

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

Supervivencia de *Artemia franciscana* en cocultivo con *Vibrio campbellii* y *Nitzschia thermalis* f. *kurta*

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Dalia Azucena Verde Inzunza

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Dalia Azucena Verde Inzunza

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirectora de tesis

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas
Codirectora de tesis

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Dalia Azucena Verde Inzunza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Supervivencia de *Artemia franciscana* en cocultivo con *Vibrio campbellii* y *Nitzschia thermalis* f. *kurta*

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirectora de tesis

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas
Codirectora de tesis

La acuicultura es uno de los sectores más importantes y de mayor producción alimentaria. Sin embargo, se ve afectada por enfermedades bacterianas como la vibriosis, la cual puede ocasionar pérdidas totales en los cultivos. El método más utilizado para controlar la vibriosis es el uso de antibióticos, lo cual ha contribuido al desarrollo de cepas bacterianas resistentes. Por ello, se buscan medios de control naturales para inhibir el crecimiento de *Vibrio*, como el uso de aguas verdes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de *Nitzschia thermalis* f. *kurta* en la concentración de *V. campbellii* y en la supervivencia de nauplios de *Artemia franciscana* al estar en cocultivo. Se realizó un bioensayo de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*. Se mantuvieron cultivos monoespecíficos, no axénicos y por triplicado en medio "F" con una densidad celular de 250,000 cél. mL⁻¹ de *N. thermalis*. Los cultivos fueron inoculados con una concentración inicial de 1 x10⁵ *V. campbellii* mL⁻¹ y una densidad de 1 nauplio de *A. franciscana* mL⁻¹. Para cada tratamiento se evaluó la densidad celular de *N. thermalis*, conteo de bacterias heterotróficas, cuantificación de la concentración de *V. campbellii* y la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* durante 5 días. Se obtuvo una supervivencia promedio de 55% de nauplios de *A. franciscana* al estar en cocultivo con *N. thermalis*. Mientras que el tratamiento control sin la presencia de *N. thermalis* obtuvo una supervivencia de nauplios de *A. franciscana* del 0%. El contenido de bacterias heterotróficas se presentó en todos los tratamientos en un orden de magnitud de 10⁶ UFC mL⁻¹, lo cual nos indica que el efecto inhibitorio de *N. thermalis* es específico para *V. campbellii*. La concentración de *V. campbellii* disminuyó a 53 *V. campbellii* mL⁻¹ al día 5 en el cocultivo de *V. campbellii* con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*. Se concluye que *N. thermalis* tiene un efecto inhibitorio contra *V. campbellii* y brinda protección a los nauplios de *A. franciscana* en cocultivo con *V. campbellii*.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, *Vibrio campbellii*, inhibición, *Nitzschia thermalis*.

Abstract of the thesis presented by **Dalia Azucena Verde Inzunza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Survival of *Artemia franciscana* in coculture with *Vibrio campbellii* and *Nitzschia thermalis* f. *kurta*

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Thesis co-director

Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas
Thesis co-director

Aquaculture is one of the most important sectors with the highest food production. However, it is affected by bacterial diseases such as vibriosis, which can cause total crop losses. The most used method to control vibriosis is antibiotics, which have contributed to the developing of resistant bacterial strains. For this reason, natural control means are sought to inhibit *Vibrio* growth, such as using green water. This work aimed to evaluate the inhibitory effect of *Nitzschia thermalis* f. *kurta* in the concentration of *V. campbellii* and the survival of *Artemia franciscana* nauplii when in coculture. An inhibition bioassay of *V. campbellii* was carried out in coculture with *N. thermalis* and nauplii of *A. franciscana*. Monospecific, non-axenic cultures were maintained in triplicate in “f” medium with a cell density of 250,000 cells mL⁻¹ of *N. thermalis*. The cultures were inoculated with an initial concentration of 1 x10⁵ *V. campbellii* mL⁻¹ and a density of 1 nauplius of *A. franciscana* mL⁻¹. For each treatment, the cell density of *N. thermalis*, count of heterotrophic bacteria, quantification of the concentration of *V. campbellii*, and the survival of *A. franciscana* nauplii were evaluated for 5 days. Was obtained an average survival of 55% of *A. franciscana* nauplii when cocultured with *N. thermalis*. In contrast, the control treatment without the presence of *N. thermalis* obtained a survival of *A. franciscana* nauplii of 0%. The content of heterotrophic bacteria was present in all treatments in order of magnitude of 10⁶ CFU mL⁻¹, which indicates that the inhibitory effect of *N. thermalis* is specific to *V. campbellii*. The concentration of *V. campbellii* decreased to 53 *V. campbellii* mL⁻¹ on day 5 in the co-culture of *V. campbellii* with *N. thermalis* and *A. franciscana* nauplii. It is concluded that *N. thermalis* has an inhibitory effect against *V. campbellii* and provides protection to *A. franciscana* nauplii in coculture with *V. campbellii*.

