cepa E22.

La primera hipótesis se refiere directamente a una pérdida de la patogenicidad de la cepa E22 que podría resultar de mutaciones favorecidas por el cultivo "in vitro" en razón de su

mayor autotrófica. La segunda hipótesis implica la capacidad de colonización de E22 que sería netamente menor que aquellas de bacterias presentes en el agua o en las larvas (experimento 5), ya que estas bacterias constituyen, en el 8º día de cultivo, del 90 al 100% de la flora bacteriana de las larvas.

La optimización del proceso de monoclonización y el aumento de la duración de las experimentaciones podrán permitir determinar si la cepa E22 es realmente patógena, siendo estas experimentaciones realizadas con cepas congeladas sin ninguna operación de repicaje. La cepa ILI es aparentemente no patógena para las larvas en el estadio de nauplio 5, al menos cuando es introducida a una concentración relativamente baja.

Los resultados de diversas experiencias, netamente aquellos donde se han realizado pruebas de colony-blot con los anticuerpos monoclonales específicos 2B6, sugieren que la cepa ILI tiene una buena capacidad de colonización. Además esta colonización de larvas parece capaz de resistir una post-infección con la cepa E22 de *Vibrio harveyi* pudiendo esta última ser puesta en contacto a una concentración diez mil veces (10.000) más elevada que aquella utilizada para la primera infección por ILI (experimentos 2 y 3). En fin se ha mostrado que la cepa ILI puede colonizar larvas previamente infectadas por E22, y esto con una eficiencia relativamente grande ya que ella era puesta en contacto con las larvas a una concentración netamente más baja (1×10^3 UFC/ml) que aquella utilizada para la primera infección con E22 (1×10^7 UFC/ml).

Se requerirán análisis complementarios para precisar estos fenómenos de competición entre cepas bacterianas, teniendo cuidado en realizar colony-blot en cultivos de agar de solo unas pocas horas después del aislamiento. En efecto se han encontrado problemas de colony-blot con cultivos viejos conduciendo a reacciones de falsos positivos, lo que dificulta la interpretación de fenómenos de competición.

En base a los resultados de este trabajo, se considera que la cepa ILI podría ser utilizada como posible probiótico teniendo la capacidad de competir con cepas de *Vibrio harveyi*.

Recientemente, fenómenos de mortalidades masivas han afectado a diversos laboratorios y se han reconocido casos como el "síndrome de Zoea" que fue atribuído a bacterias de tipo *Vibrio harveyi* que tienen los mismos patrones que E22 y S2 según la técnica RAPD.

En relación, con un laboratorio fuertemente afectado por el síndrome, se emprendieron pruebas para explorar la utilización preventiva de la cepa ILI puesta en contacto con las larvas a partir del estadio Nauplio 5, así como su utilización "reparadora" en las larvas enfermas previamente tratadas con un antibiótico.

Las informaciones adquiridas, a la escala de un modelo, en el marco de este trabajo de tesis, se han utilizado para esta extrapolación a la escala de un laboratorio ya que los resultados preliminares han sido realmente positivos.

