Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

BACTERIAS ASOCIADAS CON QUISTES COMERCIALES DE *Artemia franciscana* CULTIVADAS EN EL MEDIO SELECTIVO TCBS.

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

MARCO ANTONIO LOPEZ TORRES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. AGOSTO DE 1997.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA

BACTERIAS ASOCIADAS CON QUISTES COMERCIALES DE *Artemia franciscana* CULTIVADAS EN EL MEDIO SELECTIVO TCBS.

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS presenta:

MARCO ANTONIO LÓPEZ TORRES

Ensenada, Baja California, México. Agosto de 1997.

TESIS DEFENDIDA POR

MARCO ANTONIO LÓPEZ TORRES

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida

Director del Comité

Dr. José de Jesús Paniagua Michel

Miembro del Comité

Dr. Francisco Correa Sandoval

Miembro del Comité

M.C. Carlos Gerardo López Hernández

Miembro del Comité

Dr. Jaime Färber Lorda

Jefe del Departamento de Ecología

Dr. Federico Graef Ziehl

Director de Estudios de Posgrado

29 de agosto de 1997

RESUMEN de la tesis de Marco Antonio López Torres presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Agosto de 1997.

BACTERIAS ASOCIADAS CON QUISTES COMERCIALES DE *Artemia franciscana* AISLADAS EN EL MEDIO SELECTIVO TCBS.

Resumen aprobado por:

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga-Partida

Director de tesis

Se analizaron 20 muestras de quistes de *Artemia franciscana* de 11 marcas comerciales y diferentes lotes de ellas; así mismo, se analizaron 4 muestras de quistes de *Artemia* de poblaciones naturales de México. Para ambos tipos de muestras, se evaluó la calidad de eclosión y se cuantificaron bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias con capacidad de crecer en el medio TCBS (BCTCBS), ésto se realizó en quistes con 48 horas de incubación en agua de mar al 50% (v/v), previamente esterilizada, a 28-30 ^{0}C con aireación e iluminación constantes, después de homogeneizar la muestra con una licuadora. Del medio TCBS se hicieron aislamientos bacterianos que fueron analizados. También se comparó bacteriológicamente, el sistema de eclosión de quistes en laboratorio (esterilidad) en relación al de una granja camaronícola (no estéril), utilizando un mismo lote de quistes; así mismo, se cuantificaron las BCTCBS en los tanques de cultivo de *Artemia* y larvas de camarón. Se aislaron cepas crecidas en TCBS y se identificaron mediante el sistema API20 NE y pruebas de laboratorio seleccionadas para este fin. Como resultados, se encontró que los porcentajes de eclosión de quistes comerciales fueron muy variados, desde un 99.6% para la marca Prime USA (lote 971020) hasta nula eclosión para quistes de San Francisco Bay Brand (lote 1739), sin una relación aparente con la edad. Los quistes de poblaciones naturales de México presentaron porcentajes de eclosión desde 72.8% (Texcoco) hasta nula eclosión (Yavaros). Las BHV presentaron niveles semejantes en todas las muestras de quistes con 10^{7}-10^{8} UFC/ml. Las BCTCBS presentaron más variación en quistes comerciales, relacionadas con la edad de la muestra, que en quistes de México, con valores de $<10^{1}$-10^{7} UFC/ml y 10^{6}-10^{7} UFC/ml, respectivamente. Por lo que respecta al análisis bacteriano, se encontró que en quistes comerciales, de 444 aislamientos, el 57.2% correspondió a bacilos Gram positivo y únicamente el 1.13% (5 aislamientos) fueron

bacilos Gram negativo. Así se tuvo que el 92.11% (409 aislamientos) de las formas bacterianas fueron Gram positivo y sólo el 7.9% (35 aislamientos) correspondió a formas Gram negativo. En quistes de México, en 96 aislamientos, los resultados del análisis presentaron un patrón semejantes a los de quistes comerciales. Con lo anterior se concluyó que en 540 cepas analizadas no se encontraron bacterias vibrio. En cuanto al estudio en la granja se encontró que los sistemas de eclosión fueron totalmente diferentes: en laboratorio se conservó el patrón de bacterias Gram positivo mientras que en la granja, el 100 % de aislamientos fueron bacilos Gram negativo, oxidasa positiva. Los niveles bacterianos en los tanques de cultivo larvario variaron de acuerdo a la edad del cultivo, desde 10^1 UFC/ml para el estadio de zoea hasta 10^4 UFC/ml en postlarva. En cuanto a la identificación de bacterias de la granja, se encontró que de 34 cepas analizadas, el 94% (32 cepas) fueron identificadas como *Vibrio alginolyticus*, mientras que *V. pelagius* y *V. vulnificus* alcanzaron el 2.9% (1 cepa) cada uno. En este trabajo se utilizaron cepas de vibrios de la colección de la ATCC como referencias, lo que le dio más firmeza a la identificación bacteriana que se realizó.

Palabras clave: *Artemia*, TCBS, *Vibrio alginolyticus*.

ABSTRACT

Twenty four samples of the brine shrimp (*Artemia franciscana*) cysts from eleven commercial brands and several lots of them, as well as from natural populations of Mexico were analyzed. We have recorded for each sample the hatching percentage, the viable heterotrofic bacteria (BHV) and the bacterial population with capacity to growth on TCBS agar (BCTCBS), after 48 hours of incubation in sterile sea water (50 % v/v) at 28-30 ^{0}C. We have, as well, compared the bacterial flora from cysts hatched in laboratory (strict sterile conditions) in relation to farm conditions (non sterile). In order to follow the evolution of BCTCBS from Artemia cultures, samples were taked in the cultivation tanks of Artemia and shrimp larvae. Bacteria grown on TCBS agar from these tanks were isolated and identified with API NE system and complementary laboratory tests. The percentages of hatching of commercial brands varied from 99.6% to 0%, without an apparent relationship with the age. The cysts of natural populations from Mexico, presented percentages of hatching from 72.8% to 0%. The BHV from cysts samples fluctuate between 10^7 to 10^8 CFU/ml. The BCTCBS presented more variation in commercial cysts, related with the age of the sample, than the cysts from Mexico, with values comprised between 10^1 to 10^7 and 10^6 to 10^7 CFU/ml, respectively. From all the bacterial isolated in DIFCO TCBS medium from cysts hatched in laboratory conditions, 92% of the commercial brands and 98% of the Mexican natural populations were Gram positive, so, not corresponding to *Vibrio* spp. In contrast, the bacteria isolated in DIFCO TCBS medium, from cysts hatched in a commercial shrimp farm, were 100% Gram negative and oxidase positive, two of the main characteristics of *Vibrio* spp. This radical deference between bacterial populations from the same lot of Artemia could be explained only in base to the management conditions between to laboratory and the farm. The bacterial levels in larval tanks varied according to the age of the cultivation; from 10^1 CFU/ml for the zoea stage up to 10^4 CFU/ml in postlarvae. From larval tanks, 94% of the bacterial isolated were identified as *Vibrio alginolyticus*, while *V. pelagius* and *V. vulnificus* corresponded to 2.9% of the strains isolated on TCBS medium.

Key words: *Artemia*, TCBS, *Vibrio alginolyticus*.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, por la acertada dirección de esta tesis y por brindarme la oportunidad de conocer nuevos senderos en la ciencia.

A las personas y granjas camaronícolas que nos favorecieron con la aportación de muestras de quistes para la realización de este trabajo, que a continuación menciono:

- Unidad Experimental Peñasco del DICTUS, Puerto Peñasco, Sonora.
- M.C. Margarita Cervantes de AJART-CRIP, Ensenada, Baja California.
- M.C. Leobardo Montoya Rodríguez del CIAD Mazatlán, que nos envió muestras de la granja Maricultivos del Pacífico, Mazatlán, Sinaloa.
- Sr. Jeffrey J. Peterson de Maritech, S.A. de C.V., Golfo de Santa Clara, Sonora.
- M.C. Marco Linné Unzueta del CIBNOR, Guaymas, Sonora.
- Dr. Francisco Correa Sandoval del IIO-UABC, de Ensenada, Baja California, quien proporcionó quistes comerciales y las muestras de quistes de poblaciones naturales de México.
- M.C. Sonia Soto Rodríguez de El Camarón Dorado, Huatabampo, Sonora, cuyas muestras no se incluyeron en esta tesis por cuestión de tiempo, pero serán utilizadas posteriormente.
- I.B. José de Jesús Reyna Álvarez de Aquanova, Mazatlán, Sinaloa.

Mi agradecimiento muy especial al Ing. Carlos Mota y Fernando Montañez de la granja camaronícola GÉNESIS, de Puerto Peñasco, Sonora, por permitirme trabajar en sus

instalaciones, para ampliar el contenido de esta tesis sobre bacterias presentes en un sistema comercial de producción de larvas de *Penaeus vannamei*.

Así mismo, mi sincero agradecimiento para el Dr. José de Jesús Paniagua Michel, Dr. Francisco Correa Sandoval y M.C. Carlos Gerardo López Hernández, miembros de mi comité de tesis, por sus acertados comentarios, críticas y sugerencias que ayudaron a mejorar, tanto la investigación como el escrito de esta tesis. Gracias.

A la M.C. Salomé Canepa Bertolini por permitirme utilizar la figura 1 de este escrito.

A mis amigos, compañeros de generación (Branly, Diana, Edwyna, Felipe, Gerardo, Gil, Héctor, Martín y Paty) por los momentos gratos y difíciles que vivimos en este corto tiempo y que de alguna manera contribuyeron a reforzar nuestro carácter.

A Guadalupe Vargas Cárdenas, por facilitar el desarrollo del trabajo en el laboratorio. Así mismo a quienes de una forma u otra convivimos en este laboratorio, siempre con deseos de apoyarnos mutuamente en este difícil camino. Gracias: Lya, Salomé, Amelia y Edna (no importa el órden).

Al M.C. Jaime Luévano Esparza, por favorecerme con su amistad y por su apoyo en la impresión fotográfica del material para la presentación de este trabajo.

A Cesar O. Almeda Jauregui por la asistencia técnica para la impresión de esta tesis.

Al CICESE, por darme la oportunidad de dar un paso más en este universo del conocimiento.

Al CONACyT, por el valioso apoyo económico que me brindó durante mis estudios.

DEDICATORIA

A XÓCHITL:

Por tu apoyo, paciencia y por estar siempre a mi lado en mis triunfos y tropiezos. Te amo.

A ANDRÉS (porque ya no es un bebé):

Porque en tus ojos, tu sonrisa y corajes encuentro la fortaleza y razón para seguir siempre adelante y porque al fin de cuentas, "todo está bien, no pasa nada".

A MIS PADRES Y HERMANOS (que aún Dios me los conserva):

Porque alguna vez me colocaron al inicio de esta cuesta, y aunque tal vez nunca logre escalar la cima, durante mi caminar estarán siempre en mi corazón.

CONTENIDO

Página

I INTRODUCCIÓN **1**
I.1 Antecedentes 1
I.1.1. *Vibrio* spp en peces y crustáceos peneidos 2
I.2 Bacterias presentes en *Artemia* sp 5
I.3 Principal fuente de quistes de *Artemia franciscana* 6
I.4 Objetivos 8

II MATERIALES Y MÉTODOS **9**
II.1 Obtención de muestras 9
II.1.1. Quistes comerciales 9
II.1.2. Quistes de poblaciones naturales 9
II.1.3. Eclosión de quistes 11
II.2 Análisis bacteriológicos 12
II.2.1. Quistes 12
II.2.2. Aislamiento, purificación y conservación de cepas bacterianas 13
II.2.3. Pruebas básicas 13
II.2.4. Caracterización de cepas 15
II.2.4.1. Cepas fermentadoras de glucosa 15
II.3 Bacteriología en granja camaronícola 16
II.3.1. Comparación de sistemas de eclosión de quistes 16
II.3.2. Bacteriología de tanques de cultivo larvario y *Artemia* 17
II.3.3. Pruebas para caracterización de cepas aisladas de la granja 18
II.3.3.1. Pruebas bioquímicas y de crecimiento en laboratorio (pruebas independientes) 19
II.3.3.2. Sistema API20 NE (recomendado para bacterias no entéricas, oxidasa positiva) 21
II.4 Análisis estadísticos y taxonómicos 21
II.4.1. Quistes 21
II.4.2. Cepas de la granja 22

III RESULTADOS **23**
III.1. Quistes comerciales 23
III.1.1. Eclosiones y bacteriología 23
III.1.2. Caracterización de morfología bacteriana 25
III.1.3. Caracterización de cepas 30
III.1.4. Bacilos Gram negativo, oxidasa negativa, fermentadores de glucosa aislados de TCBS de la eclosión de quistes comerciales 33
III.2 Quistes de poblaciones naturales 36
III.2.1. Eclosiones y bacteriología 36
III.2.2. Caracterización de morfología bacteriana 37
III.3 Bacteriología en granja camaronícola 38
III.3.1. Comparación de sistemas de eclosión de quistes 38
III.3.2. Bacteriología de tanques de cultivo larvario y nauplios de *Artemia* 39
III.3.3. Caracterización de cepas bacterianas de granja camaronícola 42

IV DISCUSIÓN **46**
IV.1 Bacteriología de quistes 46
IV.1.1. Niveles bacterianos en la eclosión de los quistes 51
IV.2 Granja camaronícola 55
IV.2.1. Comparación de sistemas de eclosión de quistes de *Artemia* 55

CONTENIDO (continuación)

Página

IV.2.2. Niveles bacterianos en tanques de cultivo 58
IV.2.3. Identificación bacteriana 60
IV.2.3.1. Sistema API20 NE 61
IV.2.3.2. Pruebas de laboratorio independientes 64
IV.2.3.3. API20 NE y pruebas independientes 64
IV.2.4. Sistema API20 NE y cepas de referencia 67
IV.2.5. Pruebas independientes de laboratorio y cepas de referencia 69
IV.2.6. Pruebas API20 NE e independientes con cepas de referencia 71

V CONCLUSIONES **77**

VI RECOMENDACIONES **79**

LITERATURA CITADA **81**

ANEXO A. Descripción de pruebas bioquímicas y de crecimiento aplicadas a cepas en laboratorio **92**

ANEXO B. Resumen de tablas de regresión lineal aplicada a los quistes comerciales **102**

ANEXO C. Caracterización de cepas bacterianas de granja camaronícola por medio de pruebas de laboratorio **106**

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema experimental: a) botella de vidrio, b) tapón de neopreno, c) manguera, d) distribuidor de aire, e) bomba para acuario, f) filtros hidrófobos, g) válvula de seguridad	11
2	Niveles de bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias crecidas en TCBS (BCTCBS) durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana.*	52
3	Cepas de la granja y de referencia con API20 NE, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.	63
4	Cepas de la granja y de referencia con pruebas independientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.	65
5	Cepas de la granja y de referencia con API20 NE y pruebas independientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.	66
6	Cepas de vibrios utilizadas como referencia con API20 NE, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.	68
7	Cepas de vibrios utilizadas como referencia con pruebas independientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.	70
8	Cepas de vibrios utilizadas como referencia con API20 NE e independientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características de las marcas de quistes comerciales de *Artemia franciscana* analizadas. Igual número entre paréntesis corresponde a la misma marca.	10
II	Origen y clave de las cepas bacterianas recuperadas de TCBS de quistes de *Artemia franciscana* de marcas comerciales. 444 cepas en total.	14
III	Origen, características y clave de cepas bacterianas recuperadas en el medio TCBS de granja camaronícola de Puerto Peñasco, Sonora. 74 aislamientos.	19
IV	Cepas de bacterias *Vibrio* utilizadas como referencia en el estudio.	20
V	Porcentaje de eclosión y niveles de bacterias en quistes de *Artemia franciscana* de las diferentes marcas comerciales analizadas.	24
VI	Porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de diferentes marcas comerciales, en base al color de la colonia en el medio TCBS y su reacción al Gram. En paréntesis número de aisalmientos.	26
VII	Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana*, en base al color de la colonia en el medio TCBS y su reacción al Gram. En paréntesis número de aislamientos. Total de aisalmientos 444.	29
VIII	Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de diferentes marcas comerciales, en base a su reacción al Gram. En paréntesis, número de aislamientos.	29
IX	Caracterización de bacterias cocoides no fermentadoras, movilidad y oxidasa negativas, crecidas durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana,* aisladas del medio TCBS.	31
X	Caracterización de bacterias bacilares no fermentadoras, movilidad y oxidasa negativas, crecidas durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana*, aisladas del medio TCBS.	32

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
XI	Caracterización con pruebas de laboratorio de bacilos Gram negativo, oxidasa negativa, fermentadores de glucosa y productores de gas en O-F, crecidos durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana*, aislados del medio TCBS.	34
XII	Caracterización con API20 NE de bacilos Gram negativo, oxidasa negativa, fermentadores de glucosa y productores de gas en O-F, crecidos durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana*, aislados del medio TCBS.	35
XIII	Calidad de eclosión y niveles de bacterias de quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México. En paréntesis el error estándar.	36
XIV	Porcentaje de morfología de bacterias crecidas en TCBS, provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México. En paréntesis número de aislamientos. 96 aislamientos en total (24 por muestra).	37
XV	Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*, de poblaciones naturales de México, en base al color de la colonia en el medio TCBS y su reacción al Gram. En paréntesis número de aislamientos.	39
XVI	Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*, de poblaciones naturales de México, en base a su reacción al Gram. En paréntesis número de aislamientos.	39
XVII	Características bacteriológicas de quistes de *Artemia* (Salt Creek, lote 00016002) eclosionados en laboratorio (esterilidad 1 y 2) y en forma masiva en granja camaronícola (granja 1y 2). En paréntesis aislamientos analizados.	40
XVIII	Cargas bacterianas en muestras de agua para cultivo larvario de *Penaeus vannamei* y de nauplios de *Artemia* en granja camaronícola, en Puerto Peñasco, Sonora.	41

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
XIX	Cepas aisladas en TCBS de granja en Puerto Peñasco, Sonora, con respuestas similares a las pruebas contenidas en el sistema de identificación API20 NE. Todas las cepas son bacilos Gram negativo, oxidasa positiva. Grupo **A**: AA-6, AD-9, ZII-7, ZII-9, PL4-4, PL4-6; **B**: AA-1, AA-5, AD-5, AD-7, AD-08, AD-10, A2-8, ATT-1, ATT-3, M-5, MII-1, PL4-2, PL4-5, PL4-7, PL4-8; **C**: A2-9, AD-3; **D**:ATT-4; **E**: A1-1, A1-2, AD-2; **F**: AA-10; **G**: A1-3, AD-4; **H**: A1-4; **I**: ZII-6, MII-4; **J**: ZII-10. (A: nauplios de artemia; Z: tanque con larvas en estadio zoea; M: tanque con larvas en estadio mysis; PL: tanque con postlarvas).	43
XX	Respuestas de cepas de colección *Vibrio* de la ATCC (American Type Culture Collection) a las pruebas del sistema de identificación API20 NE.	44
XXI	Respuesta de crecimiento bacteriano en placas con Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-sales Biliares-Sacarosa) después de 18-24 horas de incubación a 35 ^{0}C (DIFCO, 1984).	47
XXII	Cepas recuperadas en TCBS del cultivo de artemia en granja camaronícola, identificadas como *Vibrio parahaemolyticus* según el sistema API20 NE y sus respuestas a pruebas independientes a dicho sistema.	62

BACTERIAS ASOCIADAS CON QUISTES COMERCIALES DE *Artemia franciscana* CULTIVADAS EN EL MEDIO SELECTIVO TCBS.

I. INTRODUCCIÓN

I.1.- Antecedentes.

En los últimos 20 años, la producción acuicultural de peces, moluscos y crustáceos ha sido afectada de manera importante por enfermedades virales y bacterianas, las cuales generalmente ocurren como epidemias y subsecuentemente se constituyen en endémicas (Mialhe *et al.*, 1992). En el caso del cultivo del camarón aunque las enfermedades virales son más devastadoras, las bacterianas son más frecuentes.

Anteriormente se consideraba que las bacterias patógenas encontradas en camarones enfermos eran del tipo oportunista (Lightner, 1985), pero actualmente se han identificado nuevos síndromes en los que estas bacterias se comportan como verdaderos patógenos primarios (Lightner, 1993; Ishimaru *et al.*, 1995).

Sin embargo, se ha visto que la mayoría de las infecciones bacterianas son de origen secundario (Lightner, 1985) como resultado de otras condiciones primarias que incluyen, enfermedades nutricionales y problemas de estrés extremo provocado por alta densidad del cultivo, cambios de temperatura, baja calidad de agua, parásitos y tratamientos químicos (Dixon, 1994). El estrés interfiere en la respuesta inmune de los organismos, dando como resultado una disminución en la eficacia de respuesta humoral, celular y fagocitaria de éstos por lo que la infección puede progresar (Ellis, 1989, en Dixon, 1994).

Casi todas las bacterias señaladas como patógenas para los organismos en cultivo, se han encontrado en éstos como parte de su microflora normal en su hábitat natural (Vanderzant *et al.*, 1971; Yasuda y Kitao, 1980). Las bacterias más importantes por su patogenicidad, son las que pertenecen al género *Vibrio* (Lightner, 1988). Este género ha sido relacionado con infecciones agudas en peces (Santos *et al.*, 1992; Vivares *et al.*, 1992; Saeed 1995), moluscos (Noel *et al.*, 1992; Anguiano-Beltrán, 1996), erizos (Santiago-Serrano, 1996), cangrejos (Muroga *et al.*, 1994) y en peneidos (Lightner y Lewis, 1975; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Adams, 1991; Vera *et al.*, 1992; Hameed y Rao, 1994; Monhey *et al.*, 1994).

I.1.1.- *Vibrio* spp. en peces y en crustáceos peneidos.

En los cultivos de peces ocho especies de *Vibrio* son consideradas como patógenas: *V. alginolyticus, V. anguillarum, V.carcharie, V. damsela, V. ordalli, V. vulnificus y V. salmonicida* (Egidius *et al.*, 1986; Austin y Austin, 1987). Cabe mencionar que *V. anguillarum* y *V. damsela* actualmente pertenecen al género *Listonella* propuesto por MacDowell y Colwell (1985), aunque dicho género no está reconocido oficialmente.

A *V. parahaemolyticus* también se le ha encontrado asociado en infecciones de peces, sin embargo, su patogenicidad no ha sido demostrada plenamente. Recientemente se han registrado mortalidades de peces en cultivo causadas por *V. harveyi* en Gran Bretaña (Saeed, 1995) y por *V. furnissi* en España (Esteve *et al.*, 1995). Estas especies anteriormente no habían sido consideradas como patógenas para peces en cultivo.

Por lo que respecta a enfermedades en camarones peneidos, las de origen bacteriano superan en incidencia a las virales, fúngicas o a las producidas por protozoarios. Nuevamente las bacterias halofílicas, especialmente las del género *Vibrio*, son consideradas la fuente del problema en cultivos de especies marinas y estuarinas (Lightner, 1988). Este género es muy abundante en ambientes marinos y estuarinos, por lo que prácticamente se les encuentra en cualquier agua empleada para cultivo, ya sea en fase larvaria o de engorda. Muchas de estas bacterias habitan en los sedimentos (Yasuda y Kitao, 1980) y en el tracto digestivo de crustáceos, tanto de organismos adultos como de larvas (Yasuda y Kitao, 1980; Dempsey y Kitting, 1987).

Chen *et al.* (1992), mencionan hasta 18 especies distintas de vibrios aisladas del hepatopáncreas de camarones moribundos de la especie de *Penaeus monodon* a lo largo de tres años de estudio en Taiwan. Las principales especies que encontraron fueron *Vibrio harveyi* (26.9 a 43.0% del total de especies), *V. damsela* (16.6 a 22.4%) y *V. nereis* (9.6 a 12.4%). En dicho estudio, los vibrios representaron del 73.4 al 84.6% de todas las especies de bacterias identificadas.

Otros miembros del género *Vibrio* involucrados en infecciones de camarones peneidos en cultivo son *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. fluvialis* y *V. anguillarum* (Lightner, 1988; Kwei-Lin, 1989; Bhaskar y Setty, 1994; Kuo-Kau, 1996).

Hameed (1989), relacionó mortalidades de *Penaeus indicus* en todos sus estadios con una bacteria semejante *a V. campbelli* y demostró la susceptibilidad de tres especies de peneidos a esta bacteria en la India (Hameed, 1995). *V. vulnificus* también se ha visto

involucrado en mortalidades de *P. monodon* y *P. japonicus* en Taiwan (Song *et al.* 1990). Mortalidades de larvas de *P. monodon* causadas por *V. harveyi* y *V. vulnificus* también han sido observadas en Filipinas (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990). Especies de *V. harveyi* resistentes a antibióticos han sido encontradas como responsables de mortalidades masivas de *P. monodon* en la India (Kurunosage *et al.*, 1994). En Ecuador, en cultivos de *P. vannamei*, Monhey *et al.* (1994), reconocieron como agentes causantes de mortalidades importantes también a especies del género *Vibrio*. Recientemente en Japón se informó de una nueva especie de *Vibrio,* denominada como *V. penaeicida* (Ishimaru *et al.*, 1995), anteriormente mencionada como *V. PJ*, la cual produce mortalidades en *P. japonicus* (De la Peña *et al.*, 1993).

Como se puede apreciar las infecciones bacterianas, y especialmente las generadas por bacterias del género *Vibrio*, crean grandes problemas de mortalidad en acuicultura, principalmente en las etapas larvarias de los organismos. Sin embargo, no es posible desarrollar los cultivos en medios libre de bacterias, pero sí se pueden controlar las fuentes potenciales de contaminación mediante la aplicación de sistemas de filtración de agua, de luz ultravioleta (Liltved *et al.*, 1995), y en cultivos de peces y crustáceos, mejorando la calidad sanitaria de los nauplios de *Artemia.* Estos nauplios, que se utilizan recién eclosionados para alimentación de estadios larvarios iniciales de peces y crustáceos, pueden constituirse en un vector importante para la transmisión de bacterias patógenas, principalmente del género *Vibrio* (Verdonck, *et al.*, 1994; Lizárraga-Partida *et al* 1997).