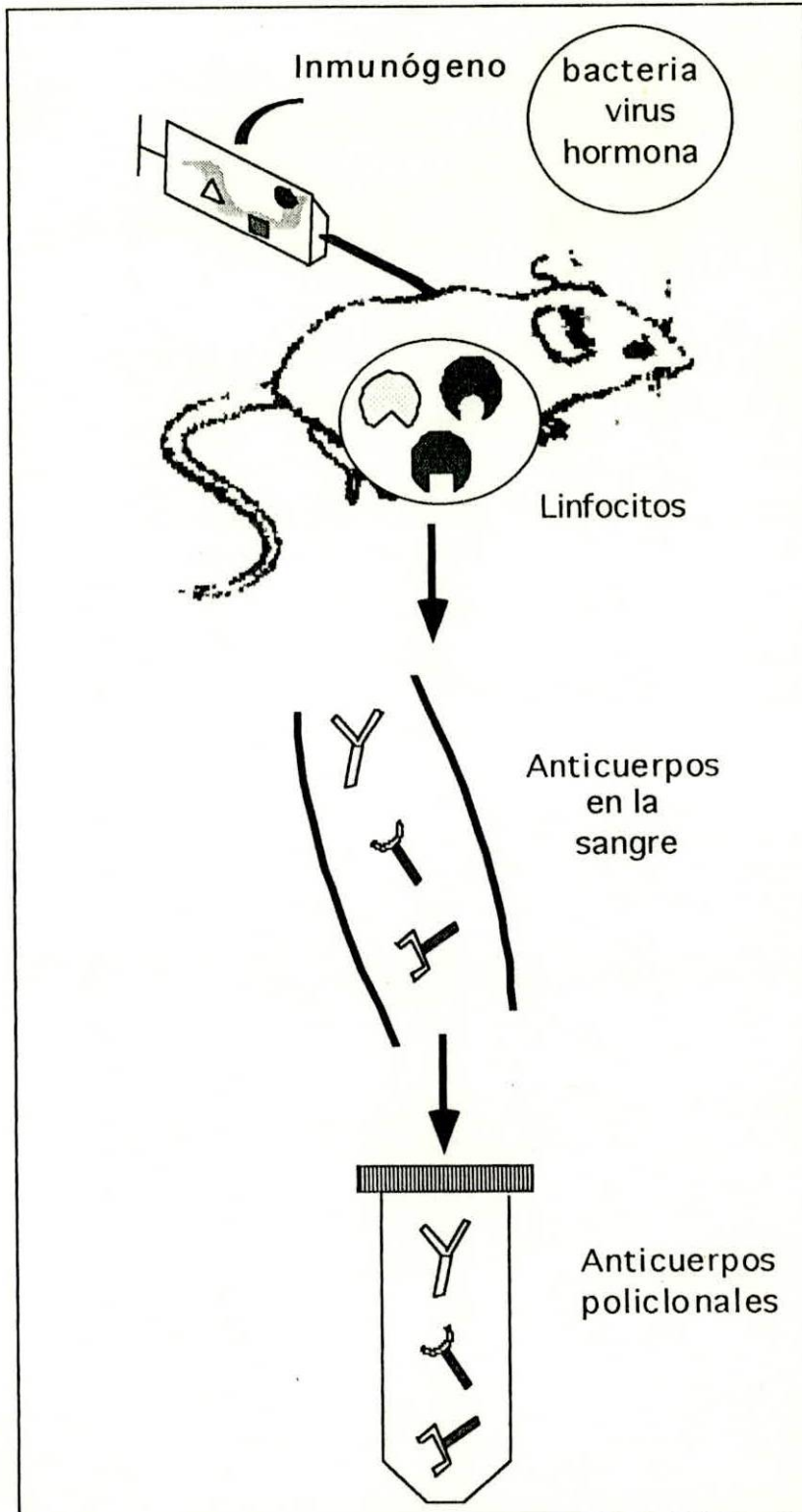
Otros laboratorios desean comenzar o repetir la utilización de probióticos adoptando las recomendaciones y aplicando las técnicas adecuadas para la cuantificación y seguimiento de la cepa ILI.

RECOMENDACIONES

- 1.- Proseguir la optimización del modelo de estudios apegándose a la eliminación total de bacterias contaminantes para la obtención de monocolonizaciones perfectas.
- 2.- Optimizar los parámetros de colonización por ILI en términos, por una parte de la estabilidad de ILI en infecciones posteriores con *Vibrio harveyi* y por otra parte la competitividad de la ILI frente a bacterias *V. harveyi* habiendo colonizado anteriormente larvas de *P. vannamei*.
- 3.- Aplicar el modelo optimizado en la identificación de cepas patógenas, lo que impondrá experiencias de más larga duración a fin de observar los síntomas y las mortalidades.
- 4.- Aplicar el modelo optimizado en la identificación de nuevas cepas probióticas.
- 5.- Transferir los conocimientos adquiridos en las experiencias de los laboratorios de investigación a los laboratorios de producción y analizar los resultados en los mismos, esto eventualmente por la vía de la creación de un grupo mixto que comprenda a técnicos encargados de los laboratorios, a los científicos del CENAIM implicados en este tema y a las personas encargadas del Centro de Servicio para la Acuicultura.
- 6.- Empezar el estudio de las interacciones bacteria-camarón por una parte a escala celular, *in vitro* e *in vivo*, netamente en inmunohistología, a fin de describir los fenómenos de colonización y de competición y por otra parte a escala molecular a fin de caracterizar las moléculas que están implicadas en la fijación de bacterias sobre el epitelio y en la toxicidad de bacterias frente a células de camarón.