I.2.- Bacterias presentes en *Artemia* sp.

En salinas de la Bahía de San Francisco, California, Estados Unidos, hábitat natural de *Artemia*, Straub y Dixon (1993), encontraron una gran variedad de especies bacterianas relacionadas a los nauplios de *Artemia*, cuya diversidad depende de las condiciones de salinidad de los estanques de producción, predominando las bacterias del género *Vibrio* en las mayores salinidades (246.6‰). Anteriormente, también en su ambiente natural Austin y Allen (1982), observaron que en la superficie de los quistes de *Artemia* existían pequeñas poblaciones de bacterias, las cuales pueden llegar a desarrollarse cuando las condiciones les son favorables, lo que sucede durante el período de eclosión de los quistes (Straub y Dixon, 1993). Después de la eclosión en laboratorio Austin y Allen (1982), encontraron pocas bacterias adheridas a la superficie del nauplio mientras que las estructuras internas del mismo no las contenían, sin embargo, hacen mención de un buen número de bacterias en los quistes, entre éstas al patógeno *Vibrio parahaemolitycus*. Gilmour *et al.* (1975), solamente identificaron especies del género *Bacillus* en la superficie de quistes enlatados.

En sistemas de acuicultura, donde se emplean nauplios recién eclosionados, se ha visto que contienen cantidades considerables de bacterias, principalmente del género *Vibrio*, por lo que son considerados vectores importantes para la transferencia de microorganismos patógenos a los sistemas de cultivo larvario (Pector *et al.*, 1994; Verdonck *et al.*, 1994; GómezGil *et al.*, 1994; Muroga *et al.*, 1994). A pesar de lo anterior, se han realizado pocos estudios tendientes a conocer a fondo la flora bacteriana de los nauplios de *Artemia* en los tanques de eclosión (Gilmour *et al.*, 1975; Austin y Allen, 1982;

Verdonck *et al.*, 1994), y se han descrito pocos tratamientos efectivos para desinfección de nauplios (GómezGil *et al.*, 1994), lo cual se debe, en gran parte, a que dichos organismos pueden ser sensibles a los compuestos químicos comúnmente empleados como desinfectantes (Muroga *et al.*, 1994).

Para superar el problema de bacterias en la superficie de quistes, se ha sugerido realizar un proceso de descapsulación de los mismos (Sorgeloos *et al.*, 1977; Merchie *et al.*, 1997), sin embargo, este procedimiento no asegura la ausencia total de patógenos una vez que los quistes han eclosionado (GómezGil, 1993).

1.3.- Principal fuente de quistes de *Artemia franciscana.*

El Gran Lago Salado de Utah, Estados Unidos, es sin duda, a nivel mundial, la mayor fuente de quistes para la acuacultura ya que aporta el 90% de la producción total de quistes, de los cuales el 85% es destinado a los cultivos larvarios de camarón en el mundo (Anónimo, 1994). Este lago se ubica al norte del Estado de Utah, en Estados Unidos, y se considera el sucesor del Gran Lago de Boneville (Vaughn, 1994), y tiene una longitud y anchura aproximada de 100 millas y 45 millas, respectivamente, y está dividido en dos regiones conocidas como brazo Norte y Sur (Stephens, 1990).

En el Lago acontecen variaciones importantes en la salinidad, que dependen de la época de lluvias o sequía, éstas van desde 50‰ hasta 250‰ y modifican substancialmente la cadena alimenticia del sistema (Stephens, 1990; Wurtsbaugh, 1992) y, por lo tanto, pueden generar cambios en la calidad de eclosión de los quistes cosechados y variar su flora

bacteriana (Straub y Dixon, 1993). La variedad de ambientes en el Lago son notables, así se tiene que en la parte sur de éste existe un gran aporte de materia orgánica (mencionado por Gómez-Gil, 1993) a diferencia de la región norte.

Con todo lo anterior, es de esperarse que la calidad de los quistes varíe dependiendo de la zona de cosecha y compañía que los procese, ya que los tratamientos a los que se someten, previos al envasado, no necesariamente son iguales entre estas compañías.

Otro aspecto importante que debe ser tomado en cuenta al trabajar con quistes de *Artemia*, es su vida de anaquel y como se mencionó anteriormente, su origen, ya que es probable que no todas las cepas de quistes contengan ni la misma carga, ni las mismas especies de bacterias. Así mismo, cada laboratorio acuícola puede utilizar metodologías distintas para su eclosión, por lo que la variedad microbiana puede incrementarse. A estos aspectos no se les ha dado la debida importancia hasta hoy.

Por todo lo anteriormente expuesto, para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

I.IV. OBJETIVOS:

- Evaluar la carga de bacterias crecidas en TCBS (BCTCBS) y bacterias heterótrofas viables (BHV) presentes en quistes de *Artemia franciscana* de diferentes marcas comerciales y de poblaciones naturales de México, durante la eclosión.

-Determinar la calidad de eclosión de los quistes.

- Correlacionar la calidad de eclosión de los quistes con su carga bacteriana.

- Comparar las poblaciones bacterianas recuperadas en TCBS, cuando la eclosión de los quistes se realiza bajo dos condiciones de cultivo: comercial y en laboratorio.

- Caracterizar a las bacterias crecidas en el medio TCBS, con características de *Vibrio* (bacilos Gram negativo, oxidasa positiva), asociadas a los nauplios de *Artemia franciscana* en una granja camaronícola, mediante una selección de pruebas de laboratorio, comparadas con el sistema de diagnóstico API20 NE.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

II.1.- Obtención de muestras.

II.1.1.- Quistes comerciales:

Se obtuvieron 20 muestras de quistes de *Artemia franciscana* de 11 marcas comerciales diferentes (Tabla I). Éstas se obtuvieron de granjas productoras de larvas de camarón en los Estados de Sonora, Sinaloa y de un laboratorio productor de postlarvas de camarón en Ensenada, Baja California. Todos los quistes proceden del Gran Lago Salado de Utah, excepto los quistes de la marca de San Francisco Bay Brand, cuyo origen probablemente sea de la Bahía de San Francisco, en California, ambos en Estados Unidos de Norteamérica. La edad en el mercado de las marcas de quistes fue muy variada, contando con muestras compradas en 1997, hasta marcas adquiridas en 1989.

II.1.2.- Quistes de poblaciones naturales:

También se analizaron cuatro muestras de quistes de *Artemia franciscana* provenientes de poblaciones naturales de México cosechados en diferentes tiempos. Los quistes fueron proporcionados por el Dr. Francisco Correa Sandoval, del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de Ensenada, Baja California. Las muestras fueron de las salinas de Hidalgo, San Luis Potosí; Sosa Texcoco, Estado de México; Yavaros, Sonora y salinas El Marqués, Oaxaca y fueron cosechados en 1985, 1990, 1992 y 1993 respectivamente.

Tabla I.- Características de las marcas de quistes comerciales de *Artemia franciscana* analizadas. Igual número entre paréntesis corresponde a la misma marca.

MARCA (CLAVE)	LOTE	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	FECHA DE COMPRA
Great Lake Artemia (GLA2) (1)	GLA90	AJART-CRIP, Ensenada, Baja California	Abril 1997
Prime USA (PRIME) (2)	971020	Maricultivos del Pacífico, Mazatlán Sinaloa	marzo 1997
Sanders grado B (SAND1) (3)	SP1352	I.I.O-UABC, Ensenada, Baja California. .	noviembre 1996
Sanders grado B (SAND2) (3)	SP1547	AJART-CRIP, Ensenada, Baja California.	julio 1996
INVE (INVE) (4)	06335	MARITECH, Golfo Sta. Clara, Sonora.	Julio 1996
Salt Creek. Nitropak (SAC1,2,3) (5)	00016002	GÉNESIS, Pto. Peñasco, Sonora	Junio 1996
Biomarine-Aquaf. (1) (BIO1) (6)	sin lote	AQUANOVA, Mazatlán, Sinaloa.	Mayo 1996
Great Lake Artemia (GLA1) (1)	sin lote	CIBNOR, Guaymas Sonora.	1996
Biomarine Aquaf. (BIO2) (6)	sin lote	CIBNOR, Guaymas Sonora.	1995
Argentemia grado II (ARGGII) (7)	#B52308K	CIBNOR, Guaymas Sonora.	1995
Aurum 90+ (A90) (8)	769	DICTUS, Pto. Peñasco, Sonora.	Diciembre 1994
Argentemia grado I (ARGGI1) (7)	900103	I.I.O-UABC, Ensenada, Baja California.	caducada 1993
Argentemia grado I (ARGG12) (7)	900103	AJART-CRIP, Ensenada, Baja.California.	caducada 1993
Utah Pacific 90% (UP1) (9)	sin lote	GÉNESIS, Pto. Peñasco, Sonora.	1992
Utah Pacific 85% (UP2) (9)	sin lote	GÉNESIS, Pto. Peñasco, Sonora.	1992
Salt Lake (SAL) (10)	1689	DICTUS, Pto. Peñasco, Sonora.	Diciembre 1989
San Fco. Bay Brand (SFBB1) (11)	1342	DICTUS, Pto. Peñasco, Sonora.	Diciembre 1989
San Fco. Bay Brand (SFBB2) (11)	1739	DICTUS, Pto. Peñasco, Sonora.	Diciembre 1989

II.1.3.- Eclosión de quistes:

Tanto los quistes comerciales como los de poblaciones naturales fueron eclosionados a una densidad de 5 gr./L, de acuerdo a Sorgeloos *et al.*, (1986). El medio de eclosión se preparó con agua de mar filtrada por 0.45 µm y diluida al 50 % (v/v) con agua destilada. Se emplearon 400 ml para 2 gramos de quistes comerciales y 200 ml para 1 gramo de quistes de poblaciones naturales. El pH del agua no se modificó y fluctuó entre 7.8-8.0 después de la esterilización. A los quistes no se les aplicó ningún tratamiento de desinfección previo a la eclosión.

Tanto el sistema (Fig. 1) como el agua de eclosión se manejaron en condiciones de esterilidad, para asegurar que las bacterias existentes y recuperadas, provinieran exclusivamente de los quistes y no del aire o del sistema de cultivo.

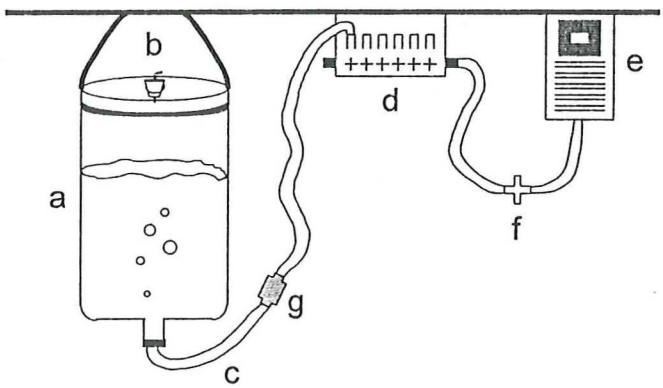

Fig. 1. Sistema experimental: a) botella de vidrio, b) tapón de neopreno, c) manguera, d) distribuidor de aire, e) bomba para acuario, f) filtros hidrófobos, g) válvula de seguridad.

La efectividad de los filtros hidrófobos (bacterial air vent marca Gelman de 0.2μm) del sistema de aire fue comprobada anteriormente por Anguiano-Beltrán (1996), burbujeando aire filtrado en un medio peptonado, donde no se detectaron bacterias en un período de 64 horas.

Para quistes comerciales se realizaron tres repeticiones por muestra, mientras que para los de poblaciones naturales solo dos, debido a la cantidad de muestra disponible. La incubación se llevó a cabo durante 48±2 horas con iluminación, de aproximadamente 1000 lux (equivalente promedio a la luz del día) y aireación constantes, a una temperatura controlada de 28-30 ^{0}C. Para cada repetición se evaluó el número de quistes al inicio de la incubación y de nauplios al final de la misma. Para lo anterior se tomaron cinco alícuotas de 0.1 ml con una micropipeta de precisión (pipetman, GILSON). Antes de su conteo, las muestras se fijaron con Lugol para favorecer su manejo y observación, el cual se realizó en un microscopio estereoscópico (Bausch & Lomb). Con estos datos se calculó el porcentaje de eclosión.

II.2.- Análisis bacteriológicos.

II.2.1.- Quistes:

Después de la incubación, los nauplios se cosecharon asépticamente sin descartar el agua de eclosión, en recipientes de vidrio estériles adaptados para su uso en una licuadora. Éstos se homogeneizaron por un minuto en una licuadora Osterizer a máxima velocidad. Del homogeneizado se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-5} en tubos de ensayo con 9 ml de agua de mar al 50% (v/v). Seguidamente, se sembraron alícuotas de 0.1 ml en los medios

de cultivo de agar ZoBell (agar marino 2216), para evaluar bacterias heterótrofas viables (BHV) y TCBS (Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa) de la marca DIFCO (anexo A), para evaluar a las bacterias crecidas en este medio (BCTCBS) (este medio es selectivo para aislamiento de bacterias *Vibrio*). Se sembraron dos placas para cada dilución seleccionada, a través de la técnica de esparcido en superficie (APHA, 1992) con un rastrillo de vidrio. De manera general, las siembras de las placas se hicieron con las diluciones 10^{-5} para ZoBell y 10^{-3} para TCBS. Las placas se incubaron por 48±2 horas a 28±2 ^{0}C. Se emplearon para conteo las placas cuyas diluciones produjeron entre 30 y 200 colonias.

II.2.2.- Aislamiento, purificación y conservación de cepas bacterianas:

De las bacterias crecidas en TCBS, se seleccionaron al azar entre 10 y 30 colonias por muestra para un total de 444 para quistes comerciales y 96 (24 por muestra) para los de poblaciones naturales. Las cepas escogidas fueron resembradas dos veces en agar ZoBell para purificarlas a través de su morfología colonial. Las cepas purificadas se transfirieron a recipientes de vidrio con tapón de rosca con 10 ml de agar T_1N_1 (1.0% de Triptona (DIFCO), 1.0% de NaCl (SIGMA) y 1.5% de agar bacteriológico (DIFCO)) inclinado, por estría continua en superficie. Los recipientes se etiquetaron con la fecha y origen de la cepa (Tabla II) y se conservaron a temperatura ambiente (20-25 ^{0}C). Se resembraron cada tres meses hasta su análisis.

II.2.3.- Pruebas básicas:

Los fundamentos y metodologías del total de pruebas aplicadas se pueden consultar en el Anexo A.

A todas las cepas se les registró su coloración colonial en TCBS (amarillas o verdes) y en agar ZoBell para determinar la producción de pigmentos a través de la coloración colonial (pigmentación). Así mismo, se les aplicaron dos pruebas básicas: reacción a la oxidasa, con reactivo disponible comercialmente (BBL, Becton Dickinson, Co.) y tinción Gram con reactivos de DIFCO y se empleó como testigos a cepas contenidas en porta objetos preparados de Fisher Brand Gram. Adicionalmente se les realizó la prueba de la catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%, Jaloma). Estas pruebas se realizaron sobre cultivos en agar ZoBell con 18-24 horas después de haber sido resembrados.

Tabla II.- Origen y clave de las cepas bacterianas recuperadas de TCBS de quistes de *Artemia franciscana* de marcas comerciales. 444 cepas en total.

MARCA	LOTE	# DE AISLAMIENTOS	CLAVE CEPAS
Utah Pacific 90%(1)	sin lote	30	UP1 (1-30)
Aurum 90+	769	30	A90 (31-60)
Biomarine Aquaf. (1)	sin lote	30	BIO1 (61-90)
Salt Creek (1)	00016002	30	SAC1 (91-120)
INVE	06335	30	INVE (121-150)
Utah Pacific 85% (2)	sin lote	30	UP2 (151-180)
San Fco. Bay Brand (1)	1342	30	SFBB1 (181-210)
Salt Creek (2)	00016002	10	SAC2 (211-220)
Salt Creek (3)	00016002	10	SAC3 (221-230)
Salt Lake	1689	0	NO AISLAMIENTO
San Fco Bay Brand (2)	1739	10	SFBB2 (231-240)
Argentemia grado II	B52308K	30	ARGGII (241-270)
Biomarine aquaf. (2)	sin lote	30	BIO2 (271-300)
Argentemia grado I (1)	900103	0	NO AISLAMIENTO
Sanders grado B (1)	SP1352	24	SAND1 (301-324)
Prime USA	971020	30	PRIME (325-354)
Great Lake Artemia (1)	sin lote	30	GLA1 (355-384)
Great Lake Artemia (2)	GLA90	30	GLA2 (385-414)
Sanders grado B (2)	SP1547	30	SAND2 (415-444)
Argentemia grado I (2)	900103	0	NO AISLAMIENTO

II.2.4.- Caracterización de cepas:

Debido a que la gran mayoría de las cepas fueron Gram positivo, no se consideró importante invertir tiempo y dinero en su identificación, ya que éstas no se han encontrado en infecciones bacterianas de camarones. Sin embargo, se eligieron algunas cepas, únicamente de quistes comerciales, para intentar identificarlas ó al menos ubicarlas dentro de algún grupo taxonómico. Del total de cepas aisladas de quistes comerciales se seleccionaron 52, en base a sus características de morfología celular y de reacción al Gram. Éstas fueron 15 cocos y 37 bacilos/cocobacilo (incluyendo tres cepas de bacilos Gram negativo). Todas las cepas se sembraron en el medio O-F (DIFCO) con glucosa (Mac Faddin, 1993), para evaluar el metabolismo sobre este carbohidrato, según lo recomendado por Lightner (1996) para bacterias marinas.

A las cepas de cocos, adicionalmente se les probó su capacidad para crecer a salinidad de 15% de NaCl en el medio T_1 N_{15} (1.0% triptona (DIFCO), 15% NaCl (SIGMA) y 1.5% de agar bacteriológico (DIFCO)) a temperatura de 28-30 ^{0}C, con el fin de poder diferenciar a los géneros potenciales *Staphylococcus* de *Micrococcus* (MacFaddin, 1993).

II.2.4.1.- Cepas fermentadoras de glucosa:

A las cepas que fermentaron la glucosa en el medio O-F, se les aplicaron otras 16 pruebas bioquímicas y de crecimiento comunes en laboratorio, además fueron analizadas

por el sistema de identificación bacteriana API20 NE (BioMériux S.A, Francia). Estas pruebas se detallan en las secciones II.3.3.1 y II.3.3.2.

II.3.- Bacteriología en granja camaronícola.

Con la finalidad de comparar las poblaciones bacterianas recuperadas en la eclosión de quistes comerciales en laboratorio (condiciones de esterilidad), con las poblaciones de sistemas comerciales de producción masiva de nauplios de *Artemia*, se solicitó el apoyo físico de una granja productora de larvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) ubicada en Puerto Peñasco, Sonora.

Con la granja se plantearon los siguientes trabajos:

II.3.1.- Comparación de sistemas de eclosión de quistes:

Para lo anterior se realizaron dos corridas paralelas de eclosión de quistes en laboratorio (esterilidad), como se especificó en la sección II.1.3. (el tiempo de eclosión se redujo a 24 horas) y en la granja según su propia metodología. Esta última consistió en la eclosión masiva de quistes (450 gr./100 L) por 24 horas en agua de mar filtrada por filtros de cartucho de 1μm, y diluida aproximadamente al 50% (v/v) para una salinidad próxima a 22 ‰. Se utilizaron tanques de fibra de vidrio lavados con anterioridad con solución clorada a una concentración de 200 ppm. A los quistes no se les dio ningún tratamiento previo a la eclosión. Los quistes utilizados fueron de Salt Creek lote 00016002. El tiempo de eclosión fue de 24 horas.

Los nauplios de laboratorio se cosecharon como se estableció con anterioridad (sección II.2.1). En la granja los quistes se recuperaron en una malla de 100 μm y se desechó el agua de eclosión. Inmediatamente los nauplios fueron lavados con agua de mar y diluidos en esta misma, de aquí se tomaron muestras asépticamente en tubos de centrífuga con tapón de rosca estériles de 50 ml de capacidad (VWR Scientific). En ambos sistemas se evaluó el número de nauplios como se especificó anteriormente (sección II.1.3). Las muestras se homogeneizaron y diluyeron para conteos bacteriológicos por esparcido en superficie en TCBS según se estableció en la sección II.2.1. Las cepas aisladas se purificaron y conservaron en T_1N_1 como se indicó en la sección II.2.2.

Para cada corrida y sistema se analizaron 10 colonias (20 en total por sistema), evaluando su reacción a la oxidasa y al Gram, como se estableció con anterioridad (sección II.2.3). Las cepas aisladas de nauplios de *Artemia* de la granja se etiquetaron como A1 y A2, mientras que las del laboratorio como SAC2 y SAC3. Estas últimas se incluyeron, para el análisis, en la colección de cepas bacterianas de quistes comerciales y las primeras en la colección de la granja.

II.3.2.- Bacteriología de tanques de cultivo larvario y *Artemia*.

Para dar seguimiento a las poblaciones bacterianas encontradas en los nauplios de *Artemia* en la granja, se muestrearon 8 tanques de cultivo con larvas de camarón en

diferentes estadios de desarrollo, desde zoea (donde no se ha alimentado aún con nauplios de *Artemia*) hasta postlarva. La toma de muestra se realizó con frascos de vidrio estériles de 250 ml con tapón de rosca. Así mismo, se incrementó el número de muestreos en nauplios de *Artemia*; se analizó un tanque al que se le aplicó un tratamiento de disminución escalonada de salinidad de 22‰ hasta 0‰, en un lapso de 1 hora. Aquí se tomó muestra antes y después del tratamiento. También se muestreó un lote de nauplios de *Artemia* el cual fue sometido a tratamiento térmico de 60 ^{0}C por 5 minutos. Todas las muestras se procesaron bacteriológicamente como se estableció en la sección II.2.1, excepto las muestras de agua de tanques de cultivo que no se homogeneizaron. Las muestras sólo se sembraron en TCBS. Los aislamientos se purificaron y conservaron de acuerdo a la sección II.2.2.

Se recuperaron diferente número de cepas por muestra. La relación total de cepas y sus características se pueden consultar en la Tabla III.

II.3.3.- Pruebas para caracterización de cepas aisladas de la granja:

Las 34 cepas recuperadas de la granja, más las tres fermentadoras de glucosa aisladas de quistes comerciales junto con 13 cepas de colección de bacterias *Vibrio* obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) (Tabla IV) fueron sometidas a dos tipos de pruebas:

II.3.3.1.- Pruebas bioquímicas y de crecimiento comunes en laboratorio (pruebas independientes):

Tabla III.- Origen, características y clave de las cepas bacterianas recuperadas en el medio TCBS de granja camaronícola de Puerto Peñasco, Sonora. 74 aislamientos.

MUESTRA	CARACTERÍSTICA	# DE AISLAMIENTOS	CLAVE CEPAS
Nauplios de *Artemia*[a]	lavados con agua de mar	5	A1 (1-5)
Nauplios de *Artemia*[a]	lavados con agua de mar	10	A2 (1-10)
Nauplios de *Artemia*	lavados y calentados por 5 min/60 ^{0}C.	5	ATT (1-5)
Nauplios de *Artemia*[b]	antes de bajar salinidad	10	AA(1-10)
Nauplios de *Artemia*[b]	después de bajar salinidad	10	AD (1-10)
Agua de tanque de cultivo	larvas en estadio mysis	5	M (1-5)
Agua de tanque de cultivo.	postlarvas	5	PL (1-5)
Agua de tanque de cultivo C-23	larvas en estadio zoea II	5	ZII (1-5)
Agua de tanque de cultivo C-24	larvas en estadio zoea II	5	ZII (6-10)
Agua de tanque de cultivo C-6	larvas en estadio mysis II	6	MII (1-6)
Agua de tanque de cultivo C-13	postlarvas 4	3	PL4 (1-3)
Agua de tanque de cultivo C-14	postlarvas 4	5	PL4 (4-8)

a: nauplios de *Artemia* utilizados para la comparación de sistemas.
b: mismo cultivo de nauplios para el tratamiento.

Tabla IV.- Cepas de bacterias *Vibrio* utilizadas como referencia en el estudio.

CEPA	# ATCC
V. alginolyticus	17749
V. campbelli	25920
**V. cholerae NO-O1*	(SO-116)
V. damsela	33539
V. fisheri	7744
V. fluvialis	33809
V. harveyi	14126
V. metschnikovii	7708
V. mimicus	33653
V. parahaemolyticus	17802
V. pelagius	25916
V. proteolyticus	15338
V. vulnificus	27562

ATCC: American Type Culture Collection. Rockville, Maryland.
* : no pertenece a la ATCC.

Al total de cepas se les aplicó una selección de pruebas que incluyeron: tinción Gram (reactivos de DIFCO); reacción a la oxidasa (reactivo de BBL, Becton, Dickinson Co.); crecimiento a 42 ^{0}C en agar ZoBell; prueba del desoxicolato de sodio (Kaye *et al.*, 1994); crecimiento a salinidad de 0%, 1.0%, 3.0%, 6.0%, 8.0% y 10.0%, en un medio con triptona, NaCl y agar (FDA, 1992; Lightner, 1996) a 28-30 ^{0}C; Lisina decarboxilasa de Falkow y arginina dehidrolasa en medios con 2.0% de sal (MacFaddin, 1993; Lightner, 1996); en el medio MIO (DIFCO) con una salinidad de 2.0% se evaluó la ornitina decarboxilasa y la movilidad; fermentación de glucosa en el medio O-F (DIFCO) según lo propuesto por Lightner (1996); luminiscencia en el medio ZoBell, según lo establece

Montoya-Rodríguez (1992) y desplazamiento superficial (swarming) en el medio de agar ZoBell. En este último medio también se evaluó la pigmentación por coloración colonial. Todas las pruebas se detallan en el Anexo A.

II.3.3.2.- Sistema API20 NE (recomendado para bacterias no entéricas, oxidasa positiva).

Se procedió de acuerdo a las recomendaciones del producto. Sólo se modificó la solución salina, a la cual se le incrementó la salinidad de 0.85% a 2.5% (MacDonell *et al.*, 1982; Ligthner, 1996). Todas las cepas fueron reactivadas por 24 horas en agar ZoBell, preparado con agua destilada y 2.5% de NaCl.

II.4.- Análisis estadísticos y taxonómicos.

II.4.1.- Quistes:

Se llevaron a cabo análisis de regresión lineal con el programa Microsoft EXCEL, 5.1, para determinar la posible relación existente entre el porcentaje de eclosión con la edad relativa de los quistes (desde la compra hasta el análisis en laboratorio); así mismo, con el número de bacterias cuantificadas, tanto BHV como con BCTCBS.

Los datos de conteos bacterianos se transformaron para su análisis por medio del logaritmo base 10 y los porcentajes de eclosión por medio del arcoseno$\sqrt{p}$, según lo establece Zar (1984) para aproximar los datos a la normalidad.

II.4.2.- Cepas de la granja:

Los resultados de las pruebas aplicadas a las cepas tanto tradicionales (independientes) como del API20 NE fueron modificados para poder ser analizadas. A las respuestas positivas, las formas bacilares y el color amarillo en TCBS se les asignó un valor de 1, mientras que a las respuestas diferentes a éstas un valor de cero. Estos datos se procesaron con el programa STADISTICA (Stat Soft Inc. 1993) y con la técnica de agrupamiento se construyeron los dendrogramas. Para éstos se utilizó una matriz de correlación simple (Pearson r), la cual es ajustada por el programa para representar disimilitud o distancias entre las cepas analizadas. El ajuste se hace automáticamente mediante la forma 1-Pearson r. Las distancias encontradas en las cepas se unieron con el método de promedios de pares de grupos con igual peso estadístico (Sneath y Sokal, 1973). En este método, la distancia entre dos grupos (cepas) es calculada como la distancia promedio entre todos los pares de cepas en los dos grupos diferentes. El método es muy eficiente cuando los objetos analizados, de naturaleza distinta, tienden a agruparse. Dicho método se utilizó en este estudio porque presentó la mejor separación entre las cepas analizadas, y concordó ampliamente con la identificación presentada por API20 NE.

III. RESULTADOS

III.1.- Quistes comerciales.

III.1.1.- Eclosiones y bacteriología:

Los resultados de eclosiones y análisis bacteriológico se pueden ver en la Tabla V. En general, la calidad de eclosión de los quistes no estuvo relacionada con el tiempo de vida de las muestras en el mercado (R^2 =0.38668, α=0.05) (Tabla BI, Anexo B). Cuatro marcas compradas entre 1995-1997 (Tabla I) dieron porcentajes de eclosión superiores al 90%. Estas fueron PRIME USA (lote 971020), GREAT LAKE ARTEMIA (2) (lote GLA90), ARGENTEMIA GRADO II (lote B5230K), SALT CREEK (1 y 2) (lote 00016002). Sin embargo, algunas muestras a pesar de ser de reciente compra (en relación al tiempo de análisis) presentaron eclosiones inferiores al 60%: BIOMARINE AQUAFAUNA (1) (sin lote), INVE (lote 06335) y SANDERS GRADO B (lote SP1547).

Las muestras de SAN FRANCISCO BAY BRAND (lotes 1342 y 1739) así como SALT LAKE (lote 1689) compradas en 1989, dieron los menores porcentajes de eclosión, con 27.7, 0 y 3.5 % respectivamente.

Por lo referente a la bacteriología, se encontró que los niveles de bacterias heterótrofas viables (BHV) presentaron un patrón regular, independientemente de la marca, en relación con el porcentaje de eclosión (R^2=0.06954, α=0.05) y edad de los quistes (R^2=0.1939, α=0.05) (Tablas BII y BIII, respectivamente, Anexo B), sin relación aparente.

Tabla V.- Porcentaje de eclosión y niveles de bacterias en quistes de *Artemia franciscana* de las diferentes marcas comerciales analizadas.

MARCA (clave)	QUISTES/GR ±error estándar	NAUPLIOS/GR ±error estándar	% ECLOSIÓN [a] ±error estándar	BHV[b] (UFC/ml)	BCTCBS[c] (UFC/ml)
UP1	280066±5003	234200±4181	83.6±1.5	$2.8X10^8$	$1.3X10^6$
UP2	276475±7260	229136±6792	82.9±2.5	$9.2X10^7$	$6.0X10^6$
A90	275013±8657	239067±5221	86.9±1.9	$3.5X10^8$	$7.1X10^5$
BIO 1	287 544±5461	167260±3795	53.9±1.2	$4.6X10^7$	$4.0X10^5$
BIO 2	332998±10720	120515±4645	38.8±1.5	$8.2X10^7$	$1.2X10^6$
SAC 1	262018±9659	213259±43696	81.3±1.67	$6.3X10^7$	$1.8X10^6$
SAC 2	262018±9659	245520±5414	93.6±2.1	$2.9X10^8$	$5.3X10^6$
SAC 3	262018±9659	243772±7942	93.0±3.0	$3.9X10^8$	$8.7X10^7$
INVE	308133±8821	153533±5246	49.8±1.7	$1.2X10^8$	$2.7X10^6$
ARGGII	310374±6673	290432±7720	93.6±2.5	$7.3X10^7$	$3.4X10^6$
ARGGI1	269956±6728	237423±8195	87.9±3.0	$3.2X10^7$	$<1.0X10^1$
ARGGI2	269956±6728	200615±5890	74.3±2.2	$3.7X10^7$	$<1.0X10^1$
SAND1	296032±8574	233758±5723	79.0±1.9	$4.5X10^7$	$8.5X10^3$
SAND2	295600±5668	145733±4522	49.3±1.5	$1.3X10^8$	$1.6X10^6$
PRIME	266759±5318	265962±1665	99.6±0.6	$1.1X10^7$	$7.2X10^6$
GLA1	279000±5231	188400±8771	67.5±4.3	$1.3X10^8$	$6.8X10^7$
GLA2	279000±5231	268286±3825	95.8±1.4	$5.4X10^7$	$3.0X10^6$
SFBB1	383400±17030	106405±3644	27.7±1.0	$5.5X10^7$	$1.1X10^4$
SFBB2	383405±17039	0	0	$6.6X10^7$	$9.0X10^1$
SAL	244533±7230	8667±1041	3.5±0.4	$3.5X10^6$	$<1.0X10^2$

a: eclosión a las 48 horas.
b: bacterias heterótrofas viables (unidades formadoras de colonias/ml).
c: bacterias crecidas en TCBS (unidades formadoras de colonias/ml).

Los valores promediaron 10^7 -10^8 UFC/ml excepto para la marca SALT LAKE (lote 1689) que promedió 3.5X10^6 UFC/ml.

En las bacterias crecidas en TCBS (BCTCBS), se presentó un patrón semejante a las BHV, pero con promedios inferiores hasta en dos órdenes de magnitud (10^5- 10^7 UFC/ml) con relación ligeramente inversa con la edad (R^2=0.57955, α=0.05) (Tabla BIV, Anexo B). pero sin relación con el porcentaje de eclosión (R^2=0.24126 α=0.05, Tabla BV, Anexo B). La marca ARGENTEMIA GRADO I (lote 9000103) presentó un patrón diferente, en las dos latas analizadas, ya que no hubo crecimiento bacteriano en TCBS a la menor dilución sembrada (0.1 ml de la dilución 10^0). En las muestras de mayor edad, los promedios bajaron hasta 10^1-10^4 UFC/ml.

Las BHV y las BCTCBS no presentaron relación estadística importante (Tabla BVI, Anexo B) sin embargo, fue característico que las primeras presentaron una mayor concentración que las segundas, pero mantuvieron generalmente la misma tendencia.

III.1.2.- Caracterización de morfología bacteriana:

Se aislaron y analizaron un total de 444 cepas cuya variedad morfológica celular se puede observar en la Tabla VI. Esta variedad comprendió diplococos, cocos, cocobacilos y bacilos. Las cepas presentaron reacción tanto positiva como negativa al Gram y crecieron en TCBS desarrollando colonias de color verde o amarillo indistintamente. La forma de diplococo fue la menos abundante sólo se observó en las marcas de quistes

Tabla VI.- Porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de diferentes marcas comerciales, en base al color de la colonia en el medio TCBS y su reacción al Gram. En paréntesis número de aislamientos.

Morfología	Reacción al Gram	Color en TCBS	UP1	UP2	A90	BIO1	BIO2	INVE	SAC1	SAC2	SAC3
bacilos	+	amarillo	3.3(1)	56.7(17)	33.3 (10)	10(3)	40(12)	26.7(8)	30(9)	90(9)	100(10)
		verde	20.0(6)	10(3)	0	0	43.3 (13)	36.7(11)	0	0	0
	–	amarillo	0	0	6.6(2)	0	0	0	0	10(1)	0
		verde	0	0	0	0	0	6.7(2)	0	0	0
cocobacilos	+	amarillo	6.7(2)	6.7(2)	10(3)	90(27)	6.7(2)	0	66.7 (20)	0	0
		verde	26.7(8)	26.7(8)	6.7(2)	0	6.7(2)	10(3)	0	0	0
	–	amarillo	0	0	0	0	0	0	3.3(1)	0	0
		verde	13.3(4)	0	3.3(1)	0	0	0	0	0	0
cocos	+	amarillo	0	0	0	0	3.3(1)	0	0	0	0
		verde	3.3(1)	0	0	0	0	0	0	0	0
	–	amarillo	0	0	0	0	0	6.7(2)	0	0	0
		verde	6.7(2)	0	6.7(2)	0	0	13.3(4)	0	0	0
diplococos	+	amarillo	0	0	10(3)	0	0	0	0	0	0
		verde	6.7(2)	0	6.7(2)	0	0	0	0	0	0
	–	amarillo	3.3(1)	0	16.7(5)	0	0	0	0	0	0
		verde	10(3)	0	0	0	0	0	0	0	0

UP1: Utah Pacific (1); UP2:Utah Pacific (2); A90: Aurum 90+; BIO:Biomarine aquafauna (1 y 2). 1; SAC: SaltCreek (1, 2 y 3).

Continúa.

TablaVI.- Continuación.

Morfología	Reacción al Gram	Color en TCBS	ARGGII	SAND1	SAND2	PRIME	GLA1	GLA2	SFBB1	SFBB2
bacilos	+	amarillo	3.3(1)	79.2(19)	86.7(26)	60(18)	73.3(22)	66.7(20)	10(3)	60(6)
		verde	40(12)	0	0	16.7(5)	0	0	20(6)	40(4)
	–	amarillo	0	0	0	0	0	0	0	0
		verde	0	0	0	0	0	0	0	0
cocobacilos	+	amarillo	0	20.8(5)	0	16.7(5)	10(3)	33.3(10)	6.7(2)	0
		verde	0	0	6.7(2)	6.7(2)	0	0	23.3(7)	0
	–	amarillo	0	0	0	0	0	0	0	0
		verde	0	0	0	0	0	0	0	0
cocos	+	amarillo	56.7(17)	0	6.7(2)	0	0	0	3.3(1)	0
		verde	0	0	0	0	0	0	36.7(11)	0
	–	amarillo	0	0	0	0	0	0	0	0
		verde	0	0	0	0	16.7(5)	0	0	0

ARGGII: Argentemia grado II; SAND: SANDERS (1 y 2); PRIME: Prime USA; GLA: Great Lake Artemia (1 y 2); SFBB: San Fco Bay Brand (1 y 2)

de UTAH PACIFIC 1 (sin lote) y Aurum 90+ (lote 769). Estas dos marcas presentaron toda la variedad de morfología bacteriana encontrada. Las muestras con menor variedad morfológica lo fueron las marcas de SAN FRANCISCO BAY BRAND (2) (lote 1379) y SALT CREEK (2 y 3) (lote 00016002), donde sólo se observaron bacilos Gram positivo (en estas muestras únicamente se analizaron 10 aislamientos).

Los bacilos Gram positivo con colonias amarillas en TCBS se encontraron en todas las muestras de quistes, con un porcentaje total de presencia de 43.7%, seguidos de los cocobacilos Gram positivo, colonias amarillas, con el 18.24% (Tabla VII). En total, las cepas presentaron colonias amarillas en TCBS en el 70.1% de los casos, el resto dieron colonias verdes ó cremas.

El porcentaje de morfología bacteriana expresado solamente en base a la reacción al Gram se puede consultar en la Tabla VIII. Los bacilos Gram positivo sumaron 57.2% (254 aislamientos), mientras que los cocobacilos Gram positivo representaron el 25.9% (115 aislamientos) de las cepas. La forma bacteriana que se encontró en menor número fueron bacilos Gram negativo con 1.13% (5 cepas) del total de casos, estos resultados indican que la población de Gram positivos representó el 92% de las cepas estudiadas.

El 98.2% de las cepas estudiadas presentaron pigmentación (dato no presentado en tablas).

Tabla VII.- Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana*, en base al color de la colonia en el medio TCBS y su reacción al Gram. En paréntesis el número de aislamientos. Total de aislamientos 444.

MORFOLOGÍA	REACCIÓN AL GRAM	COLOR EN TCBS	%
bacilos	+	amarillo	43.69 (194)
		verde	13.51 (60)
	–	amarillo	0.68 (3)
		verde	0.45 (2)
cocobacilos	+	amarillo	18.24 (81)
		verde	7.66 (34)
	–	amarillo	0.23 (1)
		verde	1.13 (5)
cocos	+	amarillo	4.73 (21)
		verde	2.70 (12)
	–	amarillo	0.45 (2)
		verde	0.93 (13)
diplococos	+	amarillo	0.68 (3)
		verde	0.90 (4)
	–	amarillo	1.35 (6)
		verde	0.68 (3)

Tabla VIII.- Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de diferentes marcas comerciales, en base a su reacción al Gram. En paréntesis número de aislamientos.

MORFOLOGÍA	REACCIÓN AL GRAM	%
bacilos	+	57.2 (254)
	–	1.13 (5)
cocobacilos	+	25.9 (115)
	–	1.36 (6)
cocos	+	7.43 (33)
	–	3.38 (15)
diplococos	+	1.58 (7)
	–	2.03 (9)

III.1.3.- Caracterización de cepas.

Debido a que las cepas recuperadas en su gran mayoría fueron Gram positivo, no se consideró importante invertir tiempo y dinero para su identificación ya que, salvo una especie de este tipo, ninguna es considerada patógena para el cultivo de crustáceos actualmente (Austin y Austin, 1987), por lo que solo se intentó ubicarlas dentro de algún grupo taxonómico. El total de cepas recuperadas en TCBS de quistes comerciales de *Artemia* (444) presentaron reacción negativa a la oxidasa y positiva a la catalasa. De las 52 cepas seleccionadas (15 cocos y 37 bacilos/cocobacilos) para pruebas adicionales, se encontró que ningún coco fermentó la glucosa en el medio O-F, 8 cepas presentaron crecimiento a un nivel de cloruro de sodio del 15%. Todas las cepas presentaron pigmentación naranja-amarillenta en el medio ZoBell excepto las tres cepas aisladas de quistes de ARGENTEMIA GRADO II (loteB2530K) que presentaron una coloración blanquesina. Ninguna cepa presentó movilidad (Tabla IX).

En la Tabla X se pueden observar las características de los bacilos/cocobacilos analizados. Al igual que los cocos, no fermentaron la glucosa, excepto tres cepas de bacilos Gram negativo aislados de SALT CREEK (2) (SAC208) e INVE (INVE 123 y 127) (no presentadas en la tabla).

Las cepas presentaron pigmentación naranja-amarillenta en el medio ZoBell, excepto las recuperadas de los quistes de SAN FRANCISCO BAY BRAND (2) (lote

1739). En esta marca se observó al único bacilo Gram positivo esporulado del total de cepas aisladas (cepa SFBB2-237).

Tabla IX.- Caracterización de bacterias cocoides no fermentadoras, movilidad y oxidasa negativas, crecidas durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana* y aisladas del medio TCBS.

CEPA	MARCA	GRAM	MORFOLOGÍA	CRECIM. A 15%NaCl	COLOR EN TCBS	PIGMENTA-CIÓN (ZoBell)
UP1-1	Utah pacific1	positivo	diplococo	–	verde	+
A90-37	Aurum 90	negativo	coco	(+)	verde	+
A90-38	Aurum 90	positivo	coco	–	verde	+
A90-39	Aurum 90	negativo	diplococo	+	amarillo	+
A90-50	Aurum 90	negativo	diplococo	(+)	amarillo	+
A90-51	Aurum 90	positivo	diplococo	(+)	amarillo	+
BIO1-64	Biomarine1	positivo	diplococo	–	amarillo	+
BIO1-70	Biomarine1	positivo	diplococo	–	amarillo	+
BIO2-279	Biomarine2	positivo	coco	+	verdoso	+
SFBB1-187	San Fco Bay Brand1	positivo	coco	–	amarillo	+
SFBB1-190	San Fco Bay Brand1	positivo	coco	–	amarillo	+
SFBB1-196	San Fco Bay Brand1	positivo	coco grande	–	verde	+
ARGGII-241	Argentemial I	positivo	coco	+	amarillo	–
ARGGII-243	Argentemial I	positivo	coco	(+)	amarillo	–
ARGGII-246	Argentemial I	positivo	coco	+	amarillo	–

–: respuesta negativa
+: respuesta positiva
(+): respuesta débilmente positiva

Tabla X.-Caracterización de bacterias bacilares no fermentadoras, movilidad y oxidasa negativas, crecidas durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana* y aisladas del medio TCBS.

CEPA	MARCA	GRAM	MORFOLOGÍA	COLOR EN TCBS	PIGMEN-TACIÓN
UP1-15	Utah Pacific1	positivo	bacilos	amarillento	naranja
UP1-19	Utah Pacific1	negativo	cocobacilos	verde	naranja
UP1-25	Utah Pacific1	negativo	cocobacilos	verde	naranja
A90-33	Aurum 90	positivo	bacilos	amarillo	naranja
A90-56	Aurum 90	negativo	bacilos	amarillo	crema
A90-60	Aurum 90	positivo	cocobacilos	verde	amarillento
SAC1-92	Salt Creek1	positivo	bacilos	amarillo	crema
SAC1-96	Salt Creek1	positivo	bacilos	amarillo	crema
SAC1-98	Salt Creek1	negativo	bacilos	amarillo	crema
SAC1-112	Salt Creek1	positivo	bacilos	amarillo	crema
SAC2-213	Salt Creek2	positivo	bacilos	amarillento	crema
SAC2-220	Salt Creek2	positivo	bacilos	amarillo	crema
SAC3-221	Salt Creek3	positivo	bacilos	amarillo	crema
SAC3-226	Salt Creek3	positivo	bacilos	amarillo	crema
INVE-121	INVE	positivo	bacilos	verde	crema
INVE-131	INVE	positivo	cocobacilos	verde	crema
INVE-139	INVE	positivo	bacilos	amarillo	crema
INVE-143	INVE	positivo	cocobacilos	verde	crema
SFBB1-182	San Fco Bay Brand1	positivo	cocobacilos	amarillento	naranja
SFBB1-185	San Fco Bay Brand1	positivo	cocobacilos	amarillento	naranja
SFBB1-199	San Fco Bay Brand1	positivo	bacilos	verdoso	amarillento
SFBB1-201	San Fco Bay Brand1	positivo	bacilos	verdoso	amarillento
SFBB2-231	San Fco Bay Brand2	positivo	bacilos	amarillo	blanquesino
SFBB2-233	San Fco Bay Brand2	positivo	bacilos	amarillo	blanquesino
SFBB2-234	San Fco Bay Brand2	positivo	bacilos	amarillo	blanquesino
SFBB2-237	San Fco Bay Brand2	positivo	bacilos esporulados	verde	blanquesino
ARGGII-242	ArgentemiaII	positivo	bacilos	verdoso	naranja
ARGGII-248	ArgentemiaII	positivo	bacilos	verdoso	naranja
ARGGII-250	ArgentemiaII	positivo	bacilos	verdoso	naranja
BIO2-271	Biomarine2	positivo	bacilos	amarillento	amarillento
BIO2-272	Biomarine2	positivo	bacilos	verdoso	amarillento
BIO2-274	Biomarine2	positivo	cocobacilos	amarillento	amarillento
BIO2-276	Biomarine2	positivo	bacilos	amarillo	amarillento
BIO2-278	Biomarine2	positivo	cocobacilos	amarillo	naranja

III.1.4.- Bacilos Gram negativo, oxidasa negativa, fermentadores de glucosa aislados de TCBS de la eclosión de quistes comerciales:

Tres cepas bacterianas aisladas de quistes de Salt Creek (2) (SAC2-218) e INVE (INVE 123 y 127) debido a su metabolismo fermentativo, semejante a las bacterias del género *Vibrio,* fueron sometidas a una serie de pruebas para caracterizarlas mejor. Las tres cepas fueron oxidasa negativa, móviles, produjeron gas a partir de glucosa en el medio O-F, crecieron a 42 ^{0}C y a 0% de NaCl. La cepa SAC2-208 presentó colonias amarillas con centro negro en TCBS, mientras que las aisladas de INVE fueron verdes. El total de pruebas aplicadas a las cepas se puede observar en la Tabla XI. En un intento por identificar dichas cepas, se analizaron con el sistema API20 NE (recomendado para la identificación de bacterias oxidasa positiva, no entéricas); sin embargo, esas pruebas no las ubicaron dentro de ningún grupo taxonómico, pero con lo anterior, se descartó la posibilidad de que pertenezcan al género *Vibrio*. Las respuestas de las cepas a las pruebas de dicho sistema se pueden analizar en la Tabla XII.

Tabla XI.- Caracterización con pruebas de laboratorio de bacilos Gram nagativo, oxidasa negativa, fermentadores de glucosa y productores de gas en O-F, crecidos durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana* y aislados del medio TCBS.

PRUEBAS	CEPAS ESTUDIADAS		
	SAC2-218[a]	INVE-123	INVE-127
Gram	–	–	–
Morfología	bacilos cortos	bacilos cortos	bacilos cortos
Oxidasa	–	–	–
Catalasa	+	+	+
Desoxicolato de sodio	–	–	–
Crecimiento a 42 ^{0} C	+	+	+
Crecimiento a salinidades de:			
0 %	+	+	+
1.0 %	+	+	+
3.0 %	+	+	+
6.0 %	–	–	–
8.0 %	–	–	–
10.0 %	–	–	–
Lisina decarboxilasa	–	+	+
Ornitina decarboxilasa	–	+	+
Movilidad	+	+	+
Luminiscencia	–	–	–
desplazamiento	–	–	–
Pigmentación	–	–	–
Color en TCBS	amarillo, centro negro	verde	verde

a: quistes de SALTCREEK
–: respuesta negativa
+: respuesta positiva

Tabla XII.- Caracterización con API 20 NE de bacilos Gram negativo, oxidasa negativa, fermentadores de glucosa y productores de gas en O-F, crecidos durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana* y aislados del medio TCBS.

PRUEBAS	CEPAS ESTUDIADAS		
	SAC2-218[a]	INVE-123	INVE-127
Reducción de nitratos (NO_2)	+	+	+
Indol (TRP)	–	–	–
Fermentac. de glucosa (GLU)	+	+	+
Arginina dehidrolasa (ADH)	–	+	+
Ureasa (URE)	–	–	–
Hidrólisis de esculina (ESC)	–	–	–
Gelatinasa (GEL)	–	–	–
Beta-galactosidasa (PNG)	+	+	+
Crec. con glucosa (GLU)	+	(+)	+
Crec. con arabinosa (ARA)	+	+	+
Crec. con manosa (MNE)	+	+	+
Crec. con manitol (MAN)	+	+	+
Crec. con N-acetil-D-glucosamina (NAG)	+	+	+
Crec. con maltosa (MAL)	+	+	+
Crec. con ácido D-glucónico (GNT)	+	+	+
Crec. con ácido cáprico (CAP)	(+)	–	–
Crec. con ácido adípico (ADI)	–	–	–
Crec. con ácido L-málico (MLT)	+	+	+
Crec. con ácido cítrico (CIT)	+	+	+
Crec. con ácido fenilacético (PAC)	–	+	+

a: quistes de SALTCREEK.
+: respuesta positiva
–: respuesta negativa
(+): respuesta débilmente positiva

III.2.- Quistes de poblaciones naturales.

III.2.1.- Eclosiones y bacteriología:

Los porcentajes de eclosión así como las cargas bacterianas de los quistes se pueden ver en la Tabla XIII. La mejor eclosión la presentó la población de quistes de Sosa Texcoco con un promedio de 72.80% en 48 horas de incubación. Los quistes de la población de Yavaros no eclosionaron bajo las condiciones del experimento.

Tabla XIII.- Calidad de eclosión y niveles de bacterias en quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México. En paréntesis el error estándar.

Región	Fecha de cosecha.	Quistes /gr.	Nauplios /gr.	% Eclosión [a]	BHV[b] (UFC/ml)	BCTCBS[c] (UFC/ml)
Salinas de Hgo., San Luis Potosí	agosto de 1985	273559 (6153)	35479 (4512)	13.13(1.8)	$4.2X10^8$	$1.2X10^7$
Sosa Texcoco, Edo. de México	noviembre de 1990	379428 (13864)	284762 (17162)	72.8(2.8)	$1.8X10^8$	$3.0X10^7$
Yavaros, Sonora	octubre de 1992	365333 (9406)	0	0	$4.1X10^7$	$3.8X10^6$
Salinas el Marqués Oaxaca	mayo de 1993	324833 (12859)	34417 (2703)	10.66(1.0)	$2.0X10^8$	$1.2X10^7$

a: eclosión a las 48 horas.
b: bacterias heterótrofas viables (unidades formadoras de colonia/ml).
c: bacterias crecidas en TCBS (unidades formadoras de colonia/ml).