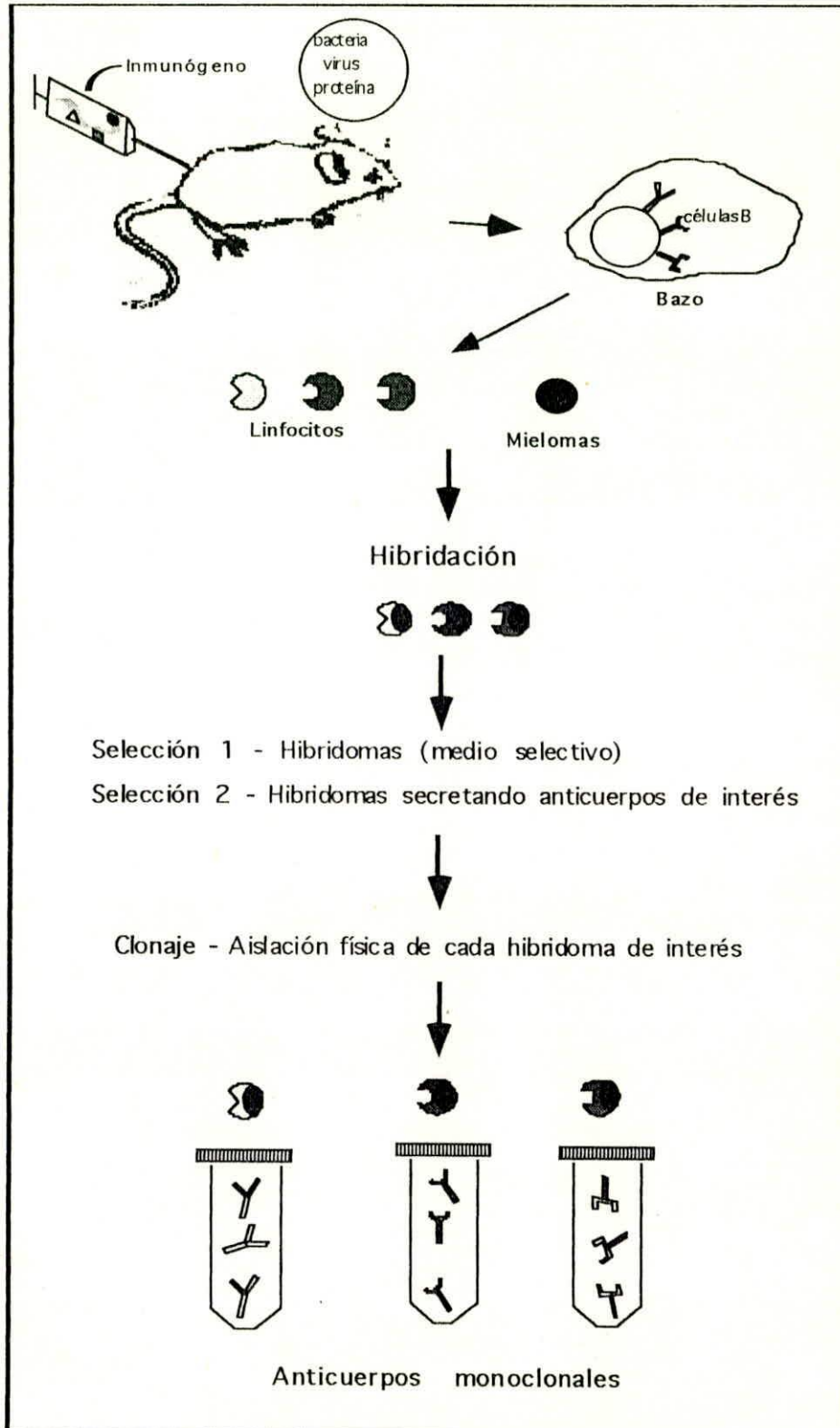
ANEXOS

ANEXO 1



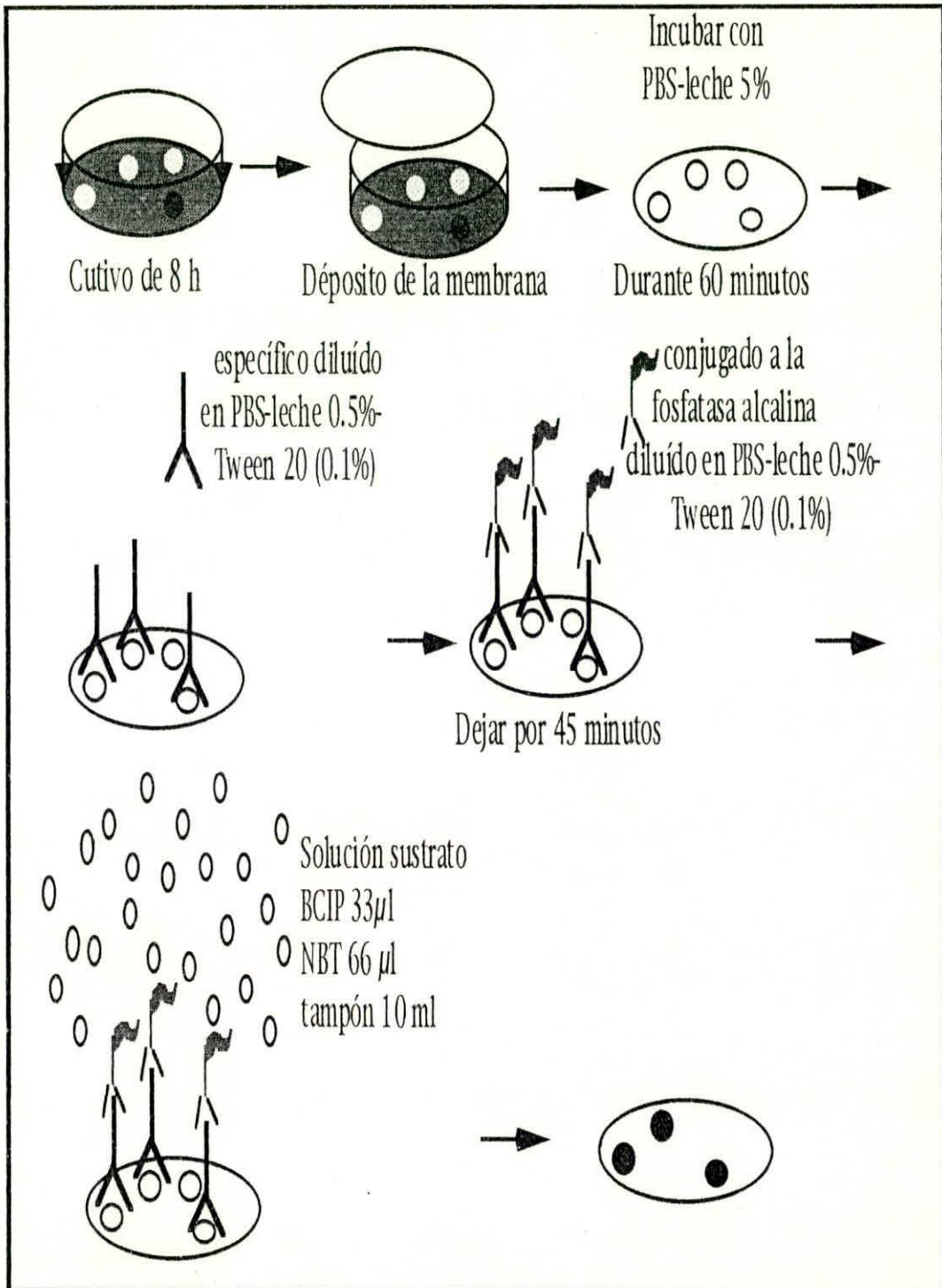
Producción de anticuerpos policlonales. Diferentes partes del antígeno son reconocidos por el sistema inmunitario del ratón existiendo varios anticuerpos de diferente especificidad (Valenzuela, 1996).

ANEXO 2



Producción de anticuerpos monoclonales
(Tomado de Valenzuela, 1996)

ANEXO 3



Técnica de COLONY BLOT

ANEXO 4



Foto 1.- Sistema utilizado para las infecciones experimentales.