Respecto a la bacteriología de los quistes, se encontró que tanto los niveles de BHV como de BCTCBS presentaron patrones semejantes a los quistes comerciales con promedios de 10^7-10^8 UFC/ml y 10^6-10^7 UFC/ml, respectivamente.

III.2.2.- Caracterización de morfología bacteriana:

Se realizaron 24 aislamientos por muestra para un total de 96 cepas bacterianas durante el proceso de eclosión de los quistes.

Al igual que en los quistes de marcas comerciales, la variedad morfológica bacteriana más abundante fueron los bacilos Gram positivo que se encontraron en las cuatro muestras (Tabla XIV). Únicamente en los quistes de la salina de Hidalgo, S.L.P. predominaron los cocobacilos Gram positivo. Cocos Gram positivo sólo se aislaron de los quistes de Yavaros (con nula eclosión) con colonias amarillas y verdes indistintamente en TCBS.

Tabla XIV.- Porcentaje de morfología de bacterias crecidas en TCBS, provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México. En paréntesis número de aislamientos. 96 aislamientos en total (24 por muestra).

Morfología	Reacción al Gram	Color en TCBS	Salinas el Marqués	Salinas Hidalgo	Sosa Texcoco	Salinas Yavaros
bacilo	+	amarillo	79.2 (19)	33.3 (8)	87.5 (21)	75.0 (18)
		verde	4.2 (1)	12.5 (3)	4.2 (1)	4.2 (1)
	–	amarillo	0	0	4.2 (1)	0
cocobacilo	+	amarillo	16.6 (4)	8.3 (2)	0	0
		verde	0	45.8 (11)	0	0
	–	amarillo	0	0	4.2 (1)	0
coco	+	amarillo	0	0	0	4.2 (1)
		verde	0	0	0	16.6 (4)

Los porcentajes totales de morfología bacteriana se pueden ver en las Tablas XV y XVI. El patrón que se encontró en los quistes comerciales se mantuvo, ya que los bacilos Gram positivo aislados de colonias amarillas del TCBS superaron en presencia al resto de las formas con un 68.70% (66 aislamientos). De acuerdo con la reacción al Gram, los bacilos Gram positivos comprendieron el 75.00% (72 aislamientos) del total de morfologías encontradas. Bacilos Gram negativo sólo se encontraron en una cepa la cual, al igual que el resto, fue oxidasa negativa y catalasa positiva. Las cepas Gram positivo sumaron el 97.9% y todas presentaron pigmentación en el medio agar ZoBell (datos no presentados en tablas).

III.3.- Bacteriología en granja camaronícola.

III.3.1.- Comparación de sistemas de eclosión de quistes:

En la Tabla XVII se pueden observar los resultados del análisis bacteriológico de comparación de sistemas. Los quistes empleados para la prueba fueron de SALT CREEK (lote 00016002). Los quistes se eclosionaron paralelamente en laboratorio (condiciones de esterilidad) y en la granja. Los resultados fueron totalmente diferentes. El total de cepas (10) aisladas de la granja en TCBS fueron bacilos Gram negativo, oxidasa positiva, mientras que en laboratorio se mantuvo el patrón de presencia de bacilos Gram positivo, oxidasa negativa.

III.3.2.- Bacteriología de tanques de cultivo larvario y nauplios de *Artemia*:

Los datos correspondientes se observan en la Tabla XVIII. Los niveles más bajos de bacterias se encontraron en las etapas iniciales del cultivo (estadio zoea) con 10^1-10^2

Tabla XV.- Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México, en base al color de la colonia en el medio TCBS y su reacción al Gram. En paréntesis número de aislamientos.

MORFOLOGÍA	REACCIÓN AL GRAM	COLOR EN TCBS	%
bacilos	+	amarillo	68.75 (66)
		verde	6.25 (6)
	–	amarillo	1.04 (1)
		verde	0
cocobacilos	+	amarillo	6.25 (6)
		verde	11.46 (11)
	–	amarillo	1.04 (1)
		verde	0
cocos	+	amarillo	1.04 (1)
		verde	4.17 (4)
	–	amarillo	0
		verde	0

Tabla XVI.- Resumen del porcentaje de morfología de bacterias provenientes de la eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de poblaciones naturales de México, en base a su reacción al Gram. En paréntesis número de aislamientos.

MORFOLOGÍA	REACCIÓN AL GRAM	%
bacilos	+	75.00 (72)
	–	1.04 (1)
cocobacilos	+	17.70 (17)
	–	1.04 (1)
cocos	+	5.20 (5)

Tabla XVII.- Características bacteriológicas de quistes de *Artemia* (Salt Creek, lote 00016002) eclosionados en laboratorio (esterilidad 1 y 2) y en forma masiva en granja camaronícola (granja 1 y 2). En paréntesis, aislamientos analizados.

	CONDICIONES DE ECLOSIÓN			
Características	Laboratorio 1	Granja 1	Laboratorio 2	Granja 2
densidad[a]	1249	1633	1253	236.6
BCTCBS[b] (UFC/ml)	$5.3X10^6$	$1.4X10^7$	$8.7X10^7$	$2.0X10^7$
% Gram positivo	90 (9)	0	100 (10)	0
% Gram negativo	10 (1)	100 (10)	0	100 (10)
% bacilos	100	100	100	100
% bacterias oxidasa positiva	0	100	0	100

a: nauplios/ml
b: bacterias crecidas en TCBS (unidades formadoras de colonias/ml)

Tabla XVIII.- Cargas bacterianas en muestras de agua de cultivo larvario de *Penaeus vannamei* y de nauplios de *Artemia* en granja camaronícola, en Puerto Peñasco, Sonora.

MUESTRA	CARACTERÍSTICAS	BCTCBS[a] (UFC/ml)
Tanque # 23	Estadio zoea II	$1.6X10^2$
Tanque # 24	Estadio zoea II	$6.0X10^1$
Tanque # 11	Estadio mysis	$1.5X10^5$
Tanque # 6	Estadio mysis II	$1.4X10^4$
Tanque # 7	Estadio mysis II	$1.0X10^3$
Tanque # 12	Estadio postlarva	$3.6X10^4$
Tanque # 13	Estadio postlarva 4	$3.0X10^3$
Tanque # 14	Estadio postlarva 4	$2.4X10^4$
Nauplios de *Artemia*	Cosecha normal	$2.0X10^7$
Nauplios de *Artemia*	Cosecha normal	$1.4X10^7$
Nauplios de *Artemia*	Antes de bajar salinidad	$4.5X10^5$
Nauplios de *Artemia*	Después de bajar salinidad	$5.6X10^3$
Nauplios de *Artemia*	Con tratamiento térmico (60 °C/5min.)	$1.6X10^5$
Agua para eclosión (sin quistes)	Salinidad 22‰	< 10 (0.1ml de siembra)

a: bacterias crecidas en TCBC (unidades formadoras de colonias/ml)

UFC/ml. Dichos niveles se incrementaron en las etapas más avanzadas con promedios de 10^3-10^4 UFC/ml en la edad de postlarva.

Los nauplios de *Artemia* presentaron concentraciones elevadas de BCTCBS, con valores de hasta 10^7 UFC/ml.

III.3.3.- Caracterización de cepas bacterianas de granja camaronícola:

Se aislaron un total de 74 cepas en la granja, todas oxidasa positiva (Tabla III); sin embargo, algunas no se pudieron cultivar posteriormente para la aplicación del total de pruebas establecidas. En cuatro meses de conservación de las cepas en el medio T_1N_1 y a temperatura ambiente (20-25 ^{0}C), aproximadamente el 50% ya no fue cultivable en ZoBell. Esta es una característica común en muchas bacterias, tanto marinas y terrestres, que como estrategia de sobrevivencia, pasan a un estado viable pero no cultivable (Roszak y Colwell, 1987).

34 cepas bacterianas recuperadas de la granja, 13 bacterias *Vibrio* de colección de la ATCC (American Type Culture Collection) (Tabla IV) y las tres cepas fermentadoras de glucosa fueron analizadas por el sistema API20 NE. Los resultados del análisis se pueden ver en las Tablas XIX, XX y XII, respectivamente. Así mismo, a estas cepas también se les aplicó un grupo de pruebas de laboratorio independientes al API. Las respuestas de las diferentes cepas a dichas pruebas se pueden consultar en las Tablas C1 y C2 (Anexo C) y XI, respectivamente.

Tabla XIX.-Cepas aisladas en TCBS de granja, en Puerto Peñasco, Son., con respuestas similares a las pruebas contenidas en el sistema de identificación API 20 NE. Todas las cepas son bacilos Gram negativo, oxidasa positiva. Grupo **A**: AA-6, AD-9, ZII-7, ZII-9, PL4-4, PL4-6; **B**: AA-1, AA-5, AD-5, AD-7, AD-8, AD-10, A2-8, ATT-1, ATT-3, M-5, MII-1, PL4-2, PL4-5, PL4-7, PL4-8; **C**: A2-9, AD-3; **D**: ATT-4; **E**: A1-1, A1-2, AD-2; **F**: AA-10; **G**: A1-3, AD-4; **H**: A1-4; **I**:ZII-6, MII-4; **J**: ZII-10. (A:nauplios de *Artemia*; Z: Tanque con larvas en estadio zoea; M: Tanque con larvas en estadio mysis; PL: Tanque con postlarvas).

Grupo	NO_2	TRP	GLU[a]	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU[b]	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
A	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–
B	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	–	+	–	–
C	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–
D	+	+	–	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	–	+	–	–
E	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–
F	+	+	+	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
G	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–
H	+	+	+	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–
I	+	+	+	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–
J	+	–	+	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Grupo	NO_2	TRP	GLU[a]	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU[b]	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC

NO_2 reducción de nitratos; TRP: producción de indol; GLU[a]: fermentación de glucosa; ADH: arginina dehidrolasa; URE:acción de la ureasa; ESC: esculina;GEL: hidrólisis de gelatina; PNG: beta-galactosidasa; GLU[b]: crec. en glucosa; ARA: crec. en arabinosa; MNE: crec. en manosa; MAN: crec. en manitol; NAG: crec. en N-acetil-D-glucosamina; MAL: crec. en maltosa; GNT: crec. en D-gluconato; CAP: crec. en ác. cáprico; ADI: crec. en ác. adípico; MLT: crec. en ác. málico; CIT: crec. en ac. cítrico; FAC: crec. en ác. fenil acético.

Identificadas como:

Grupo A: *Vibrio alginolyticus*, % de identificación (%id)= 99.4

Grupo B: *V. alginolyticus*, % id= 97.3

Grupo C: *V. alginolyticus*, % id= 93.0

Grupo D: baja discriminación: *V. alginolyticus*, %id= 80.9; *Aeromonas salmonicida*, %id= 19.0.

Grupo E: baja discriminación *A.. hidrofila/caviae*, %id= 78; *V. parahaemolyticus*, %id= 21.3; posible *V. fluvialis*.

Grupo F: *V. vulnificus*, %id= 99.8.

Grupo G: *V. parahaemolyticus*, %id= 99.9.

Grupo H: *V. parahaemolyticus*, %id= 90.8.

Grupo I y J : no identificados.

Tabla XX.- Respuestas de cepas de colección *Vibrio* de la ATCC (American Type Culture Collection) a las pruebas del sistema de identificación API 20 NE.

CEPA	NO_2	TRP	GLU[a]	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU[b]	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
V. alginolitycus	+	+	+	–	–	+	+	–	(+)	–	–	(+)	–	+	–	–	–	(+)	–	–
V. campbelli	+	+	+	–	–	+	(+)	–	(+)	–	(+)	+	(+)	+	–	–	–	–	–	–
V. choler. no O1	+	+	–	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+	–
V. damsela	+	–	+	+	+	+	–	+	(+)	–	(+)	–	(+)	(+)	–	–	–	+	–	–
V. fisheri	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
V. fluvialis	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	–
V. harveyi	+	+	+	–	–	+	+	+	(+)	–	(+)	+	–	(+)	(+)	–	–	+	+	–
V. metschnik.	–	+	–	–	–	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–
V. mimicus	+	+	–	–	–	–	+	+	+	–	+	+	(+)	+	+	–	–	+	+	–
V. parahaemol.	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	(+)	+	(+)	+
V. pelagius	+	–	+	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	(+)	–	–	(+)	–	–
V. proteolyt.	+	+	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	(+)	+	+	+	–	+	(+)	–
V. vulnificus	+	+	+	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–
CEPA	NO_2	TRP	GLU[a]	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU[b]	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC

NO_2 : reducción de nitratos; TRP: prueba del indol; [a]GLU: fermentación de glucosa;URE: ureasa; ESC: hidrólisis de esculina; GEL: gelatinasa; PNG: Beta-galactosidasa; [b]GLU: crec. en glucosa; ARA: crec. en arabinosa; MNE: crec. en manosa; MAN: crec. en manitol; NAG: crec. en N-Acetil-D-glucosamina; MAL: crec. en maltosa; GNT: crec. en D-gluconato; CAP: crec. en ac. cáprico; ADI: cerc. en ác. adípico; MLT crec. en ác. málico; CIT: crec. en ác. cítrico; FAC: crec. en ác. fenilacético.

+: respuesta positiva

–: respuesta negativa

(+): respuesta débilmente positiva

El sistema API20 NE ubicó a las cepas de la granja en 10 grupos diferentes. De éstos, 3 grupos fueron los más abundantes y quedaron representados por cepas identificadas como *Vibrio alginolyticus* (API20 NE, 1992) con un porcentaje de identificación correcta superior al 90%. Estos grupos comprendieron el 67.7% (23 aislamientos) de las cepas; el 11.8% (4 cepas) de los aislados se identificaron con muy baja discriminación. El 8.8 % (3 aislamientos) de las cepas fueron identificadas como *V. parahaemolyticus* (con un porcentaje de identificación correcta superior al 90%). Una cepa (2.9%) fue identificada como *V. vulnificus* y tres cepas (8.8%) no fueron identificadas.

IV. DISCUSIÓN

IV.1.- Bacteriología de quistes.

En este estudio se utilizó, por razones de accesibilidad y precio, el medio TCBS (Kobayashi *et al.*, 1963) de la marca DIFCO, y los resultados obtenidos comprueban, que ha pesar de que este medio inhibe fuertemente a la mayoría de las bacterias entéricas, *Pseudomonas* y otras Gram negativo (DIFCO, 1984), su selectividad está muy relacionada con el laboratorio que lo produzca, ya que pueden crecer bacterias distintas a las del género *Vibrio.* La marca DIFCO es la que mayores problemas de selectividad presenta (McCormack *et al.*, 1974; Nicholls *et al.*, 1976; West *et al.*, 1982). En esta investigación, se recuperaron cepas bacterianas con características distintas a las que, según DIFCO (1984) pueden crecer en este medio (Tabla XXI). La mayor población que creció en el medio TCBS quedó representada por bacterias Gram positivo, tanto en los quistes comerciales (92%) como en los quistes de poblaciones naturales de México (97.9%), las cuales desarrollaron colonias amarillas ó verdes en el medio, algunas con características cercanas a las producidas por bacterias del género *Vibrio* (DIFCO, 1984 op. cit.).

Diferentes géneros bacterianos son relacionados con quistes de *Artemia franciscana,* sin embargo, cabe mencionar que en ningún trabajo se utilizó el TCBS como medio de aislamiento primario como en este caso.

La mayor lista de bacterias la presentan Austin y Allen (1982), quienes informan de la presencia de géneros como *Bacillus, Erwinia, Micrococcus, Staphylococcus y Vibrio,*

Tabla XXI.- Respuesta de crecimiento bacteriano en placas con agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa) después de 18-24 horas de incubación a 35^0 C (DIFCO, 1984).

ORGANISMO	CRECIMIENTO	COLONIA
Escherichia coli ATCC 25922	nulo o pobre	Translúcidas
Proteus mirabilis ATCC 25933	nulo o pobre	amarillas pequeñas
Streptococcus faecalis ATCC 19433	nulo o pobre	amarillas pequeñas
Vibrio cholerae	bueno	amarillas
V. fluvialis	bueno	amarillas
V. parahaemolyticus	bueno	azul
V. vulnificus	regular a bueno	amarillas o translúcidas

tanto en la superficie como en el interior del quiste; en menor proporción en este último. Estos autores mencionan la ocurrencia de bacilos Gram negativo, oxidasa positiva, con capacidad de crecer en TCBS que no ubican en ningún grupo taxonómico. Las características bioquímicas de esas cepas se aproximan mucho a las encontradas en este estudio, sólo que aquí las cepas fueron oxidasa negativa. Igarashi *et al.* (1989), mencionan la presencia de bacilos Gram

positivo que clasifican dentro del grupo Coryneforme, donde probablemente se puedan agrupar las cepas encontradas en este trabajo. Solamente se encontró un bacilo Gram positivo que presentó esporulación (cepa SFBB2-237) (observada por tinción Gram), identificado como *Bacillus* sp., que por su reacción positiva a la catalasa y por ser anaerobio facultativo se puede diferenciar del género *Clostridium* (MacFaddin, 1993). Gilmour *et al.* (1975), Austin y Allen (1982) y GómezGil (1993), también encontraron a este género como parte de la flora bacteriana de quistes de *Artemia*.

Las cepas de cocos analizadas que presentaron crecimiento a una salinidad de 15%, se pueden ubicar dentro del género *Staphylococcus*, y las que dieron negativa esta prueba, dentro del género *Micrococcus* (MacFaddin, 1993). Estos géneros también fueron encontrados por otros autores (Austin y Allen, 1982; GómezGil, 1993).

Los bacilos Gram negativo aislados de los quistes, con metabolismo fermentativo de la glucosa, semejantes al género *Vibrio*, a pesar de ser sometidos a un mayor número de pruebas no se pudieron identificar, sin embargo, con ésto se descartó la posibilidad de que fueran vibrios.

Varios autores hacen mención de la presencia de vibrios en quistes de *Artemia franciscana* (Austin y Allen, 1982; Igarashi *et al.*, 1989). En el presente trabajo, de 20 muestras de 11 marcas distintas de quistes comerciales y 4 muestras de quistes de poblaciones naturales de México, en donde se estudiaron en total 540 aislamientos de TCBS, no se detectó la presencia de bacterias del género *Vibrio*. Los resultados obtenidos se asemejan a los presentados por GómezGil (1993), quien analizó una muestra de quistes (Frippak), y no sólo

no encontró bacterias *Vibrio*, sino que tampoco encontró bacterias con capacidad de crecer en TCBS. Lo anterior no es sorprendente, ya que en este estudio, en dos muestras de ARGENTEMIA GRADO I, se registraron resultados similares.

La presencia de bacterias en la superficie de los quistes puede estar influida por la flora bacteriana de su hábitat (Straub y Dixon, 1993). Dichas bacterias podrían encontrarse en el corión de los quistes, que es una capa alveolar externa formada de quitina y hematina (Sorgeloos *et al.*, 1986), que posee zonas ideales para ser colonizadas por bacterias (Gilmour *et al.*, 1975; Wheeler *et al*, 1979). En el interior del quiste las bacterias son escasas ó nulas (Austin y Allen, 1982; GómezGil, 1993).

La presencia de bacterias en quistes después de los procesos de envase, podría estar determinada por las estrategias de las cepas para soportar condiciones adversas de desecación, como la esporulación; sin embargo, en este trabajo sólo se encontró una cepa con tal característica.

El término sobrevivencia se define como el mantenimiento de la viabilidad bajo condiciones adversas. En microorganismos que esporulan es más sencillo entender el concepto, pero también hay microorganismos que existen como células vegetativas y que utilizan sus reservas energéticas lentamente, como resultado de la reducción de su actividad metabólica (Novitsky y Morita, 1978). Jones y Rhodes (1981), propusieron que la adaptación bacteriana a ambientes acuáticos con escasos nutrientes es una característica innata de especies en ese hábitat, de hecho, la capacidad de función a muy baja tasa metabólica incluye también a

bacterias terrestres (Morita, 1975). Roszak y Colwell (1987), detallan más ampliamente estas adaptaciones.

Todo lo anterior podría aplicarse bien para explicar la presencia de bacterias en quistes. Otra explicación es proporcionada por Austin y Allen (1982), quienes mencionan que las bacterias que producen pigmentos tienen una mayor capacidad para soportar condiciones adversas, ésto corresponde bien con las cepas estudiadas aquí, ya que el 98.2% de las cepas de quistes comerciales y el 100% de quistes de poblaciones naturales presentaron pigmentación en agar ZoBell (datos no presentados en tablas). Quizás lo anterior también explica la baja presencia de bacilos Gram negativo, ya que éstos no produjeron pigmentos. Lo anterior puede reforzar la observación de que las cepas pigmentadas presentan buena capacidad adaptativa a condiciones ambientales desfavorables.

En acuicultura, para eliminar bacterias de los quistes y mejorar la eclosión de éstos, se ha propuesto la descapsulación química con hipoclorito de sodio (Sorgeloos *et al.*, 1986; Pector *et al*, 1994; Merchie *et al.*, 1997); sin embargo, GómezGil (1993) afirma que el proceso no elimina el total de bacterias adheridas, ni mejora notablemente la eclosión (Spotte y Anderson, 1989). La descapsulación de quistes en granjas acuícolas puede constituirse en un proceso caro y complicado, el cual , según los resultados obtenidos en este trabajo es innecesario, al menos por lo que respecta a bacterias vibrios, ya que en 540 aislamientos obtenidos de eclosiones de quistes en condiciones de esterilidad no se encontraron estas bacterias. Sin embargo, es necesario conocer con mayor precisión la flora total de los quistes,

ya que pueden existir patógenos diferentes al género *Vibrio*, que no son capaces de crecer en el medio TCBS.

IV.1.1.- Niveles bacterianos en la eclosión de los quistes:

Los niveles de bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias crecidas en TCBS (BCTCBS) de quistes comerciales (Fig. 2) y naturales de México, promediaron 10^7-10^8 UFC/ml y 10^6-10^7 UFC/ml, respectivamente. GómezGil (1993), encontró valores semejantes al analizar

el agua de eclosión, no obstante que dicho autor no hizo homogeneizado de la muestra total como se realizó en este trabajo. Lo anterior sugiere, que lavar los nauplios elimina la mayor parte de la población bacteriana generada durante la eclosión. Austin y Allen (1982), recomiendan un simple lavado con agua de mar estéril para eliminar toda la carga bacteriana de nauplios después de la eclosión, sin embargo, en trabajos posteriores se demostró que una población importante de bacterias queda adherida fijamente al nauplio. Igarashi *et al.* (1989) y GómezGil (1993), emplearon ultrasonido para despegar bacterias de nauplios y los conteos se elevaron hasta en diez veces. Lo anterior demuestra que lavar los nauplios sólo sirve para diluir el medio circundante. Los niveles que se encontraron en este trabajo son ligeramente superiores a los registrados por GómezGil (op. cit.) ya que se incluye la población bacteriana total, tanto libre como adherida a los nauplios.

En los promedios de BHV de quistes comerciales no se encontró relación con el porcentaje de eclosión (R^2=0.06954, α=0.05), ni con la edad de la muestra (R^2= 0.19395,

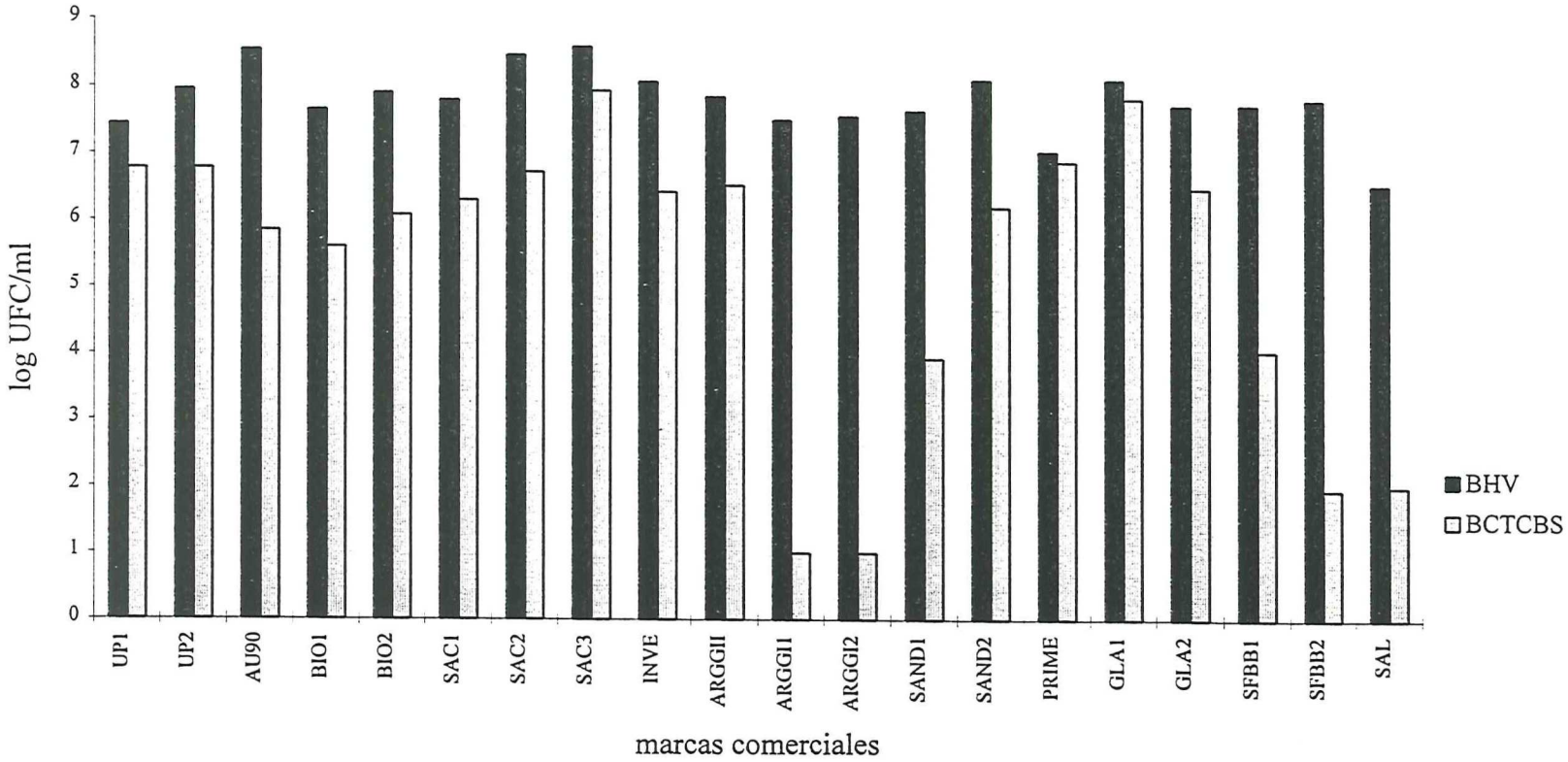

Fig. 2.- Niveles de bacterias heterótrofas viables (BHV) y bacterias crecidas en TCBS (BCTCBS) durante la eclosión de quistes comerciales de *Artemia franciscana*.