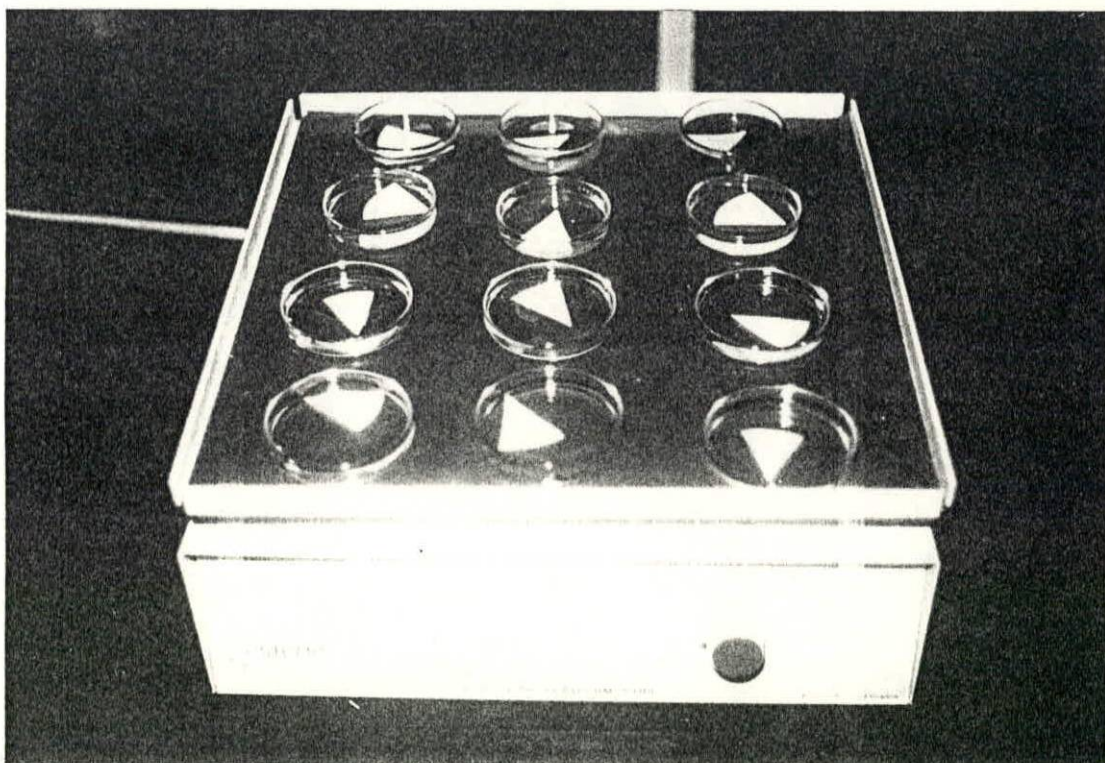


Foto 2 .- Colony Blot. Incubación de las membranas con la solución bloqueadora.

3.-

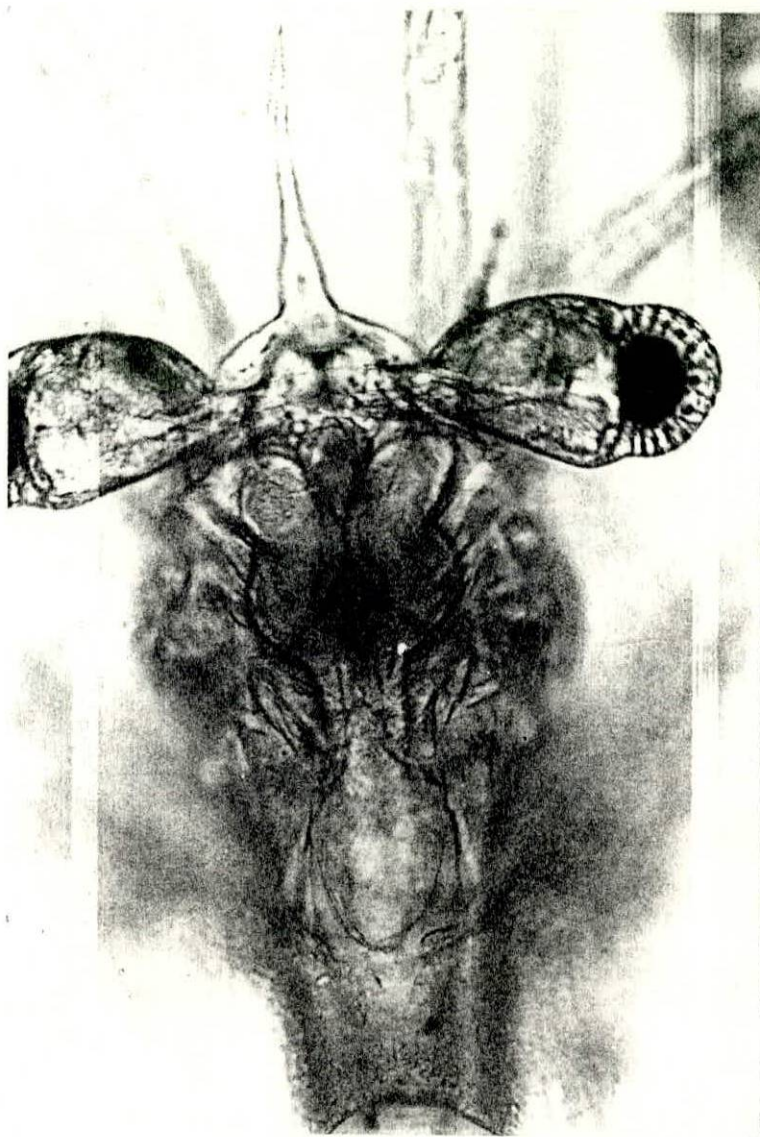


Foto 3.- Larva de *Penaeus vannamei* en estadio Zoea 1 sin presencia de anomalías clínicas, 100X