α=0.05) con respecto a la fecha de compra y análisis. Lo anterior sugiere que las poblaciones bacterianas crecidas son semejantes en cantidad en todas las marcas, y la mayoría proviene de la superficie del quiste, ya que algunas muestras a pesar de nula o reducida eclosión presentaron niveles equiparables. Lo anterior concuerda con Wheeler *et al.* (1979), quienes encontraron niveles bacterianos elevados aún en quistes sin eclosionar.

Durante el proceso de eclosión de los quistes y debido al metabolismo de rompimiento de éstos se libera una gran cantidad de glicerol al medio (Sorgeloos *et al.*, 1986), con lo que se tendría una fuente importante de carbono potencialmente utilizable por las bacterias. Fendrich y Schink (1988), observaron en el Gran Lago Salado, disminuciones en los niveles de glicerol y lo relacionaron al consumo bacteriano. GómezGil (1993), notó un incremento importante en la carga bacteriana aproximadamente a las 12 horas de incubar los quistes, lo que coincide con el momento de rompimiento de éstos y la liberación del glicerol al medio. En el presente estudio no se apreció tal efecto ya que quistes con diferentes tasas de eclosión presentaron cargas similares. Esto podría indicar que las bacterias contenidas en la superficie de los quistes no metabolizan dicho sustrato adecuadamente ó la edad de la muestra provocó una selección bacteriana distinta a las que utilizan eficientemente tal sustrato, lo que se descarta por la baja relación entre esos parámetros. La edad del producto al parecer no influyó en los niveles bacterianos, a excepción de la muestra SALT LAKE donde los valores promediaron 10^6 UFC/ml. Las muestras de quistes de poblaciones naturales de México, presentaron un patrón semejante a las anteriores, sin importar la edad de la muestra, procedencia, eclosión ó manejo, el cual no fue precisado.

Es muy probable que los niveles de bacterias obtenidos en el trabajo correspondan a los máximos soportados por la superficie de los quistes ó bien, sostenibles por el sistema de eclosión. Lo anterior es en alusión a lo encontrado por GómezGil (1993), quién después de 20 horas de eclosión de los quistes, notó que el nivel bacteriano se mantuvo constante hasta las 24 horas alcanzando un máximo de 10^6 UFC/ml en TCBS. Aquí, a diferencia de las BHV, las BCTCBS presentaron una ligera relación significativa con la edad de la muestra (R^2=0.57955, α=0.05) y una pobre relación con el porcentaje de eclosión (R^2=0.24126, α=0.05).

Los niveles inferiores de BCTCBS se encontraron, en general, en las muestras de mayor edad, lo que puede indicar que dichas bacterias tienen menor capacidad de sobrevivencia a condiciones adversas que el resto de las heterótrofas.

El porcentaje de eclosión y la edad de quistes recientes (máximo dos años) no se relacionaron significativamente (R^2=0.1092, α=0.05) (Fig. b1, Anexo B) por lo que se puede sugerir que las bajas tasas de eclosión podrían deberse a otros factores, como son: condiciones de cosecha, manejo y almacenamiento de los quistes ó incluso al método de eclosión utilizado. Es importante hacer notar que la edad real de las muestras fue difícil de evaluar, por lo que estos resultados no son concluyentes, sin embargo nos pueden dar una aproximación a la realidad.

Medidas extremas deben realizarse para evaluar satisfactoriamente la relación entre la edad de las muestras y porcentajes de eclosión de las mismas. En experiencia propia, se ha

visto que el porcentaje de eclosión de quistes, bajo condiciones inapropiadas de almacenamiento, se puede reducir de manera importante en términos de un año.

IV.2.- Granja camaronícola.

De forma consistente se genera información donde se confirma que los nauplios de *Artemia* utilizados en los sistemas de producción larvaria de peces y crustáceos, son vectores de bacterias patógenas para los cultivos (Montoya-Rodríguez, 1992; Verdonck *et al.*, 1994; Lizárraga-Partida *et al.*, 1997), pero de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la posibilidad de que los quistes contengan dichas bacterias, bajo las condiciones de estricta esterilidad en la que se realizaron los experimentos, es muy reducida.

IV.2.1.- Comparación de sistemas de eclosión de quistes de *Artemia*:

Trabajar con sistemas distintos de eclosión arrojó resultados totalmente diferentes (Tabla XVII). De las eclosiones en laboratorio se recuperaron en TCBS bacterias Gram positivo en su mayoría, mientras que de la granja, exclusivamente bacilos Gram negativo.

Aquí es importante analizar las posibles causas de tales contrastes. Hay cinco posibles fuentes de bacterias Gram negativo en los cultivos: **a)** quistes: por los resultados obtenidos en el estudio esta posibilidad se descarta; **b)** agua para la eclosión: el agua utilizada normalmente

es filtrada y pasada por luz UV, por lo que la posibilidad de contaminación por esta vía es reducida. En este trabajo se evaluó la carga bacteriana del agua para eclosión en un tanque y no se encontró crecimiento en TCBS al sembrar una alícuota de 0.1 ml de la muestra sin diluir. Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas (1992), encontraron respuestas semejantes al analizar el sistema de abastecimiento de agua en esta granja. Por lo tanto esta posibilidad también puede descartarse; **c)** personal y/o equipo de trabajo: esta es una fuente potencialmente importante, ya que alteraciones en las rutinas de trabajo puede convertirlos en mecanismos de entrada de bacterias al sistema. Ésto tal vez ha recibido poca atención por ser un factor fortuito y controlable; **d)** tanques para eclosión: posiblemente los más importantes. En muchos trabajos se ha demostrado que las bacterias del género *Vibrio*, entre otras, poseen la capacidad de formar películas de crecimiento sobre superficies expuestas al agua de mar (Duan *et al.*, 1995). Dichas películas están formadas por heteropolisacáridos de glucosa y galactosa principalmente (Rodríguez y Bhosle, 1991), y son capaces de formar barreras protectoras que podrían dificultar la eliminación total de las bacterias adheridas, aún con el lavado y la cloración de los tanques. Chen y Hanna (1994), encontraron que *Vibrio alginolyticus* tiene una gran capacidad para adherirse sobre tejidos superficiales de *Penaeus monodon*, incluso superior a otros vibrios. La salinidad y pH elevados al parecer favorecen dicha característica en esta bacteria, al menos en peces (Balebona *et al.*, 1995). En este trabajo *V. alginolyticus* fue la especie más importante en los cultivos de *Artemia*. Todo lo anterior, aunado a deficientes procesos de desinfección y limpieza de la estanquería, podrían convertirla en la fuente más importante para la presencia de bacterias Gram negativo en los cultivos de *Artemia*; **e)** aire: esta es otra fuente

potencial de contaminación tomada poco en cuenta, pues se ha visto que muchas bacterias pueden ser conducidas por el aire a través de aerosoles (Marti *et al.*, 1990). Éstos pueden ser generados por el burbujeo, que se les aplica a los nauplios de *Artemia* y larvas de camarón para oxigenar los cultivos en las granjas (Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas, 1992). En experimentos realizados por Wooster y Bowser (1996), se demostró que a través de partículas de agua, generadas por aerosoles, *V. salmonicida* se desplazó por el aire hasta un metro desde su origen (limitado por el tamaño de la cámara experimental), favorecido por corrientes de aire. En laboratorios de cultivos larvarios, los sistemas de ventilación son comunes para diseminar el calor acumulado en su interior. Como se puede ver, el aire puede ser un mecanismo importante para la transportación de bacterias, y si se toma en cuenta que la distancia entre tanques es reducida, el problema se acentúa. Lizárraga-Partida (comunicación personal) detectó este problema en cultivo de *Artemia* en esta granja, por lo que sugirió tapar los tanques de eclosión. Sin embargo, lo anterior es improcedente para tanques de cultivo larvario.

En un momento dado, todas las fuentes de contaminación podrían ser importantes para la aparición de microorganismos patógenos; sin embargo, por lo que se refiere a *Artemia*, y muy posiblemente en el cultivo larvario, los tanques podrían ser la principal fuente. En este estudio se observó que la sustitución total de bacterias Gram positivo por cepas Gram negativo en el cultivo de *Artemia*, se produjo en un lapso de aproximadamente 24 horas. Lo anterior puede sugerir que las condiciones imperantes durante la eclosión (desechos orgánicos, entre ellos el glicerol) bien pudieron haber sido utilizados de manera mas eficiente por bacterias

Gram negativo, y de un inóculo pequeño (posiblemente proporcionado por el tanque), pasaron a ser la población dominante. Wen-Yu *et al.* (1994), en cultivo larvario de *P. monodon*, encontraron sucesión bacteriana semejante a la encontrada aquí; bacterias Gram positivo predominaron en los estadios iniciales, pero a partir de zoea III, prevalecieron bacilos Gram negativo. El hecho anterior coincide con el momento de adición de nauplios de *Artemia* al cultivo. Tal situación no es explicada por los autores antes mencionados.

Todo lo anterior debe ser estudiado a profundidad para demostrar claramente lo que sucede durante la eclosión de quistes en las granjas. De acuerdo al presente trabajo se puede afirmar que los nauplios son vectores de bacterias potencialmente patógenas para los cultivos, pero éstas no necesariamente provienen de los quistes, sino de fuentes no precisadas con exactitud hasta hoy.

IV.2.2.- Niveles bacterianos en tanques de cultivo:

La evolución de las cargas bacterianas en el sistema fueron dependientes del tiempo: niveles reducidos al inicio y elevación al final del cultivo; sin embargo, el daño no es notable en las larvas ya que, a mayor edad, son menos sensibles a los patógenos (Hameed, 1995; Prayitmo y Latchford, 1995). Tales niveles bacterianos son comunes en sistemas de cultivo de diferentes especies de peneidos (Hameed, 1993; Wen-Yu *et al.*, 1994). La elevación de los niveles bacterianos en los tanques puede estar influida por la adición de nauplios de *Artemia* al cultivo con altos niveles bacterianos (Tabla XVIII), ya que coincide correctamente en tiempo. Sin embargo, en este estudio se encontraron bacterias vibrios en tanques con larvas en zoea II,

que aún no se alimentan con nauplios de *Artemia*, por lo que dichas bacterias podrían proceder principalmente de los nauplios de camarón al sembrarse ó de los tanques.

La evaluación de niveles bacterianos en sistemas de cultivo es, sin duda, una herramienta sanitaria importante, pero debe ser apoyada con la caracterización taxonómica de las especies presentes en los sistemas, ya que algunas podrían ser patógenas y provocar mortalidades.

Lewis *et al.* (1982) demostraron, en cultivo larvario de *P. stylirostris*, que existe una dependencia importante entre la cantidad y las especies bacterianas en los tanques para producir problemas de mortalidad. Ellos observaron que especies de *Flavobacterium* spp. y *Pseudomonas* spp. provocaron agregados larvarios (acumulación de larvas en el fondo del tanque) a niveles de 10^4 UFC/ml y mortalidades a niveles de 10^5-10^6 UFC/ml, mientras que *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp. no crearon agregados, pero sí mortalidades a niveles de 10^5-10^6 UFC/ml y 10^4-10^5 UFC/ml, respectivamente. Lo anterior nos indica que las agregaciones larvarias, preludio de mortalidad, son aleatorias.

Los niveles de BCTCBS que se evaluaron en la granja, sobre todo en estadios larvarios avanzados, están próximos a los valores expresados arriba, por lo que cualquier situación de presión (estrés) para el cultivo, podría provocar deficiencias en sus defensas internas y desencadenar mortalidad.

IV.2.3.- Identificación bacteriana:

Se han propuesto diversos esquemas de pruebas bioquímicas y de asimilación para identificar bacterias *Vibrio* (Montoya-Rodríguez, 1992; Alsina y Blanch, 1994) que por su complejidad difícilmente serán utilizados en granjas para caracterizaciones. Actualmente, las pruebas de identificación bacteriana rápidas, debido a su relativo fácil manejo, son muy utilizadas en el campo de la acuicultura para caracterizar patógenos tanto de peces como de crustáceos. Las pruebas más utilizadas son API20 E (Grisez *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1993; Bioca *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1995), API20 NE , API Rapid NFT (Hansen y Sørheim, 1991; GómezGil, 1993; Monhey *et al.*, 1994) y BIONOR (Romalde *et al.*, 1995). Las respuestas que arrojan estos métodos de identificación deben ser tomadas con reserva, ya que dichos sistemas fueron elaborados para identificar bacterias patógenas en humanos (Taylor *et al.*, 1995), sin embargo, su utilidad es innegable, y en algunos sólo se requiere hacer ajustes a la metodología para utilizarlos adecuadamente en acuicultura (Lightner, 1996).

En este estudio para la caracterización bacteriana se empleó API20 NE, recomendado para bacterias no entéricas, oxidasa positiva (las bacterias que se analizaron presentan estas características) y además se probó un esquema de 12 pruebas básicas de fácil desarrollo en laboratorio, como pruebas independientes ó complemento al sistema API (Anexo A). Para obtener una mejor resolución de las pruebas se utilizaron a 13 cepas de vibrios de la colección de ATCC como referencia (Tabla IV).

IV.2.3.1.- Sistema API20 NE:

En la Tabla XIX se puede observar el resultado de identificación de cepas. El 70.8% de las cepas se identificaron como *Vibrio alginolyticus* y 3 cepas (AD-4, A1-3 y A1-4) como *V. parahaemolyticus*. Esta última clasificación es dudosa, ya que en el análisis particular de las tres cepas con *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) (Tabla XXII), se encontraron diferencias importantes entre ellas, principalmente el color en TCBS. Las tres cepas analizadas presentan color amarillo, mientras que *V. parahaemolyticus* genera colonias verdes, invariablemente (DIFCO, 1984). Problemas de identificación con estos sistemas al confundir cepas, identificar con baja discriminación ó nula identificación son comentados por Monhey *et al.* (1994) y Ligthner (1996).

Cuando se grafican los resultados de las cepas analizadas y de colección en un dendrograma (Fig. 3), se confirma que cepas con características bioquímicas similares a *V. alginolyticus* son las más comunes, con un total de 24. Así mismo, 8 cepas presentaron mayor similitud con *V. proteolyticus* (pero diferente color en TCBS). Este último vibrio no se incluye en el esquema de identificación del sistema (API20 NE, 1992). La cepa ZII-10, no identificada por API, ahora se relaciona con *V. pelagius* (igual color en TCBS), mientras que la cepa AA-10 siguió caracterizada como *V. vulnificus* (semejantes en TCBS).

Tabla XXII.- Cepas recuperadas en TCBS del cultivo de *Artemia* en granja camaronícola identificadas como *Vibrio parahaemolyticus* según el sistema API 20 NE, y sus respuestas a pruebas independientes a dicho sistema.

PRUEBAS	CEPAS ESTUDIADAS			*V. parahaemolitycus* (ATCC 17802)
	AD-4	A1-4	A1-3	
Gram	–	–	–	–
Morfología	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Oxidasa	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	–	–	+	+
Crec. a 42 ^{0}C	+	+	+	+
Crec. a salinidad:				
0 %	–	–	–	–
1.0 %	+	+	+	+
3.0 %	+	+	+	+
6.0 %	+	+	+	+
8.0 %	+	+	+	+
10.0 %	+	+	+	–
Lisina decarbox.	+	+	+	+
Ornitina decarbox.	–	+	+	+
Movilidad	+	+	+	–
Luminiscencia	–	–	–	–
Desplazamiento	(+)	+	+	–
Pigmentación	–	–	–	–
Color en TCBS	amarillo	amarillo	amarillo	verde

+: respuesta positiva (+): respuesta débilmente positiva

–:respuestanegativa

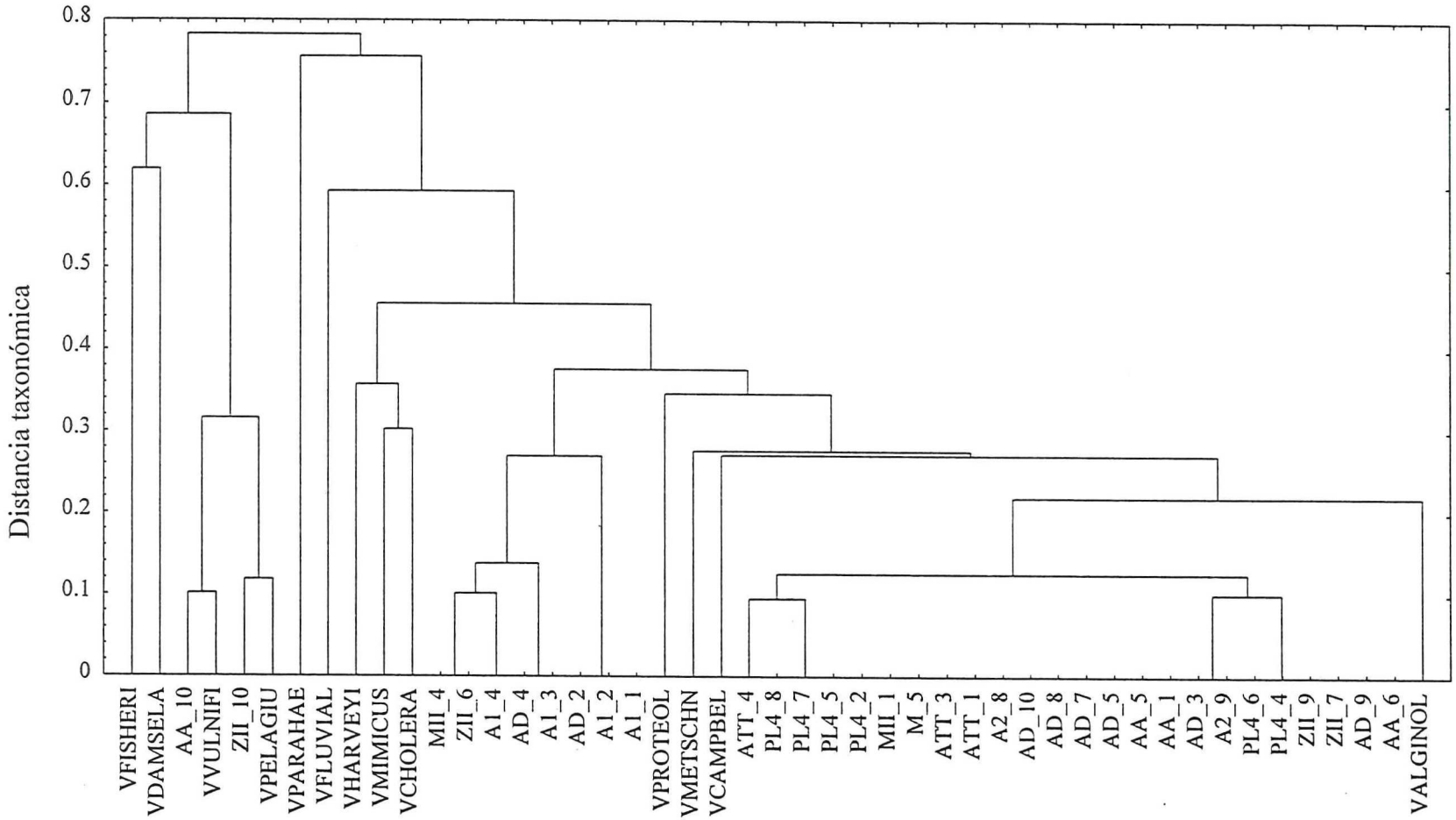

Fig. 3.-Cepas de la granja y de referencia con API20 NE, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.

IV.2.3.2.- Pruebas de laboratorio independientes:

En la Figura 4 se observa el dendrograma producido con las cepas estudiadas. Con estas pruebas 32 cepas se relacionan bien con *V. alginolyticus*; la cepa ZII-10 sigue unida a *V. pelagius*. La cepa identificada por API como *V. vulnificus* (AA-10), se asocia ahora más a *V. parahaemolyticus*. Esta relación concuerda mejor que la encontrada con API para *V. parahaemolyticus,* ya que aquí ambas cepas presentan color verde en TCBS, a diferencia de las cepas identificadas como tal anteriormente.

IV.2.3.3.- API20 NE y pruebas independientes:

Si se analiza el dendrograma de la Figura 5, se puede notar una mejor resolución de identificación, muy semejante a la producida por las pruebas independientes. El 94% de las cepas (32) se relacionan bien con *V.alginolyticus*, mientras que la cepa ZII-10 no identificada por API, permanece ligada a *V. Pelagius*. La cepa AA-10 se agrupa con *V. vulnificus*, tal como la identificó el sistema API.

Después de analizar lo anterior, se puede decir que las pruebas independientes propuestas dan una buena respuesta de identificación de las cepas provenientes de la granja. El uso de cepas de colección es una herramienta importante cuando se utilizan pruebas para identificación, ya que se realiza con mayor confianza al tener una bacteria de referencia

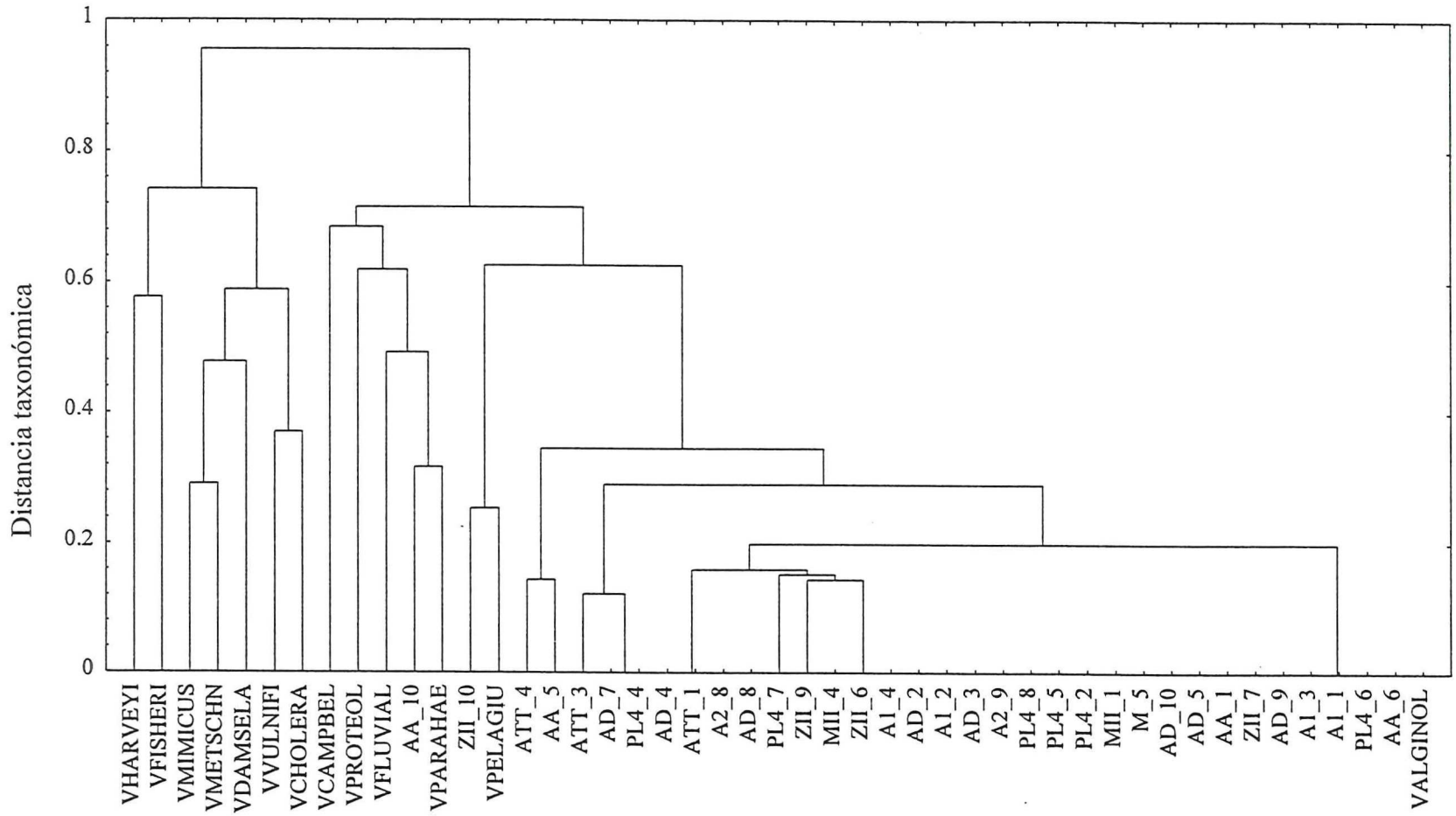

Fig. 4.-Cepas de la granja y de referencia con pruebas independientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.