4.-

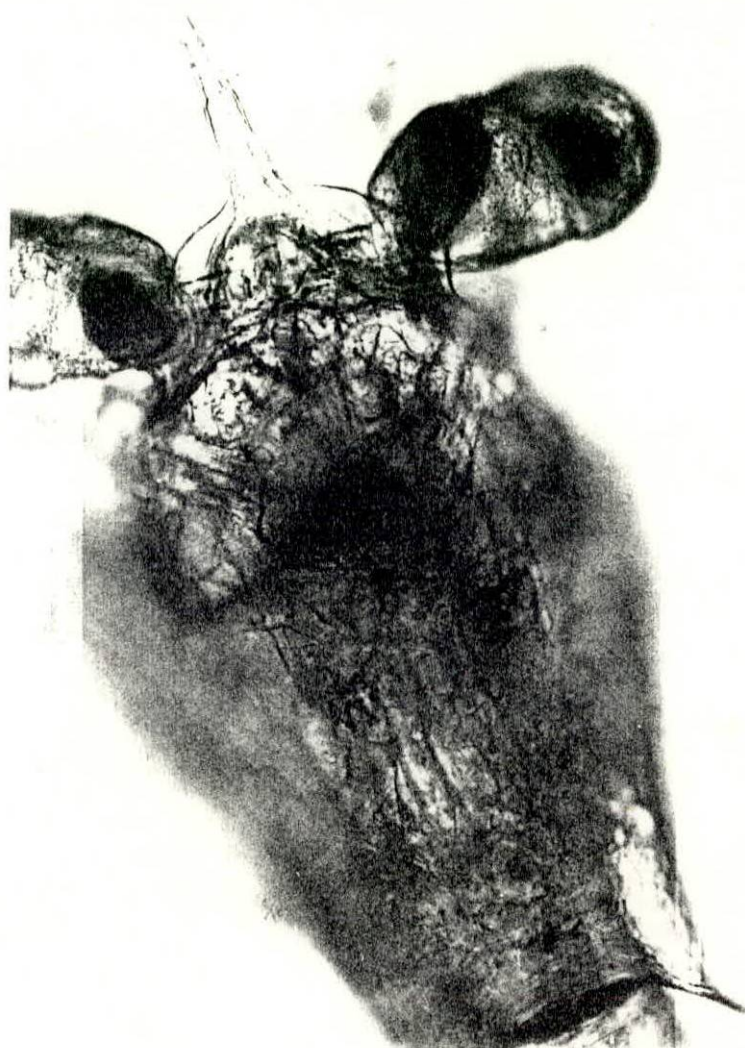
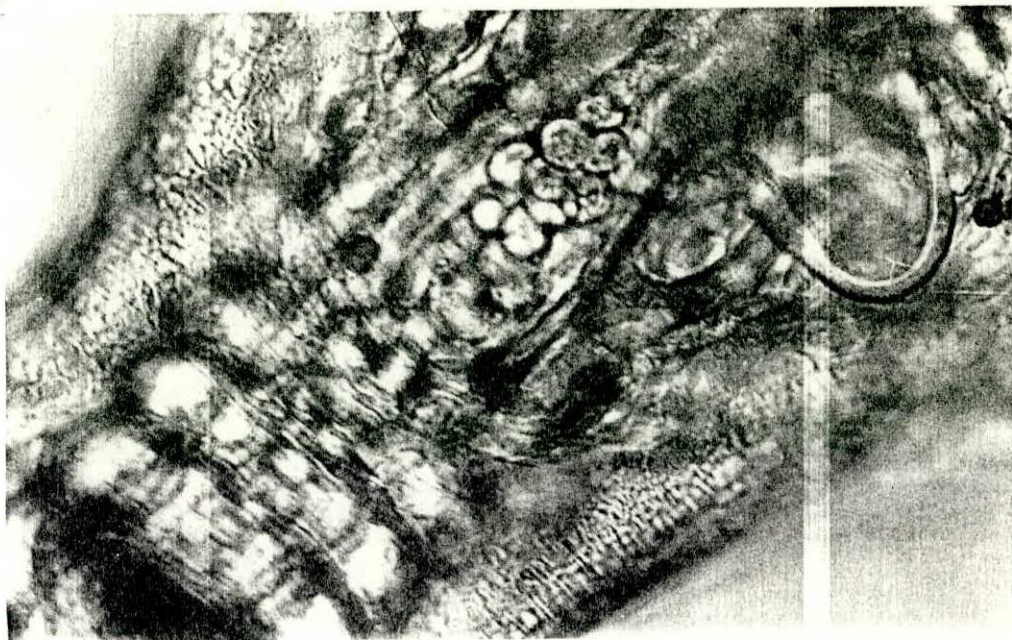
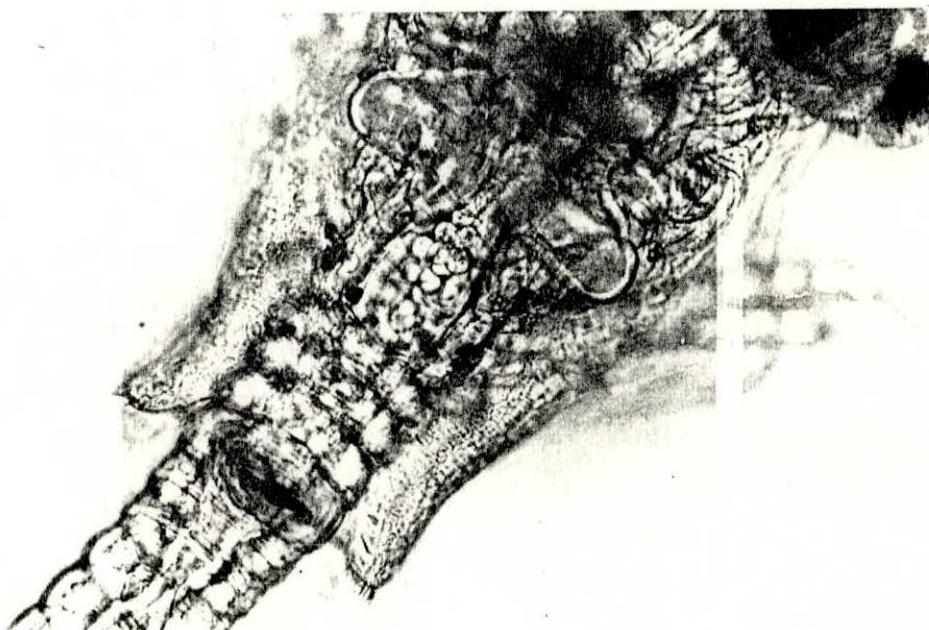


Foto 4.- Larva en estadio Zoca I infectada con E22 (1×10^7 UFC/ml) con deformaciones en las paredes externas del hepatopáncreas. 100X

5.-



6.-



Larvas infectadas con E22 (1×10^7 UFC/ml), **Foto 5.-** Presencia de "bolitas" en el tracto digestivo causada por la descamación del epitelio interno del hepatopáncreas, 200X. **Foto 6.-** Zoea I con presencia de "bolitas" en el tracto intestinal, 100X

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **ACUACULTURA ECUATORIANA : un sector para invertir.**
Acuacultura del Ecuador, Marzo-Abril de 1995. Cámara Nacional de Acuacultura.
No.7, 8-9.
- **AKAMINE, Y. 1992.** Historia del cultivo de larvas de camarón en el Ecuador y su futuro. Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuacultura, 18-23 Octubre 1992, Guayaquil-Ecuador. 75-80.
- **ARELLANO, E. 1993.** Investigación bioquímica y nutricional del camarón. En : Memorias de Edgar Arellano M., once años dedicados a la investigación y desarrollo de la Acuacultura del Ecuador. 1-18.
- **AUSTIN, B., STUCKEY, L.F., ROBERTSON, P.A.W., EFFENDI, I. & GRIFFITH, D.R.W. 1995.** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. En : Journal of Fish diseases, 1995. Capítulo 18, 93-96.
- **BARNIOL, R. 1995.** Pasado, presente y futuro de los laboratorios de larvas de camarón en Ecuador. Acuacultura del Ecuador, Marzo-Abril, 1995. Cámara Nacional de Acuacultura. No. 7, 64-65
- **BELL, T.A. & LIGHTNER, D.V. 1991.** Chemotherapy in Aquaculture today current practices in shrimp culture : Available treatments and their efficacy. Chemotherapy in Aquaculture : from theory to reality. Symposium. Paris, 12-15 March 1991. 45-47.