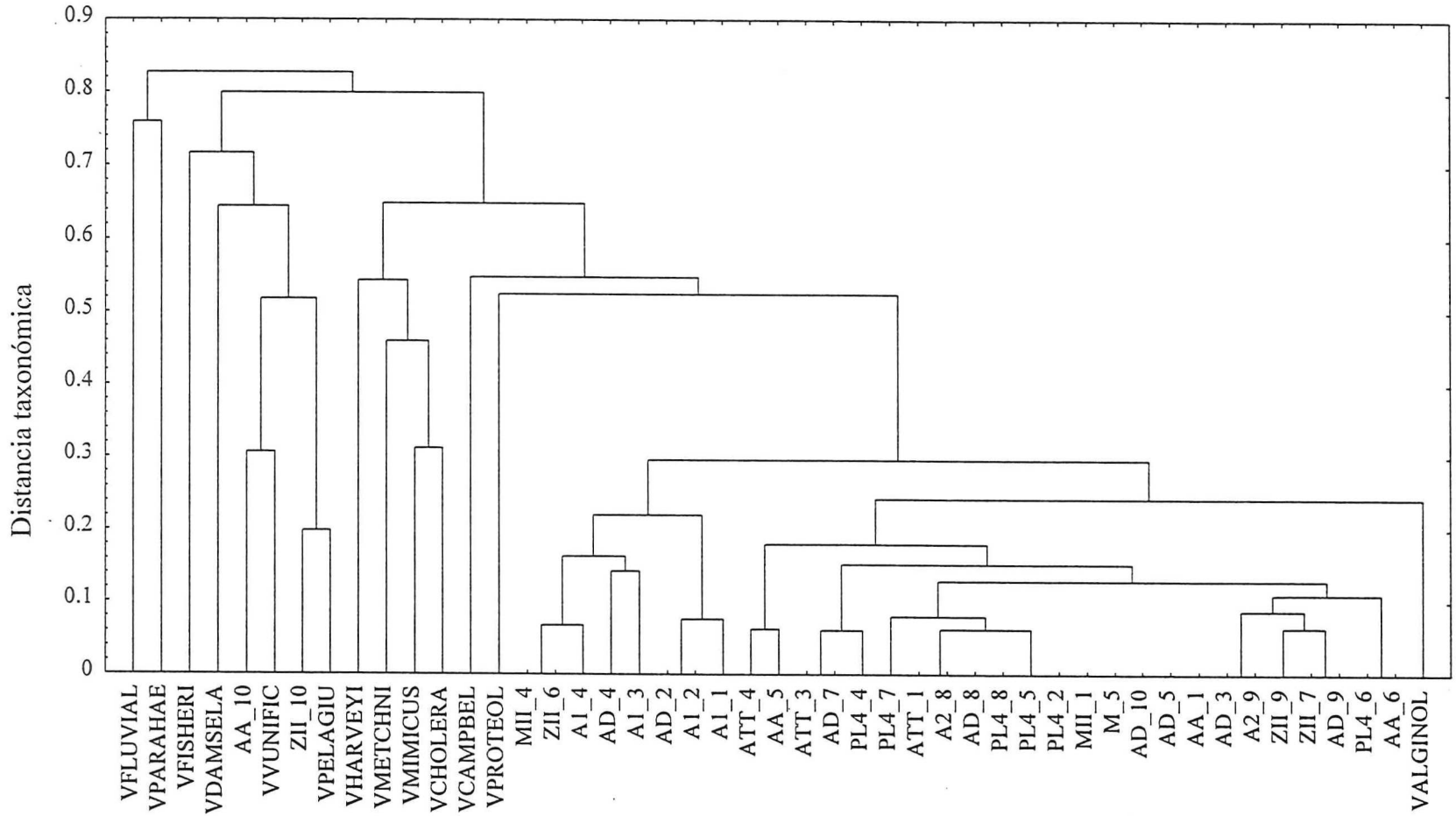

Fig. 5.-Cepas de la granja y de referencia con API20 NE y pruebas independientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos con igual peso.

sobre todo cuando se utilizan pruebas de diagnóstico rápido, ya que la gran mayoría de cepas patógenas a los cultivos no son identificadas correctamente por tales sistemas.

Es importante hacer notar que para que el análisis taxonómico tenga mayor peso, es necesario aplicar un número importante de pruebas (se ha sugerido mayor a 50), sin embargo, los resultados encontrados aquí pueden considerarse muy próximos a la realidad debido a la utilización de cepas de referencia.

IV.2.4. Sistema API20 NE y cepas de referencia:

En la Figura 6 se pueden apreciar las agrupaciones de cepas *Vibrio* de referencia en base a las respuestas de las pruebas del sistema API. Si se traza una línea horizontal, a criterio, desde una distancia de 0.3 (se busca el menor nivel al que las cepas pueden separarse), se crean 11 diferentes respuestas de separación. Aquí se ve que el sistema no puede diferenciar entre *V. campbelli* y *V. Alginolyticus*, ni entre *V. mimicus* y *V. cholerae.* El resto de las cepas quedan separadas con una buena distancia de identificación. Los pares de cepas antes mencionados se pueden diferenciar en base al color que presentan sus colonias en TCBS. *V. alginolyticus* y *V. cholerae* producen colonias amarillas, mientras que *V. campbelli* y *V. mimicus* generan colonias verde (Tabla C2, Anexo C). *V. parahaemolyticus* es la cepa con mayor distancia taxconómica en relación a las otras cepas analizadas.

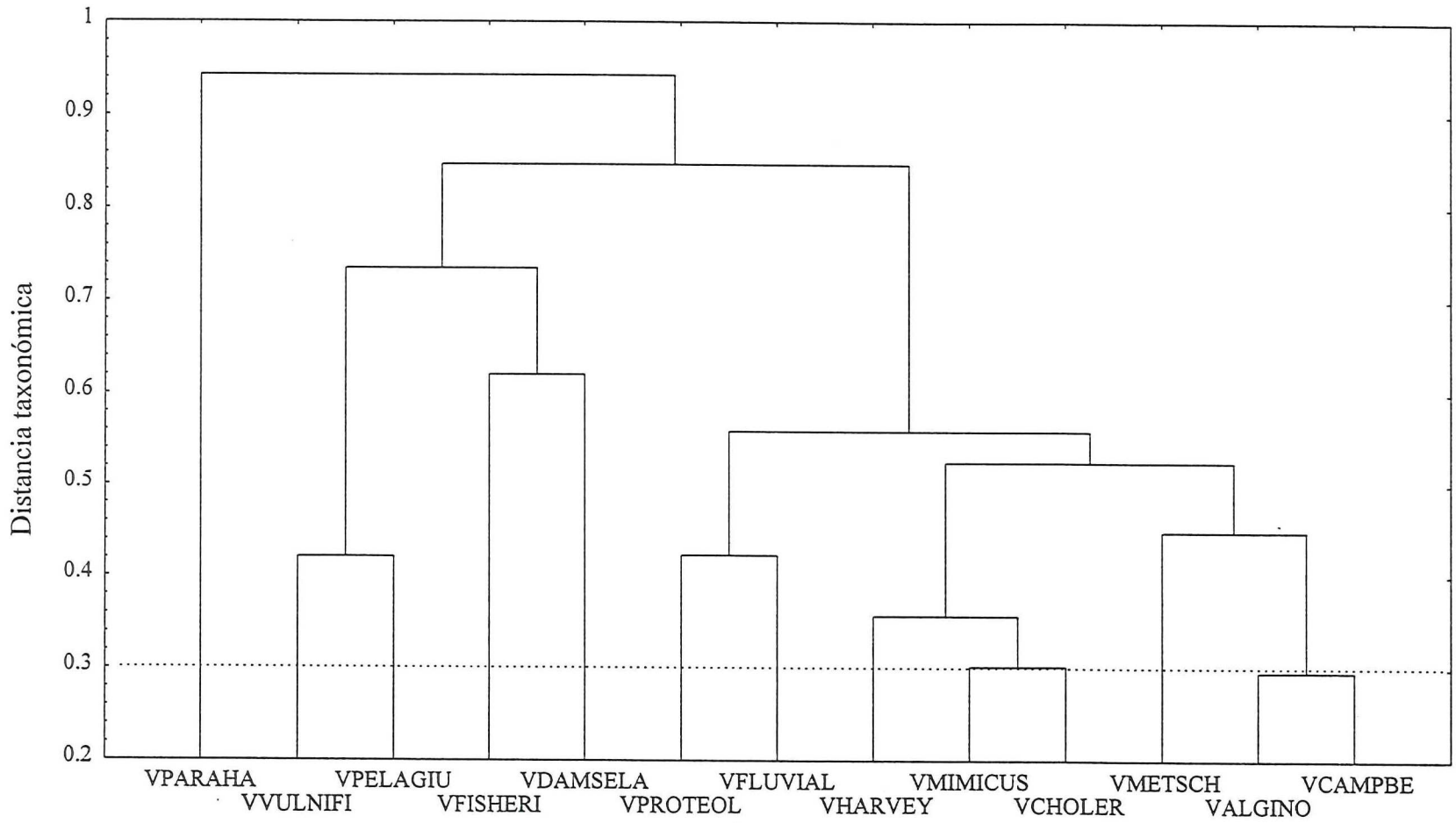

Fig. 6.-Cepas de vibrios de utilizadas como referencia con API20 NE, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.

En el API20 NE (1992), sólo existen códigos de identificación para cinco cepas de *Vibrio*, lo que le da muchas limitaciones al sistema para identificar patógenos en acuicultura de dicho género, sin embargo, si se analizan cepas de referencia como en este caso, al cargar los datos en el programa de análisis utilizado en el estudio, se pueden diferenciar las cepas de *Vibrio* con un buen nivel de separación.

IV.2.5.- Pruebas independientes (en laboratorio) y cepas de referencia:

Cuando se procesan los datos de las pruebas independientes aplicadas a las cepas *Vibrio* de referencia (Tabla C2, Anexo C), se produce el dendrograma mostrado en la Figura 7. Si trazamos una línea horizontal a la misma distancia como en el caso anterior, se produce una separación de 11 cepas, igual número que en el caso del API.; sin embargo, el nivel máximo de distanciamiento (cepa con mayor diferencia) es ligeramente superior al 0.8, a diferencia del dendrograma precedente, donde la distancia llega ha 0.95. Lo anterior está determinado por el número de pruebas utilizadas para el análisis en ambos casos. Cuanto más pruebas se apliquen, el distanciamiento entre cepas tiende a ser mayor.

Mediante las pruebas independientes, al nivel seleccionado (0.3), no es posible diferenciar entre *V. vulnificus* y *V. fisheri*; sin embargo, se pueden utilizar pruebas claves para una diferenciación presuntiva, en este caso, ambas cepas dan color verde en TCBS, pero *V. fisheri* produce luminiscencia a diferencia de *V. vulnificus*. De igual manera, *V.*

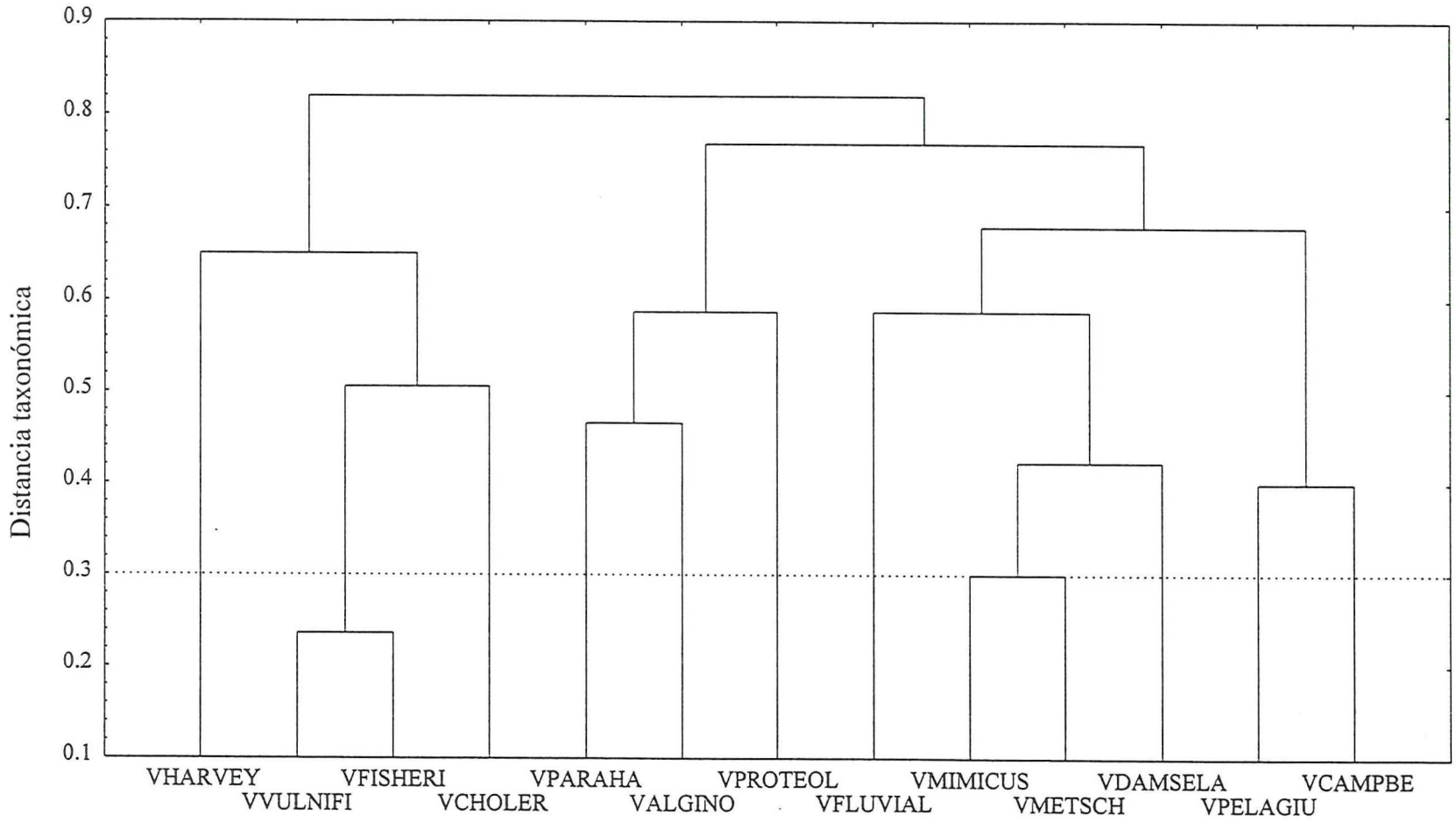

Fig. 7.-Cepas de vibrios utilizadas como referencia con pruebas independientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.

mimicus no se puede separar correctamente de *V. metschnikovii*; sin embargo, si consideramos únicamente la prueba de la oxidasa se podría lograr, ya que *V. metschnikovii* la da negativa a diferencia de *V. mimicus*.

IV.2.6.- Pruebas API20-NE e independientes con cepas de referencia:

En la Figura 8 se puede ver el dendrograma correspondiente. La máxima distancia de separación es de 0.88, ligeramente superior a la producida por las pruebas independientes pero inferior a la producida por API, lo anterior puede indicar que a pesar de que el número de pruebas es mayor, no se incrementó la máxima distancia taxonómica, pero sí en el nivel de 0.3. Ha este nivel se pueden separar todas las cepas analizadas. Quizá, *V. mimicus* y *V. cholerae* puedan crear problemas de separación, semejante a cuando se utilizó API. *V. campbelli* y *V. alginolyticus* se agruparon similarmente que con API solamente. Sin embargo, en este caso *V. alginolyticus* quedó ligado a *V. proteolyticus*, lo que puede estar influido por la capacidad de estas cepas de crecer bien a todas las salinidades analizadas en las pruebas independientes (Fig. 7).

Como se puede observar, los sistemas de identificación por separado (API y pruebas independientes) responden bien para diferenciar a las cepas de referencia analizadas, sin embargo cuando se utilizan combinadas, la respuesta es mejor. Lo anterior debe ser considerado cuando se utilicen sistemas de diagnóstico rápidos para identificación, ya que

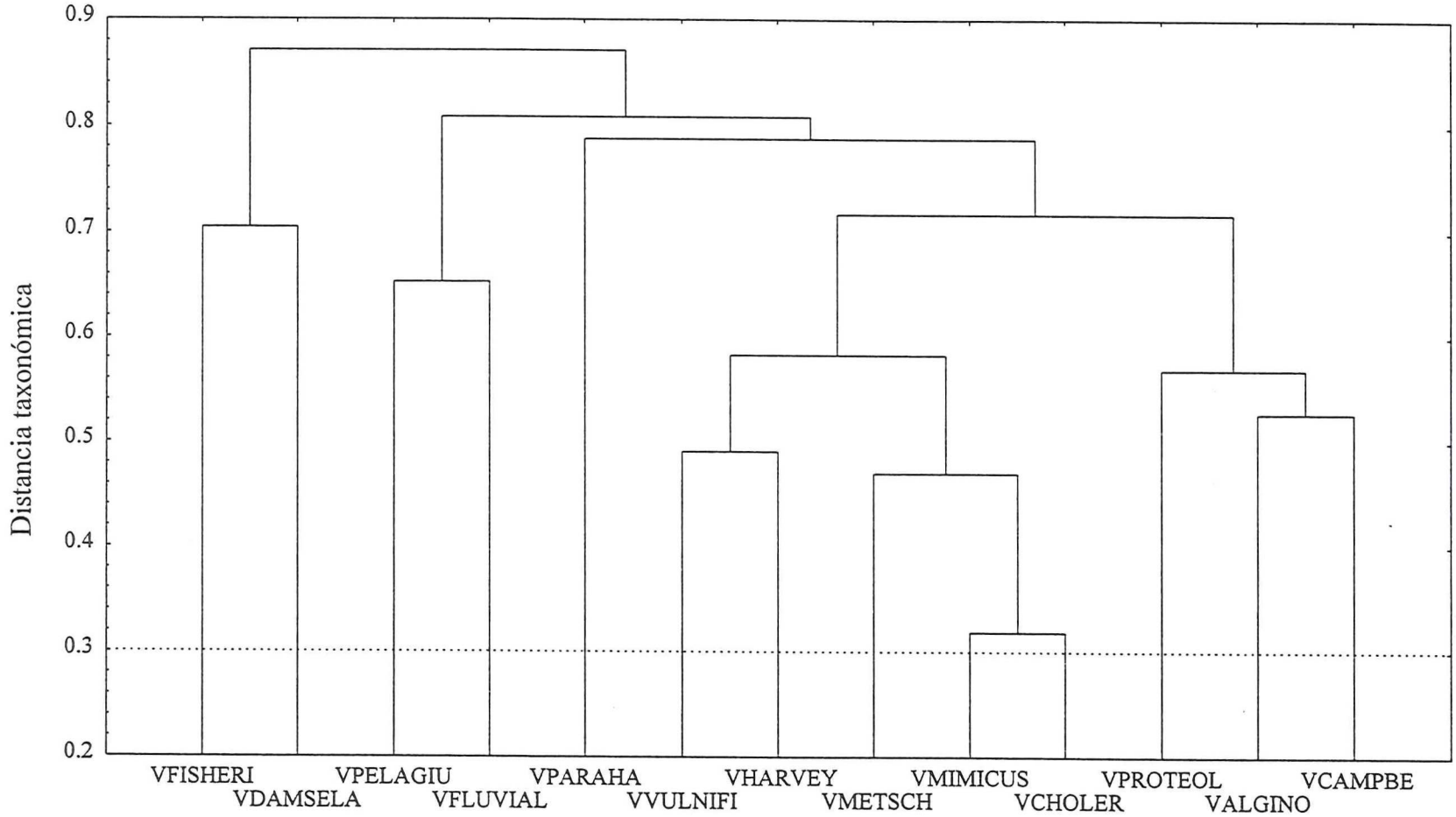

Fig. 8.-Cepas de vibrios utilizadas como referencia con pruebas API20 NE e idependientes, con distancias de 1-Pearson r, unidas por el promedio de pares de grupos de igual peso.

el número de pruebas que contienen es limitado y las respuestas de separación de cepas puede no ser claro.

Como se pudo apreciar en las identificaciones bacterianas realizadas en la granja, anteriormente descritas (Tabla XIX), *V. alginolyticus* está presente en todas las áreas del cultivo, lo que puede ser significativo, ya que a esta bacteria se le ha asociado con la producción de sustancias extracelulares identificadas como proteasas, letales para moluscos (Nottage y Birkbeck, 1987), peces (Kuo-Kan, 1995) y crustáceos (Kuo-Kan *et al.*, 1996). Así mismo, Thuesen y Koguse (1989) y Cheng *et al.* (1995), han relacionado a esta bacteria con la producción de tetrodotoxinas, que podrían ser causantes de mortalidades en cultivos; sin embargo, la producción de esta última sustancia por *V. alginolyticus* es puesta en duda por Matsumura (1995), quien atribuye su identificación a errores metodológicos.

Independientemente del mecanismo de patogenicidad, está demostrado que *V. alginolyticus,* bajo condiciones óptimas de crecimiento, puede afectar a los cultivos de diversos organismos acuáticos. Sin embargo, investigaciones recientes ponen de manifiesto la utilidad de al menos una cepa de *V. alginolyticus*, como probiótico. Austin *et al.* (1995), utilizó una cepa de esta especie para inhibir la patogenicidad de *V. anguillarum*, *V. ordalli* y *Aeromonas salmonicida* en peces. Lo anterior señala que además de evaluar cargas bacterianas e identificar especies en los cultivos en acuicultura, se debe de caracterizar taxonómicamente y evaluar a la cepas bacterianas presentes, ya que la posibilidad de

encontrar probióticos (bacterias con capacidad de excluir a otras del medio, al ocupar los nichos ecológicos disponibles) entre bacterias reconocidas como patógenas no es remota.

Como corolario del trabajo se puede decir que los objetivos planteados en el mismo fueron alcanzados en su totalidad. Se analizaron 20 muestras de 11 de marcas comerciales de quistes que fueron comparadas, desde el punto de vista bacteriológico, con 4 muestras de quistes obtenidos de salinas en México, no empleados comercialmente. El análisis anterior dejó en claro que los quistes analizados no contienen bacterias patógenas de género *Vibrio* como se ha hecho mención en otros trabajos (Igarashi *et al.*, 1989; Montoya-Rodríguez, 1992).

El uso del TCBS (DIFCO) como medio selectivo para la identificación presuntiva de vibrios, debe ser revisado exhaustivamente, ya que aquí se encontró que bacterias presentes en quistes de *Artemia* pueden crecer en él, aunque no tienen ninguna relación con bacterias del género antes mencionado. Lo anterior sugiere que se debe, al menos, realizar la prueba de tinción de Gram a cepas dudosas crecidas en este medio, para evitar tener resultados erróneos ó bien utilizar las marcas BBL (Baltimore Biological Laboratories, Baltimore Md.) o Eiken (Eiken Chemical Company, Japón), que según West *et al.* (1982), presentan la mayor inhibición contra especies diferentes a *Vibrio*.

La diferencia bacteriológica entre sistemas de eclosión de quistes (laboratorio y granja), es notable, por lo que se debe de profundizar en este campo para detectar la fuente real de bacterias Gram negativo en el cultivo de *Artemia*, y así poder ejercer un mejor control sanitario en esta fase que es crucial para el cultivo larvario.

Sin duda, en todos los sistemas de cultivo en acuicultura existen bacterias, ya que éstas forman parte, en la mayoría de los casos, de la flora normal de los organismos utilizados; sin embargo, se debe tener una vigilancia extricta en los niveles que alcanzan en el agua de cultivo ya que éstos son el primer indicio de una potencial infección.

La identificación de especies bacterianas en las granjas debe de estar dentro de los procesos de rutina, ya que en ocasiones, más que la cantidad es el tipo de bacterias lo que puede crear problemas, motivo por el cual se deben de estandarizar procedimientos de identificación, al menos presuntiva, de especies o grupos bacterianos. Lo anterior debe hacerse de acuerdo a las posibilidades de la granja, pero se recomienda seleccionar metodologías sencillas pero funcionales.

Por otro lado, tenemos que *Vibrio alginolyticus* es una especie que está presente en casi todos los organismos que se cultivan comercialmente, por lo que no es sorprendente que pueda generar epizootias importantes; sin embargo, el convivir con esta bacteria podría marcar la pauta para encontrar cepas potencialmente útiles a los cultivos, como se ha demostrado en algunos trabajos. En esta investigación, las cepas analizadas, en su mayoría, fueron identificadas como *V. alginolyticus*, y los resultados del cultivo larvario en la granja

fueron normales aparentemente (información de la granja). Ésto indicaría, que esta cepa en los niveles promedio registrados de 10^3-10^4 UFC/ml, no es patógena y podría funcionar como probiótico, ocupando nichos potencialmente disponibles para bacterias dañinas, tal como ha sido señalado por Austin *et al.* (1995).

Los cultivos de nauplios de *Artemia* presentan, en laboratorio, una microflora que no puede implantarse en los tanques de eclosión de la granja, y es sustituida rápidamente por otra más apta para estas condiciones, como fue el caso de *V. alginolyticus* en este estudio, y que pueden persistir a lo largo del ciclo larvario. Lo anterior nos indica que esta parte del proceso puede ser utilizada en el control de las poblaciones bacterianas que influirán significativamente en el sistema y por lo tanto pudieran ser un vector idóneo para la introducción de probióticos, con el fin de reducir enfermedades e incrementar las producciones en los sistemas de cultivo de crustáceos.

V. CONCLUSIONES

Como resultado del presente trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

• Las respuestas de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo TCBS deben ser tomadas con reserva ya que existen bacterias, sin ninguna relación al género *Vibrio*, que desarrollan colonias en él, y por lo tanto se debe restringir el empleo del término "bacterias tipo vibrio" al hacer referencia a cepas que crecen en dicho medio.

• **Como la aportación más importante del trabajo, se demostró que los quistes comerciales de *Artemia franciscana* utilizados en los cultivos larvarios de camarón en México, no son portadores de bacterias patógenas, al menos del género *Vibrio*, a pesar de que presentan bacterias con capacidad de crecer en el medio selectivo TCBS.**

• Los nauplios de *Artemia*, al menos en una granja camaronícola, son vectores de bacterias potencialmente patógenas para los cultivos de crustáceos.

• *Vibrio alginolyticus* fue la especie más importante, por su abundancia y distribución, en el sistema de cultivo larvario de la granja.

• Los microsistemas de identificación bacteriana rápidos (API 20E, API20 NE, API ZYM, etc.) son buenos; sin embargo, es importante complementarlos con pruebas de laboratorio específicas para las especies buscadas, para así, incrementar la posibilidad de realizar una identificación correcta de las bacterias analizadas.

• Las pruebas de laboratorio utilizadas en este trabajo, demostraron ser una herramienta útil para caracterizaciones preliminares de bacterias en sistemas de cultivo larvario.

VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio y con el fin de profundizar en esta área en futuras investigaciones, se plantean las siguientes recomendaciones:

- Analizar el crecimiento bacteriano de quistes de *Artemia franciscana* comerciales en medios de cultivo TCBS diferentes a la marca DIFCO, utilizada en este estudio, para conocer con precisión si las bacterias Gram positivo encontradas, pueden superar la selectividad de dichos medios de cultivo.
- Estudiar más a fondo la flora bacteriana de los quistes, con el fin de detectar otros patógenos diferentes a *Vibrio* spp., para así determinar si es necesario someter a los quistes a tratamientos de desinfección antes de su eclosión.
- Para trabajos posteriores que evalúen la calidad de eclosión de quistes, se recomienda trabajar con muestras cuya vida de anaquel sea similar, para que los resultados puedan ser comparables.
- Se recomienda también estudiar más detalladamente, en las granjas de camarón, lo que ocurre durante la eclosión de quistes de *Artemia*, para poder conocer la forma y momento en que las bacterias Gram negativo (ausentes en los quistes) llegan al cultivo.
- Se recomienda, igualmente, analizar la posibilidad de que bacterias diferentes a *V. alginolyticus*, que producen mayor cantidad de oligopolisacáridos y por lo tanto, con mayor capacidad de adhesión (*V. harveyi, V. fisheri*, etc.), y que en caso de estar presentes en el

sistema, puedan convertirse en flora dominante durante la eclosión de *Artemia* y crear problemas en el cultivo, posteriormente.

• Tanques y tuberías fuera de uso o al término de éste, es recomendable lavarlos con solución de cloro y jabón enzimático, con el fin de eliminar a todas las bacterias adheridas a las paredes y que podrían convertirse en foco de infección para el resto del sistema de cultivo.

• Las cepas más frecuentes en los cultivos y que no crean problemas de infección en los organismos, podrían ocupar los nichos disponibles en el medio y evitar que bacterias patógenas los colonizen, por lo que podrían funcionar como probióticos. Por lo anterior, se recomienda analizar, a través de bioensayos, esta posibilidad con cepas aisladas de los sistemas de cultivo larvario y de *Artemia*.

VII. LITERATURA CITADA

Adams, A. 1991. "Detection of *Vibrio parahaemolyticus* biotype *alginolyticus* in penaeid shrimp using an amplified enzyme-linked inmunosorbent assay". Aquaculture 93:101-108.

Alsina M. y A.R. Blanch. 1994. "A set of biochemical identification of environmental *Vibrio* species". J. of Appl. Bacteriol. 76:79-85.

Anguiano-Beltrán, C. 1996. Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y postlarvas del abulón rojo, *Haliotis rufecens*. Tesis de maestría. CICESE, Ensenada B.C. Méx. 60pp.

Anónimo. 1994. "Brine shrimp eggs. The borgain days are over". Shrimp News Int. 19(7):2-4.

APHA, 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Watewaster. Clescer L, A.E. Greenberg y R.R. Trussell (Editores). !7 ^{ava} Edición. Washington, D.C. p.9-61.

API20 NE. 1992. Code book (20090). Analytical profile index. 5ta edición. BIO MERIEUX S.A., Francia. 298pp.

Austin, B. y D.A. Austin (editores). 1987. *Vibrios*. Bacterial Fish Pathogens: disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Series in Aquacultural and Fisheries Support. John Wiley & Sons. Great Britain. 364pp.

Austin, B. y D.A. Allen. 1982. "Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia)*". Aquaculture 26:369-383.

Austin, B., L.F. Stuckey, P.A.W. Robertson, I. Effendi y D.R.W. Griffith. 1995. "A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused bay *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalli*". J. of Fish Dis. 18:93-96.

Balebona, M.C., M.A. Moriñigo, A. Faris, K. Krovacek , I. Mansson, M.A. Bordas y J.J. Borrego. 1995. "Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus". Aquaculture 132:113-120.

Bhaskar, N. y T.M.R. Setty. 1994. "Incidence of vibrios of public health significance in the farming phase of tiger shrimp (*Penaeus monodon*)". J. SCI. Food Agric. 66(2):225-231.

Biosca, E.G., C. Esteve, E. Garay y C. Amaro. 1993. "Evaluation of the API 20E system for identification and discrimination of *Vibrio vulnificus* biotype 1 y 2". J. of Fish Dis. 16:79-82.

Chen, S.N., S.L. Huang y G. H. Kou. 1992. Studies of the epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon*, in Taiwan. En Fulks, W. y K.L. Main (Editores). Proceeding of the Workshop Diseases of Cultured Penaeid shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute: 195-208.

Chen D. y P.S. Hanna. 1994. Inmunodetection of specific *Vibrio* bacteria attaching to tissues of giant tiger prawn *Penaeus monodon*". Dis. Aquat. Org. 20(2):159-162.

Cheng, C.A., D.F. Hwang, Y.H. Chen, S.S. Jeng, T. Noguchi, K. Ohwada y K. Hasimoto. 1995. "Microflora and tertodotoxin-producing bacteria in a gasteropod, *Niotha chathrata*". Food Chem. Toxicol. 33(1):929-319.

De la Peña , L.D., T. Tamaki, K. Momoyama, T. Nakai y K. Muroga. 1993. "Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*". Aquaculture 128:203-209.

Dempsey, A.C. y C.L. Kitting. 1987. "Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp". Crustaceana 52(1):90-94.

DIFCO, 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10ma edición. Difco laboratories. Michigan, USA. 1155pp.

Dixon, B.A. 1994. "Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens". J. of the World Aquacul. Soc. 25(1):60-63.

Duan, D., L. Xu, X. Fei y H. Xu. 1995. " Marine organisms attached to seaweed surfaces in Jiaozhou Bay, China". World J. Microbiol. Biotechnol. 11(3):351-352.

Egidius, E., R.Wiik, K. Andersen, K.A. Hoff y B. Hjetlnes. 1986. "*Vibrio salmonicida* sp. nov. a new fish pathogen". Int. J. Syst. Bacteriol. 36:518-520.

Esteve, C., C. Amaro, E.G. Biosca y E. Garay. 1995. "Biochemical and toxigenic properties of *Vibrio furnissi* isolated from an european eel farm". Aquaculture 132:81-90.

FDA. 1992. Bacteriological Analytical Manual. 7ma edición. AOAC. International 2200 Wilson Blvd. Arlington, USA. 529pp.

Fendrich, C. y B. Schnik. 1988. "Degradation of glucose, glycerol and acetate by aerobic bacteria in surface water of Great Salt Lake, Utah, USA". Syst. Appl. Microbiol. 32(4):229-231.

Gilmour, A., M.F. McCallum y M.C. Allan. 1975. "Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from the canned eggs of the Californian brine shrimp (*Artemia salina*)". Aquaculture 6:221-231.

GómezGil, R.S. B. 1993. Estudio bacteriológico de quistes y nauplios de la población de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906, del Gran Lago Salado, E.U.A. Tesis de maestría. UNAM. México. 75pp.

GómezGil, R.S.B., F.A. Abreu-Grobois, J. Romero-Jarero y M. Herrera-Vega. 1994. "Chemical disinfection of *Artemia* nauplii". J. of the World Aquacul. Soc. 25(4):579-583.

Grisez, L., R. Ceusters y F. Ollevier. 1991. "The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* y *V. ordalli*". J. of Fish Dis. 14:359-365.

Hameed, A.S.S. 1993. " A study of the aerobic heretrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and postlarvae of *Penaeus indicus*". Aquaculture 117:195-204.

Hameed, A.S.S. 1995. "Susceptibility of three *Penaeus* species to a *Vibrio campbelli*-like bacterium". J. of the World Aquacul. Soc. 26(3): 315-319.

Hameed, A.S.S. y P.V. Rao. 1994. "Studies on the chemical control of a *Vibrio campbelli*-like bacterium affecting hatchery reared *Penaeus indicus* larvae". Aquaculture 127:1-9.

Hansen, G.H. y R. Sørgheim. 1991. "Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria". J. of Microbiol. Methods. 13:231-241.

Hugh, R. y E. Leifson. 1953. "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria". J. Bacteriol. 66:24.

Igarashi, M.A., H. Segugita y Y. Deguchi. 1989. "Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*". Nippon Suisan Gakkaishi 55(11):2045.

Ishimaru, K., M. Akagawa-Matsuchita y K. Muroga. 1995. "*Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*)". Int. J. of Syst. bacteriol. 134-138.

Jones, K.L. y M.E.R. Rhodes. 1981. "The survival of marine bacteria under starvation conditions". J. of Appl. Bacteriol. 50:247-258.

Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathie e Indrani Karunasagar. 1994. "Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection". Aquaculture 128:203-209.

Kaye, M., P. Blake y O. Olsvik (Editores). 1994. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. En *Vibrio cholerae*. Molecular to global perspectives. Washington, USA. 465pp.

Kobayashi, T., S. Enamoto, R. Sakazaki y R. Kuwabara. 1963. "A new selective isolation medium for the *Vibrio* group (modified Nakanishi medium TCBS agar)". Jap. J. Bacteriol. 18:387-392.

Kuo-Kau, L. 1995. "Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabarricus*, Boch et Shneider". Microbiol. Pathog. 19(1)39-48.

Kuo-Kau, L., Y. Shu-Ru, C. Ferng-Ruey, Y. Tun-I y L. Ping-Chung. 1996. "Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*". Curr. Microbiol. 66(2):225-231.

KweiLin, C. 1989. "Prawn cultured in Taiwan. What went wrong?". World Aquacul. 20:19-20.

Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E. R. Cruz Lacierda y L.D. de la Peña. 1990. "Ocurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines". Aquaculture 91:1-13.

Lewis, D.H., J.K. Leong y C. Mock. 1982. "Aggregation of penaeid shrimp larvae due to microbiol epibionts". Aquaculture 27:149-155.

Ligthner, D.V. 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawn with emphasis on recent discoveries and developments. Proc. First Internat. Conference on Cultured of Penaeid prawn/shrimp. Iloilo city, Philippines, 1984. SEAFDEC Aquaculture department. pp 79-103.

Lightner, D.V. 1988. " *Vibrio* disease of penaeid shrimp". En: Sinderman and Lightner (editores). Disease diagnosis and control in North American Aquaculture, 2nd Rev. edit. Elsevier, Amsterdan. 431pp.

Lightner, D.V. 1993. Disease of cultured penaeid shrimp. En S.P. Mcvey (ed.). Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture. 2da edición. CRC, Press Boca Raton Fl. pp. 289-320.

Lightner, D.V.(editor) 1996. A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Publicado por The World Aquaculture Society. Louisiana State University, Baton Rouge Louisiana, USA.

Lightner, D.V. y D.H. Lewis. 1975. "A septic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp". Mar. Fish. Rev. 37:25-28.

Liltved, H., H. Hektoen y H. Efraimsen. 1995. "Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonization or UV irradiation in water of different salinity". Aquacul. Enginee. 14:107-122.

Lizárraga-Partida, M.L. y G. Vargas-Cárdenas. 1992. Detección de fuentes de bacterias del género *Vibrio* en la granja GENESIS de producción camaronícola, en Puerto Peñasco, Son., Mex. 4-17 de nov. 1992. Reporte técnico. CICESE. 32pp.

Lizárraga-Partida, M.L., L. Montoya-Rodríguez y V. Gendrop-Funes. 1997. "El uso de conteos bacterianos en dos criaderos mexicanos de camarón". Ciencias Marinas. 23(1):129-140.

MacDonell, M.T., F.L. Singleton y M.A. Hood. 1982. "Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria". Appl. and Environ. Microbiol. 44(2):423-427.

MacDowell, M.T. y R.R. Colwell. 1985 "Phylogeny of the *Vibrionaceae* and recommendations for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*". Syst. and Appl. Microbiol. 6:171-182.

MacFaddin, J.F. 1993. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. México, D.F. 301pp.

Marthi, B., V.P. Fieland, M. Walter y R.J. Seidler. 1990. "Survival of bacteria during aerosolization". Appl. and Environ. Microbiol. 56(11)3463-3467.

Matsumura K. 1995. "Reexamination of tetrodotoxin production by bacteria". Appl. and Environ. Microbiol. 61(9):3468-3470.

McCormak, W.M., W.E. DeWitt, P.E. Bailey, G.K. Morris, P. Soeharjono y E. S. Gangarosa. 1974. "Evaluation of Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar, a selective medium for the isolation of *Vibrio cholerae* an other pathogenic vibrios". The J. of Infect. Diseas. 129(5):497-500.

Merchie, G., M. Dehasque y P. Sorgeloos. 1997. The use of DC *Artemia* minimize the risk of introducing potentially pathogenic microorganisms in shrimp and fish larviculture. Abstracts of the second Asia-Pacific Marine Biotechnology

Conference and 8va Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology. May 1997. Thailand. p 10.

Mialhe, E., V. Boulo, E. Bachere, D. Hervio, K. Cousin, D. Noel, T. Noel, M. Ohresser, R.M. Deuff y S. Gendreau. 1992. "Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture". Aquaculture 107:155-164.

Monhey, L.L., D.V. Lightner y T.A. Bell. 1994. "An epizootic of vibriosis in ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea:Decapoda)". J. of the World Aquacult. Soc. 25(1): 116-125.

Montoya-Rodríguez L. 1992. Caracterización e identificación de bacterias del género *Vibrio* en sistemas de acuicultura de Ensenada, B.C. mediante el establecimiento de un conjunto mínimo de pruebas taxonómicas. Tesis de maestría. ICMyL. UNAM. 89pp.

Morita, R.Y. 1975. "Psychophilic bacteria". Bacteriol. Rev. 39:144-167.

Muroga, K., K. Suzuki, K. Ishimaru y K. Nogami. 1994."Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture". J. of the World Aquacul. Soc. 25(1):50-54.

Nicholls, K.M., J.V. Lee y T.J. Donovan. 1976. "An evaluation of commercial thiosulphate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)". J. of appl. bacteriol. 41: 265-269.

Noel, T., E. Aubree, D. Blateau, E. Mialhe y H. Grizel. 1992. "Treatments against the *Vibrio P1*, suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*". Aquaculture 107: 171-174.

Nottage, A.S. y T.H. Birkbeck. 1987. "Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339". J. fish Dis. 10(3):211-220.

Novitsky, J.A. y R. Morita. 1978. "Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions". Mar. Biol. 48:289-295.

Oppenheimer, C.H. y C.E. ZoBell. 1952. "The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure". J. Mar. Res. 11:10-18.

Patrick, F.M. 1978. "The use of membrane filtration and marine agar 2216E to enumerate marine heterotrophic bacteria". Aquaculture 13:369-372.

Pector, R., W.Tackaert, P. Abellin, F. Ollivier y P. Sorgeloos. 1994. "A comparative study on the use of different preparations of descapsulated *Artemia* cysts as food for rearing african catfish (*Clarias pariepinus*) larvae". J. World Aquacul. Soc. 25(3):366-370.

Prayitmo, S.B. y J.W. Latchford. 1995. "Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effects of salinity and pH on infectiosity". Aquaculture 132:105-112.

Rodríguez, C. y N.B. Bhosle. 1991. "Exopolysaccharide production by *Vibrio fisheri*, a fouling marine bacterium". Biofouling 4(4):301-308.

Romalde, J.L., B. Magariños, B. Fouz, I. Bandin, S. Núñez y A.E. Toranzo. 1995. "Evaluation of BIONOR mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens". Dis. Aquat. Org. 21:25-34.

Roszak,D.B. y R.R. Colwell. 1987. "Survival strategies of bacteria in the natural environment". Microbiol. Rev. Septiembre, 1987. pp.365-379.

Saeed, M.O. 1995. "Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait". Aquaculture 136:21-29.

Santiago-Serrano, M.E. 1996. Calidad bacteriológica en un sistema de cultivo durante los estadios larvarios y postlarvarios del erizo rojo (*Strogylocentrotus franciscanus*). Tesis de licenciatura. UABC, Ensenada , B.C. Méx. 70pp.

Santos, Y., I. Bandin, S. Núñez, M. Montero, A. Silva y A. E. Toranzo. 1992. "Comparison of the extracellular biological activities of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hidrofila*". Aquaculture 107:259-270.

Santos, Y., J.L. Romalde, I. Bandín, B. Magariños, S. Núñez, J.L. Barja y A.E. Toranzo. 1993. "Usefulness of the API 20E system for the identification of bacterial fish pathogens". Aquaculture 116:111-120.

Sneath, P.H.A. y R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco California, USA. 573pp.

Song, Y.L., W. Cheng, C.H. Shen, Y.C. Ou y H.H. Sung. 1990. Occurrence of *Vibrio vulnificus* infections in cultured shrimp and eel in Taiwan. En G.H. Kou, H. Wakabayashi, I.C. Liao, S.N. Chen y C.F. Lo (editores). Fish disease proceeding of ROC-Japan Symposium of Taipei, Taiwan. NSC symposium series. No 16:172-179.

Sorgeloos, P., E. Bossuyt, E. Laviña, M. Baeza Mesa y G. Persoone. 1977. "Descapsulation of *Artemia* cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture". Aquaculture 12:311-315.

Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Léger, W. Tackaert y D. Versichele. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. The Belgian Administration for Development Cooperation the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Bélgica. 319pp.

Spotte, S. y G. Anderson. 1989. "Chemical decapsulation of *Artemia franciscana* resting cysts does not necessarily produce more nauplii". J. of the World Aquacul.. Soc. 20(3):127-133.

Stephens, D.W. 1990. Changes in the Lake levels, salinity and the biological community of Great Salt Lake (Utah, USA), 1847-1987. En Saline-Lakes. Comin., F.A. y T.G. Northcote (Editores). 197:139-146.

Straub, D.V. y B.A. Dixon. 1993. "Bacteriological flora of brine shrimp (*Artemia franciscana)* from a hypersaline pond in San Francisco Bay, California". Aquaculture 118:309-313.

Taylor, P.W., J.E. Crawford y E.B. Shotts Jr. 1995. "Comparison of two biochemical test systems with conventional methods for the identification of pathogenic bacteria to warmwater fish". J. of Aquat. Anim. Health 7:312-317.

Thuesen, E.V. y K. Kogure. 1989. "Bacterial production of tetrodotoxin in four species of *Chaetognatha*". Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods-hole. 176(2):191-194.

Vanderzant, C., R. Nickelson y P.W. Judkins. 1971. "Microbial flora of pond-reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*)". Appl. Microbiol. 21(5):916-921.

Vaughn, S. 1994. "Utah's unique lake". Underwat.-Nat. 1994. 22(2):14-33.

Vera, P., J. J. Navas y M. C. Quintero. 1992. "Experimental study of the virulence of three species of *Vibrio* bacteria in *Penaeus japonicus* (Bate 1881) juvenils". Aquaculture 107:119-123.

Verdonck, L., J. Swings, K. Kersters, M. Dehasque, P. Sorgeloos y P. Léger. 1994. "Variability of the microbial environment of rotifer *Braquionus plicatilis* and *Artemia* production systems". J. World Aquacul. Soc. 25(1):55-59.

Vivares, C.P. , F. Grimont, F. Baudin-Laurencin, B. Andral y P.A.D. Grimont. 1992. "Molecular epidemiology of bacterial fish disease: preliminary study with *Vibrio anguillarum*". Aquaculture 107:141-145.

Wen-Yu, L., C. Shiu-Nan y K. Guang-Hsiung . 1994. "Studies of the flora variation of heterotrophic bacteria in giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) hatchery". Coa. Fish. Ser. 47:1-20.

West. P.A., E. Russek, P.R. Brayton y R.R. Colwell. 1982. "Statistical evaluation of a quality Control methods for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected Thiosulphate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agars". J. of Clin. Microbiol. 16:1110-1116.

Wheleer, R., A.I. Yudin y W.H. Clark Jr. 1979. "Hatching events in the cysts of *Artemia salina*". Aquaculture 18:59-67.

Wooster, G.A. y P.R. Bowser. 1996. "The aerobiological pathway of a fish pathogen-survival and dissemination of *Aeromonas salmonicida* in aerosols and its implications in fish health management". J. of the World Aquacul. Soc. 27(1)7-14.

Wurtsbaugh, W.A. 1992. "Food-web modification by an invertebrate predator in the Great Salt Lake (USA)". Oecologia 89(2):168-175.

Yasuda, K. y T. Kitao. 1980. "Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate". Aquaculture 19:229-234.

Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. 9na edición. Prentice Hall INC. Englewood Cliffs. N.J. USA. 718pp.

ZoBell, C.E. 1941. "Studies on marine bacteria: I. The culture requirements of heterotrophic species". J. Mar. Res. 4:42-75.

ANEXO A

Descripción de pruebas bioquímicas y de crecimiento aplicadas a cepas en laboratorio.

Se detallan los medios de cultivo y las pruebas de laboratorio empleadas en el trabajo. En el texto se mencionan también como pruebas independientes.

I.0.- Medios de cultivo.

I.I.- Agar ZoBell ó marino 2216E.

Este agar fue formulado por ZoBell (1941), y posteriormente fue modificado por Oppenheimer y ZoBell (1952). Es el medio de cultivo estándar para bacterias heterótrofas marinas más utilizado en el mundo (Patrick, 1978).

Ingredientes:

Agar bacteriológico	15 gr
Agua de mar añejada	750 ml
Agua destilada	250 ml
Bacto peptona	5.0 gr
Cloruro férrico (1.2 gr/L)	1.0 ml
Extracto de levadura	1.0 gr

Preparación:

El pH se debe ajustar antes de añadir el agar a 7.5±0.1. Ésto se puede hacer utilizando NaOH ó HCl.

Se calientan a ebullición todos los componentes hasta disolución total del agar. Se esteriliza en autoclave a 121 ^{0}C/15 lbs de presión por 15 minutos.

Cuando el medio está aproximadamente a 45 ^{0}C (el matraz con el medio puede tocarse con la mano sin sufrir quemadura) se vacían 20-30 ml en placas de petri estériles y se deja solidificar.

El agua de mar añejada es agua de mar (35‰) filtrada por 0.45μm y mantenida en la oscuridad ó en su defecto en un contenedor negro, por aproximadamente 3 meses.

El medio se puede encontrar comercialmente como agar marino 2216.

El medio inoculado se incuba dependiendo del fin buscado, en este caso para conteo bacteriano se incubó a 28-30 ^{0}C por 48 horas.

I.2.- Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-sales Biliares-Sacarosa).

Fue formulado originalmente por los laboratorios Eiken (Japón) y modificado posteriormente por Kobayashi *et al.* (1963). El medio es altamente selectivo para bacterias del género *Vibrio*; inhibe fuertemente a la mayoría de las bacterias entéricas, *Pseudomonas* spp. y otros Gram negativo (DIFCO, 1984). No se recomienda este medio para caracterización bioquímica de cepas.

Existen 4 marcas comerciales: Eiken, BBL, Oxoid y DIFCO.

A continuación se detalla el agar de DIFCO.

Ingredientes:

Bacto extracto de levadura	5.0 gr
Bacto proteosa peptona No. 3	10.0 gr
Citrato de sodio	10.0 gr
Tiosulfato de sodio	10.0 gr
Bacto oxgall	8.0 gr
Bacto sacarosa	20.0 gr
Cloruro de sodio	10.0 gr
Citrato férrico	1.0 gr
Bacto azul de bromotimol	0.04 gr
Azul de timol	0.04 gr
Bacto agar	15.0 gr

Preparación:

Se disuelven 89 gramos en 1 litro de agua destilada ó deionizada y se calienta hasta ebullición. El medio no se esteriliza en autoclave ya que es altamente inhibitorio de bacterias contenidas en el aire.

Siembra e incubación: Estos parámetros varían dependiendo del fin buscado. En este caso el medio se sembró por esparcido en superficie y se incubó a 28-30 ^{0}C por 48 horas.

En el medio se pueden identificar dos tipos de colonias bacterianas: amarillas, cepas que utilizan la sacarosa y acidifican el medio haciendo virar el indicador y verdes, cepas que no degradan la sacarosa y no producen ácido en el medio por lo que no hay vire del indicador.

II.0.- Pruebas bioquímicas y de crecimiento.

Para estas pruebas se utilizaron cepas bacterianas crecidas en agar ZoBell a 28-30 ^{0}C por 24±2 horas.

II.1.- Tinción de Gram.

Se fundamenta en la capacidad de la pared celular bacteriana que puede ser teñida por el colorante primario cristal violeta. Las bacterias que retienen este colorante por mayor tiempo, al ser lavadas con alcohol-cetona, se tiñen de azul violeta y se denominan Gram positivo, mientras que las que pierden el colorante con alcohol-cetona y se tiñen con el color de contraste safranina y aparecen rojas al microscopio se denominan Gram negativo.