- **BROCK, J.A. & LIGHTNER, D.V. 1990.** Diseases caused by microorganisms. Diseases of Crustacea. En : Diseases of marine animals. Editor : Otto Kine. Published 1990 by Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. Vol. 3, 318 p.

- **DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS, 1991.** Los laboratorios de larvas de camarón en el Ecuador. En: Larvicultura en el Ecuador : Guía ecuatoriana de laboratorios de larvas de camarón, 1993. 62-67.

- **DONOSO, E. 1996.** Producción de anticuerpos monoclonales y desarrollo de inmunoensayos para la identificación de una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 105 p.

- **GARRIQUES, D. & AREVALO, G. 1995.** An Evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. En : Swimming through troubled water proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Papers presented at Aquaculture'95. San Diego, California. Febrero 1-4, 1995. 53-59.

- **HAMEED, A. S. SAHUL, 1995.** Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbellii* - like bacterium. En : Journal of the World Aquaculture Society. September , 1995. Vol. 26, No.3, 315-319.

- **HORNA Z., R. 1987.** El cultivo del camarón en el Ecuador. Historia del cultivo de camarón en estanques. Acuacultura del Ecuador. Cámara Nacional de Acuacultura. No. 3, 5-12.

- **LIBRO BLANCO DEL CAMARON.** Larvas y Laboratorios. Codemet. Segunda Edición, 1993. Capítulo VIII, 46-53.

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

- **LIGHTNER, D.V. 1992.** Shrimp Pathology : Major diseases of concern to the farming industry in the Americas. Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 18-23 Octubre 1992, Guayaquil-Ecuador. 177-195.

- **LIGHTNER, D.V. 1992.** Shrimp Virus Diseases : diagnosis, distribution and management. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Papers presented at Aquaculture'92. Orlando, Florida. May 22-25, 1992. 238-253.

- **MAEDA, M. AND LIAO, I.C. 1992.** Effect of bacterial population on the growth of prawn larvae, *Penaeus monodon*. Bulletin of the National Research Institute of Aquaculture. 21, 25-29.

- **MIALHE, E., BACHERE, E., BOULO, V., CADORET, J.P., SARAIVA, E., CALDERON, J., COLWELL, R. 1995.** Biotechnology-based control of disease in marine invertebrates : development of molecular probe diagnostics and disease-resistant transgenic shrimps and molluscs. In Pathologie des invertébrés marins d'intérêt aquacole contribution et stratégies de recherches par Eric Mialhe. Docteur D'ETAT mention Sciences. Université Montpellier, France. 53, 1-12.

- **MORALES, I. 1992.** Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 18-23 Octubre 1992, Guayaquil-Ecuador. 203-207.

- **PRESCOTT, L., HARLEY, J., KLEIN, D. 1993.** MICROBIOLOGY. Second Edition . WCB Publisher. Chapter 15-16, 310-343.
- **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.
- **SINGLETON, P. & SAINSBURY, D. 1993.** Dictionary of MICROBIOLOGY and MOLECULAR BIOLOGY. Second edition. 47 p., 692 p.
- **SMORAGIEWICZ, W., BIELECKA, M., BABUCHAWOWSKI, A., BOUTARD, A., DUBEAU, H. 1993.** The Probiotics. Canadian Journal of Microbiology. 39, 1089-1095.
- **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.
- **SONG, Y.L., LEE, S.P., LIN, Y.T., Chen, C.C. 1992.** Enzyme immunoassay for shrimp vibriosis. Dis aquat. Org., 14, 43-50.
- **VALENZUELA, E. 1996.** Métodos de selección de anticuerpos monoclonales contra compuestos presentes en el cerebro y ganglio torácico de hembras maduras *Penaeus vannamei* . Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 86 p.
- **WYBAN, J.A. & SWEENEY, J.N. 1991.** Shrimp disease problems encountered at OI. Intensive Shrimp Production Technology. The Oceanic Institute Shrimp manual. Capítulo 7, 110-113.

- **ZHERDMANT, M.T. 1996.** Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del "Síndrome de bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio de su interacción *in vitro* con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Guayaquil-Ecuador, 124 p.