Procedimiento:

Se utilizaron reactivos comerciales de DIFCO. Se tomó un azada de la cepa de interés y se hizo un frotis con suero salino (0.85% (p/v)) en un porta objetos. Se secó y fijó a la flama del mechero, evitando sobrecalentamiento. Se tiño con cristal violeta por 1 minuto, seguido de lavado con agua de la llave. Posteriormente se le añadió la solución de yodo por 1 minuto y se lavó igualmente con agua de la llave. Después se decoloró con alcohol-cetona por 30 segundos, seguido por lavado con agua de la llave. Finalmente se le añadió el colorante de contraste safranina por 1 minuto y se lavó de nuevo con agua de la llave. El portaobjetos se secó por 5 minutos en una incubadora a 55 ^{0}C. El frotis se observó con aceite de inmersión a 100X con un microscopio de contraste de fases Zeiss para determinar Gram y morfología.

Se utilizaron como control de reactivos cepas contenidas en portaobjetos cargados de Fisher Brand Gram.

II.2.- Oxidasa.

La prueba esta basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. El sistema citocromo sólo se encuentra en organismos aerobios ó anaerobios facultativos (MacFaddin, 1993).

Procedimiento:

Se utilizó el reactivo comercial de N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenildiamina dicloruro 1% de BBL Bencton Dickinson.

Se tomó una parte de una colonia crecida en agar ZoBell con un palillo de madera estéril (picadiente) y se esparció en papel filtro Whatman No. 1 impregnado previamente con el reactivo. Un color violáceo púrpura en los primeros 2-5 segundos es prueba positiva, mientras que un color amarillento es indicio de reacción negativa.

Se puede tomar la muestra con asa de platino pero no de nicromo, ya que éste puede dar una reacción falsa positiva de la prueba.

Se utilizó como testigo positivo a *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749) y a *Escherichia coli* (ATCC 11229) como negativo.

II.3.- Catalasa.

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaerobias facultativas que contienen citocromo, a excepción de *Streptococcus*; esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno libre. Este compuesto si se acumula en la célula es tóxico para las bacterias provocando su muerte (MacFaddin, 1993).

Procedimiento:

Se utilizó $H_2 O_2$ al 3% (Jaloma). En un porta objetos se colocó una azada de la colonia de interés proveniente de agar ZoBell, y se le añadió una gota del reactivo. Efervescencia instantánea fue registrada como prueba positiva.

II.4.- Desoxicolato de sodio.

Esta prueba se basa en la lisis celular con desoxicolato de sodio al 0.5% (p/v) lo que favorece la liberación de los ácidos nucleicos, lo cual hace que la mezcla se vuelva viscosa y mucoide. Cuando se toca con el asa y se levanta suavemente se formará un hilo mucoso. La mayoría de los vibrios dan positiva esta prueba (Kaye *et al.*, 1994).

Ingredientes:

Desoxicolato de sodio	0.5 gr
Agua destilada	100 ml

Procedimiento:

Se colocó una gota de solución en un portaobjetos y se le añadió una azada de la colonia en estudio proveniente de agar ZoBell. Se homogeneizó bien la mezcla por un máximo de 1 minuto. La formación de un hilo viscoso al levantar el asa se registra como prueba positiva.

Algunas cepas dan esta prueba muy débilmente, por lo que se debe poner atención a este hecho.

II.5.- Crecimiento a 42 ^{0}C.

Esta prueba evalúa la capacidad de las cepas para crecer a temperaturas elevadas. La mayoría de los vibrios da positiva esta prueba.

Procedimiento:

Se sembraron cepas obtenidas de agar ZoBell, en placa múltiple (marcada en el fondo) del mismo medio, por estría continua y se incubaron a 42±0.5 ^{0}C por 48 horas.

Presencia de crecimiento abundante sobre la estría se registró como prueba positiva +, crecimiento leve se registró como prueba débilmente positiva (+).

II.6.- Crecimiento a diferente salinidad.

Se evalúa la capacidad de las bacterias para crecer a diferentes salinidades. Esta prueba es muy útil para diferenciar cepas de *Vibrio* (Ligthner, 1996). Se utilizan salinidades de 0%, 1%, 3%, 6%, 8% y 10%.

Ingredientes:

Triptona (DIFCO)	10 gr
NaCl (SIGMA)	0, 10, 30, 60, 80 ó 100 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	1000 ml

Los medios se nombran dependiendo de la cantidad de sal: T_1N_0, T_1N_1, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 y T_1N_{10}.

Preparación:

Se disuelven los ingredientes en agua destilada. Para T_1N_0 no se añade sal. Para T_1N_1, 10 gramos de sal, para T_1N_3, 30 gramos y así sucesivamente.

El medio se calienta hasta disolver completamente el agar y se esteriliza a 121 ^{0}C/15 lbs de presión por 15 minutos. El pH final del medio es 7.2±0.2. Se deja enfriar el medio hasta aproximadamente 60 ^{0}C (temperatura soportable por la mano), y se vacía entre 20-30 ml en placas de petri estériles.

Siembra y resultados: Se siembran cepas igual que en el método anterior. Las placas se incubaron a 28-30 ^{0}C por 48 horas. La presencia de crecimiento abundante en la estría se registró como respuesta positiva +. Un crecimiento leve en la estría se identificó como débilmente positivo (+).

II.7.- Gelatinasa.

Se utilizó agar gelatina para evaluar la capacidad de los organismos de producir enzimas de tipo proteolítico que licuan la gelatina (MacFaddin, 1993).

Ingredientes:

Bacto extracto de levadura	1.0 gr
Bacto peptona	4.0 gr
Gelatina	15 gr
NaCl*	20 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	1000 ml

*Cantidad de sal recomendada para bacterias marinas.

Preparación

Los ingredientes se disuelven en agua y se calienta hasta disolución total del agar. El medio se esteriliza a 121 ^{0}C/15 lbs de presión por 15 minutos. Se deja enfriar hasta aproximadamente 60 ^{0}C (soportable con la mano) y se vacían 20-30 ml en placas de petri estériles.

Siembra: Se coloca una pequeña azada de la colonia, proveniente de agar ZoBell, en forma de punto en una placa con división múltiple y se incuba a 28-30 ^{0}C por 24-48 horas.

Lectura: La prueba es positiva si se observa un halo alrededor de la colonia sembrada (hidrólisis de la gelatina). Si no existe el halo la prueba es negativa.

Nota: Se puede observar mejor el halo si las placas sembradas después de la incubación son enfriadas a 10 ^{0}C por 5-10 minutos y se observa a contraluz ó sobre una superficie oscura.

II.8.- Pruebas de las decarboxilasas.

Se evalúa la capacidad enzimática de un organismo para decarboxilar un aminoácido y formar una amina con la consiguiente alcalinidad.

La decarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas decarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH), generando una amina ó diamina y anhídrido carbónico.

Las enzimas decarboxilasas son numerosas y cada una es específica para un sustrato determinado. Las tres enzimas más importantes para identificación bacteriana son la lisina, arginina y ornitina decarboxilasas.

El aminoácido L-arginina se cataboliza a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultánea ó separadamente. Estos dos caminos son el sistema de arginina dehidrolasa y arginina decarboxilasa (MacFaddin, 1993).

Para arginina y lisina decarboxilasa se utilizó el método de Falkow (MacFaddin, 1993), que no utiliza aceite mineral para sellar el tubo. Para la ornitina decarboxilasa se empleó el medio MIO (DIFCO).

II.8.1.- Arginina y Lisina decarboxilasas:

Ingredientes:

Peptona	5 gr
Extracto de levadura	3 gr
Glucosa	1 gr
Aminoácido*	5 gr
Púrpura de bromocresol	0.02 gr
NaCl **	20 gr
Agua destilada	1000 ml

* L-lisina, L-arginina ó L-ornitina.

** Cantidad necesaria para bacterias marinas.

Preparación:

El medio se calienta ligeramente hasta disolución total. Se distribuyen 5 ml de medio en tubos de ensaye con tapón de rosca. Se esterilizan en autoclave a 121 ^{0}C/15 lbs de presión por 15 minutos.

Con este método sólo es necesario ajustar el pH para la L-ornitina a 6.8.

Siembra: Se tomó con un asa un inóculo liviano (pequeño) de la colonia en estudio proveniente de agar ZoBell y se suspendió en el medio. Se debe ajustar bien la rosca del tapón en el tubo. Se incubó por 24-48 horas a 28-30 ^{0}C, con lectura extra a los 7 días.

Es necesario preparar un tubo control sin el aminoácido.

Lectura: La respuesta es similar en cualquiera de los 3 aminoácidos. Una respuesta positiva es indicada por una coloración púrpura turbio ó púrpura amarillento (medio alcalino), mientras que una respuesta negativa es indicada por un color amarillo claro del medio (acidez, provocada por la utilización exclusiva de la glucosa).

Nota: Arginina dehidrolasa:

Cuando el desvío del indicador de pH hacia la alcalinidad es rápido y enérgico, indica que el catabolismo de la arginina se debió al sistema de la arginina dehidrolasa. Un desvío de pH lento y débil, sin formación de amoníaco (comprobado por el reactivo de Nessler), se produce cuando la L-arginina es degradada solamente por el sistema arginina decarboxilasa. Sin embargo, se ha visto que el factor tiempo no es confiable para determinar el metabolismo de la L-arginina.

II.8.2.- Ornitina decarboxilasa y movilidad:

Se evaluaron a través del medio MIO (movilidad, indol, ornitina)(DIFCO).

Ingredientes:

Bacto extracto de levadura	3 gr
Bacto peptona	10 gr
Bacto L-ornitina HCl	5 gr
Bacto dextrosa	1 gr
Bacto agar	2 gr
Bacto púrpura de bromocresol	0.02 gr

Al medio se le añadieron 20 gr/L de NaCl, para una salinidad de 2%, recomendada para bacterias marinas (Lightner, 1996).

Preparación:

Se disuelven 31 gramos de medio en 1 litro de agua destilada ó deionizada y se calienta hasta ebullición. Se distribuye el medio en porciones de 5 ml en tubos de ensaye con tapón de rosca y se esteriliza a 121 ^{0}C/15 lbs de presión por 15 minutos. No se requiere ajustar el pH.

Siembra: Se utilizó un inóculo de una cepa crecida en agar ZoBell y se sembró por picadura al fondo. Se incubó por 24-48 horas a 28-30 ^{0}C, con revisión extra a los 7 días.

Lectura: prueba positiva es indicada por una coloración púrpura turbio ha púrpura amarillento apagado, mientras que una respuesta negativa es indicada por un color amarillo claro y brillante (fermentación exclusiva de la glucosa).

Movilidad: separación del crecimiento de la cepa de la línea de punción implica movilidad positiva.

II.9.- Desplazamiento superficial (swarming).

Se evalúa la capacidad de las bacterias para formar películas superficiales en medios sólidos.

Aquí se utilizó el medio de agar ZoBell.

Siembra: Se sembraron cepas obtenidas de agar ZoBell en placas de este mismo agar con cuatro divisiones (mayor número de cepas puede provocar que se confundan cuando presentan un swarming fuerte) por medio de estría continua. Se incubó por 48 horas a 28-30 ^{0}C.

Lectura: si la cepa sembrada se desplazó desde su estría de siembra invadiendo el medio, la prueba fue positiva. Cuando la cepa no se esparció desde su inóculo la prueba fue negativa.

II.10.- Oxidación-Fermentación.

La utilización de carbohidratos por bacterias puede suceder por dos procesos: fermentación ú oxidación. Algunas bacterias son capaces de metabolizar un hidrato de carbono (manifestado por la producción de ácido) sólo en condiciones aerobias, mientras que otras producen ácido tanto aeróbica como anaeróbicamente. La fermentación es un proceso anaerobio y la oxidación, naturalmente aeróbico. Muchas bacterias pueden crecer con ambos tipos de metabolismo, y son las llamadas anaerobias facultativas.

En este trabajo se empleó la técnica de un tubo (MacFaddin, 1993) y se utilizó el medio recomendado por Hugh & Leifson (1953).

Medio base O-F (DIFCO).

Ingredientes:

Bacto triptona	2 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Fosfato dipotásico	0.3 gr
Bacto azul de bromotimol	0.03 gr
Bacto agar	2 gr
Solución de glucosa:	
Glucosa	10 gr
Agua destilada	100 ml

El cloruro de sodio del medio base se incrementó a 20 gramos.

Preparación:

Se disuelven 9.4 gramos del medio base en 1000 ml de agua destilada fría y se calienta hasta ebullición. El medio se esteriliza a 121 ^{0}C/15 lbs de presión por 15 minutos. Se dejó enfriar ha aproximadamente 60 ^{0}C (soportable con la mano) y se le agregó por filtración (Gelman Sciences, SterileAcrodisc 0.2 μm) la solución de glucosa. Se homogeneizó el medio por agitación suave. El medio, sin coagular, se distribuyó asépticamente en tubos de ensaye con tapón de rosca previamente esterilizados.

Siembra e incubación: se utilizó un cultivo proveniente de agar ZoBell, y se sembraron los tubos por picadura al fondo. Se incubaron a 30 ^{0}C por 24-48 horas con lectura extra a los 7 días

Lectura: Se observó el cambio de coloración: vire de azul-verdoso a amarillo sólo en la superficie ó cuando mucho en la mitad superior del tubo, se registra como oxidación. Color amarillo en todo el medio se evalúa como fermentación. El tubo sin vire de color es calificado como inerte (el microorganismo no utiliza la glucosa).

En este medio también se evaluó la movilidad de los microorganismos, de la misma manera que para el medio MIO.

II.11.- Luminiscencia.

Se evalúa la presencia de la enzima que contiene el gen luciferasa, para la producción de luminosidad.

La prueba se realizó con agar ZoBell.

Siembra: Se sembraron cepas provenientes de agar ZoBell, en placas divididas de este mismo agar, por medio de estría continua y se incubaron a 28-30 ^{0}C por 24-48 horas.

Lectura: La lectura de las placas se realizó en un cuarto oscuro. Se recomienda que el lector permanezca aproximadamente 5 minutos en el cuarto para adaptar su vista a la oscuridad. La presencia de luminosidad en el medio fue registrada como prueba positiva.

ANEXO B

Resumen de tabla de regresión lineal aplicada a los quistes comerciales.

Tabla BI.- Sumario de la regresión de la edad (meses) de las muestras de quistes y el porcentaje de eclosión (transformado) .

Estadística de	la regresión.

R múltiple	0.621835
R cuadrada	0.386679
R ajustada	0.352606
Error estándar	18.17623
datos	20

ANOVA					
	G.L	SC	CM	F	significancia
Regresión	1	3749.275	3749.275	11.34842	0.00342
Residual	18	5946.813	330.3785		
Total	19	9696.088			

Tabla BII.- Sumario de la regresión del porcentaje de eclosión (transformado) y el log de UFC/ml de bacterias heterótrofas viables (BHV).

Estadística de	la regresión.

R múltiple	0.263704
R cuadrada	0.06954
R ajustada	0.017848
Error estándar	22.38777
datos	20

ANOVA					
	G.L	SC	CM	F	significancia
Regresión	1	674.2646	674.2646	1.345267	0.261261
Residual	18	9021.823	501.2124		
Total	19	9696.088			

Tabla BIII.- Sumario de la regresión de la edad (meses) del total de muestras de quistes y el log de UFC/ml de bacterias heterótrofas viables (BHV).

Estadística de	la regresión.

R múltiple	0.440407
R cuadrada	0.193959
R ajustada	0.149178
Error estándar	27.27002
datos	20

ANOVA					
	G.L	SC	CM	F	significancia
Regresión	1	3221.03	3221.03	4.331357	0.051967
Residual	18	13385.77	743.6539		
Total	19	16606.8			

Tabla BIV.- Sumario de la regresión de la edad (meses) del total de muestras de quistes y el log de UFC/ml de bacterias crecidas en TCBS (BCTCBS).

Estadística de	la regresión.

R múltiple	0.761282
R cuadrada	0.57955
R ajustada	0.556192
Error estándar	19.69536
datos	20

ANOVA					
	G.L	SC	CM	F	significancia
Regresión	1	9624.469	9624.469	24.81126	9.76E-05
Residual	18	6982.331	387.9073		
Total	19	16606.8			

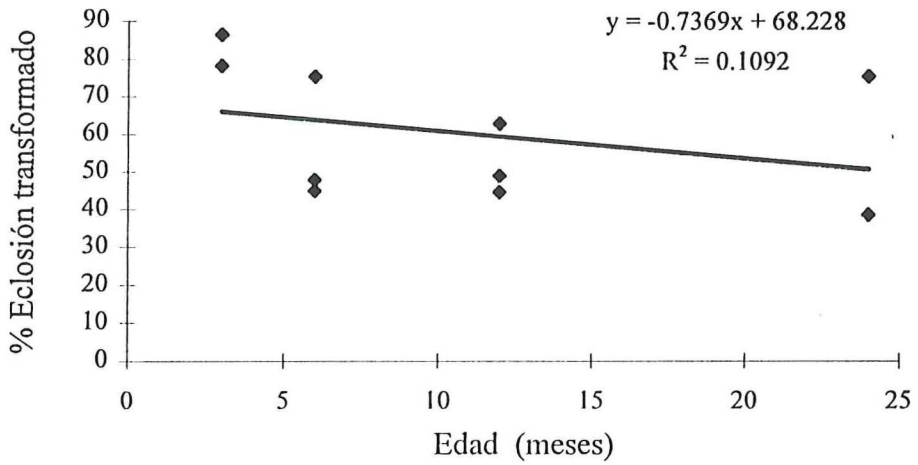

Fig. b1.- Correlación del porcentaje de eclosión y edad de quistes comerciales comprados entre 1995-1997.

ANEXO C

Caracterización de cepas bacterianas de granja camaronícola, por medio de pruebas de laboratorio.

Tabla CI.- Caracterización de cepas bacterianas aisladas de TCBS de granja camaronícola, por medio de pruebas de laboratorio independientes. A1, A2 y AA:muestras de nauplios de *Artemia franciscana*.

Pruebas	A1-1	A1-2	A1-3	A1-4	A2-8	A2-9	AA-1
Gram	–	–	–	–	–	–	–
Morfología	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	+	–	+	–	–	–	–
Crecim. a 42 °C	+	+	+	+	+	+	+
Crec. a salinid. 0 %	–	–	–	–	–	–	–
3.0 %	+	+	+	+	+	+	+
6.0 %	+	+	+	+	+	+	+
8.0 %	+	+	+	+	+	+	+
10.0 %	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+
Lisina decarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	–	–	–	–	–	–	–
Ornitina decarboxilasa	+	+	+	+	–	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+
Luminiscencia	–	–	–	–	–	–	–
Oxidación / Fermentación	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Desplazamiento	+	+	+	+	+	+	+
Color en TCBS	A	A	A	A	A	A	A

A : amarilla V: verde (+): respuesta débilmente positiva

Tabla C1.- Continuación. AA, AD: nauplios de *Artemia franciscana*, antes y después de bajar salinidad (22‰ a 0‰).

Pruebas	AA-5	AA-6	AA-10	AD-2	AD-3	AD-4	AD-5
Gram	–	–	–	–	–	–	–
Morfología	cocobacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	+	+	+	–	–	–	–
Crecim. a 42 C	+	+	(+)	+	+	+	+
Crec. a salinid.							
0 %	–	–	–	–	–	–	–
3.0 %	+	+	+	+	+	+	+
6.0 %	+	+	(+)	+	+	+	+
8.0 %	+	+	–	+	+	+	+
10.0 %	+	+	–	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+
Lisina decarboxilasa	+	+	–	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	–	–	–	–	–	–	–
Ornitina decarboxilasa	–	+	–	+	+	–	+
Movilidad	+	+	–	+	+	+	+
Luminiscencia	–	–	–	–	–	–	–
Oxidación / Fermentación	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Desplazamiento	+	+	–	(+)	(+)	(+)	(+)
Color en TCBS	A	A	V	A	A	A	A

A: colonia amarilla V: colonia verde (+): respuesta débilmente positiva

Tabla C1.- Continuación. AD: nauplios después de bajar salinidad; ATT: nauplios con tratamiento térmico (60 ^{0}C/5 min.)

Pruebas	AD-7	AD-8	AD-9	AD-10	ATT-1	ATT-3	ATT-4
Gram	–	–	–	–	–	–	–
Morfología	cocobacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	(+)	+	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	–	–	–	–	–	–	+
Crecim. a 42 ^{0}C	+	+	+	+	+	+	+
Crec. a salinid. 0 %	–	–	–	–	–	–	–
3.0 %	+	+	+	+	+	+	+
6.0 %	+	+	+	+	+	+	+
8.0 %	+	+	+	+	+	+	+
10.0 %	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	–	+
Lisina decarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	–	–	–	–	–	–	–
Ornitina decarboxilasa	–	–	+	+	–	–	–
Movilidad	–	+	+	+	+	–	+
Luminiscencia	–	–	–	–	–	–	–
Oxidación / Fermentación	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	–
Desplazamiento	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+
Color en TCBS	A	A	A	A	A	A	A

A: colonia amarilla V: colonia verde (+): respuesta débilmente positiva

Tabla CI.- Continuación. Z: agua de tanque con larvas zoea II; M, MII: agua de tanque con larvas estadio mysis.

Pruebas	ZII-6	ZII-7	ZII-9	ZII-10	M-5	MII-1	MII-4
Gram	–	–	–	–	–	–	–
Morfología	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	–	–	–	–	–	–	–
Crecim. a 42 ^{0}C	+	+	+	(+)	+	+	+
Crec. a salinid.							
0 %	–	–	–	–	–	–	–
3.0 %	+	+	+	+	+	+	+
6.0 %	+	+	+	+	+	+	+
8.0 %	+	+	+	(+)	+	+	+
10.0 %	+	(+)	(+)	–	+	(+)	(+)
Gelatinasa	+	+	+	–	+	+	+
Lisina decarboxilasa	+	+	+	–	+	+	+
Arginina dehidrolasa	–	–	–	–	–	–	–
Ornitina decarboxilasa	+	+	+	–	+	+	+
Movilidad	+	+	–	+	+	+	+
Luminiscencia	–	–	–	–	–	–	–
Oxidación / Fermentación	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Desplazamiento	+	+	+	–	+	+	+
Color en TCBS	A	A	A	A	A	A	A

A: colonia amarilla V: colonia verde (+): respuesta débilmente positiva

Tabla CI.- Continuación. PL4 : agua de tanque con postlarvas 4.

Pruebas	PL4-2	PL4-4	PL4-5	PL4-6	PL4-7	PL4-8
Gram	–	–	–	–	–	–
Morfología	cocobacilos	bacilos	bacilos	cocobacilos	cocobacilos	cocobacilos
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	–	–	–	+	–	–
Crec. a 42 ^{0}C	+	+	+	+	+	+
Crec. a salinid.						
0 %	–	–	–	–	–	–
3.0 %	+	+	+	+	+	+
6.0 %	+	+	+	+	+	+
8.0 %	+	+	+	+	+	+
10.0 %	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+
Lisina decarboxilasa	+	+	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	–	–	–	–	–	–
Ornitina decarboxilasa	+	–	+	+	+	+
Movilidad	+	–	+	+	+	+
Luminiscencia	–	–	–	–	–	–
Oxidación/ Fermentación	–	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Desplazamiento	+	+	+	+	–	+
Color en TCBS	A	A	A	A	A	A

A: colonia amarilla V: colonia verde +: respuesta positivo –: respuesta negativa (+): respuesta débilmente positiva

Tabla CII.- Caracterización de la colección de cepas de *Vibrio* obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) con pruebas independientes. En paréntesis número de la cepa.

Pruebas	*V alginolyticus* (17749)	*V. campbelli* (25920)	**V. cholerae no O1* (SO-116)	*V. damsela* (33539)	*V. fisheri* (7744)	*V. fluvialis* (33809)	*V. harveyi* (14126)
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	+	+	+	+	+	+	+
Crec. a 42 °C	+	–	+	+	–	+	(+)
Crec. a salin. 0 %	–	–	+	–	–	+	–
1.0 %	+	+	+	+	+	+	–
3.0 %	+	+	(+)	+	+	+	+
6.0 %	+	(+)	–	–	–	+	+
8.0 %	+	–	–	–	–	+	–
10.0 %	+	–	–	–	–	(+)	–
Gelatinasa	+	+	+	–	–	+	+
Lisina decarboxilasa	+	–	+	–	+	–	+
Arginina dehidrolasa	–	–	–	+	–	+	–
Ornitina decarboxilasa	+	–	+	–	–	–	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+
Luminiscencia	–	–	–	–	+	–	+
Oxidación / Fermentación	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Desplazamientog	+	+	–	–	–	–	–
Color en TCBS	amarillo	verde	amarillo	verde	verde	amarillo	amarillo

+: respuesta positiva –: respuesta negativa (+): respuesta débilmente positiva

*: no pertenece a la ATCC.

Tabla CII.- Continuación.

Pruebas	*V. metschnikovii* (7708)	*V. mimicus* (33653)	*V. parahaemolyticus* (17802)	*V. pelagius* (25916)	*V. proteolyticus* (15338)	*V. vulnificus* (27562)
Oxidasa	–	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Desoxicolato de sodio	+	+	+	+	+	+
Crec. a 42 ^{0}C.	(+)	+	+	–	+	+
Crec. a salin. 0 %	(+)	+	–	–	–	–
1.0 %	+	+	+	+	+	+
3.0 %	+	+	+	+	+	+
6.0 %	+	(+)	+	+	+	–
8.0 %	(+)	–	+	+	+	–
10.0 %	–	–	–	–	+	–
Gelatinasa	+	+	+	–	+	+
Lisina decarboxilasa	+	+	+	–	+	+
Arginina dehidrolasa	+	+	–	–	+	–
Ornitina decarboxilasa	–	+	+	–	–	+
Movilidad	+	+	–	+	–	+
Luminiscencia	–	–	–	–	–	–
Oxidación / Fermentación	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Desplazamiento	–	–	–	–	+	–
Color en TCBS	verde	verde	verde	amarillo	verde	verde

+: respuesta positiva –: respuesta negativa (+): respuesta débilmente positiva