Keywords: *Artemia franciscana*, *Vibrio campbellii*, inhibition, *Nitzschia thermalis*.

Dedicatoria

Con gran amor y cariño esta tesis se la dedico a mi madre Norma Isela Inzunza y mi padre Rafael Verde Ángel (+) por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, Los amo son mis motores.

A mis hermanos Mariana, Rafael, Diana y a mi sobrina Ana Camila por no dejarme caer nunca, estar conmigo en todo momento y hacerme ver siempre lo capaz que soy para hacer las cosas. Los amo con toda mi vida.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca de manutención para la realización de mis estudios de Posgrado en Ciencias en Acuicultura.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por aceptarme en la institución para realizar mis estudios de Posgrado de Ciencias en Acuicultura.

Al Departamento de Acuicultura, por brindarme la oportunidad de tener nuevos conocimientos en un área que era nueva para mí, por permitirme desarrollarme como persona y profesionalmente.

A mi codirectora de tesis, la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por aceptarme como su alumna, y brindarme el honor de ser su estudiante. Gracias por confiar en mí e impulsarme a ser mejor estudiante y persona. Gracias por todo el tiempo, conocimiento, risas y llantos compartidos, por no dejar que me rindiera nunca y sacar lo mejor de mí. A mi codirectora de tesis, la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas por aceptar ser parte de este proyecto y compartir su conocimiento conmigo, gracias por siempre tener un tiempo para escucharme o explicarme cuando no entendía. Gracias por aceptarme como su hija adoptiva e impulsarme siempre a ser mejor estudiante y persona. No existen palabras para describir lo agradecida y bendecida que fui por tener a dos grandes mujeres dirigiéndome académicamente en esta travesía llamada maestría, GRACIAS INFINITAS A AMBAS.

A los miembros de mi comité de tesis:

Al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por formar parte de mi comité y por todos sus consejos otorgados en cada avance de tesis y por sus clases de nutrición que fueron de mis favoritas durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, por formar parte de mi comité y por la buena retroalimentación en cada avance, gracias por sus preguntas capciosas que me hacían ampliar mis conocimientos buscando una respuesta a ellas. Gracias por la donación de la cepa de *V. campbellii*.

A cada uno de los profesores que tuve durante el primer año de mis estudios de maestría, por los conocimientos brindados, el tiempo dedicado y sobre todo por permitirme establecer las bases del conocimiento que pude imprimir en el desarrollo de esta tesis.

Agradecimientos especiales a la Dra. Ceres Molina por apoyarme dentro del laboratorio con todos los bioensayos realizados en este trabajo, sin duda este trabajo no hubiera salido sin su ayuda y su valioso tiempo invertido en mi aprendizaje.

Al Dr. Misael Rosales Leija, al Dr. Benjamín Barón Sevilla, la M. en C. Yanet Guerrero Rentería y el M. en C. Abelardo Campos Espinoza por el material prestado para la realización de algunos de los bioensayos de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Elizabeth Avilés Becerril por todo su apoyo en las observaciones y correcciones en biblioteca.

A mi prima Solangel Baez Inzunza por abrirme las puertas de su casa, su vida y su familia. Gracias por estar conmigo y apoyarme siempre que llegaba cansada o fastidiada. Por esas noches de pláticas de la vida, por ayudarme a ser la persona que soy ahora, por darme la oportunidad de compartir tiempo y ver cómo va creciendo Maya Sofia (mi cachorra). Sin duda esto no hubiera sido igual si no las tuviera aquí conmigo, las amo.

A mi madre, Norma Isela Inzunza (mi Normita) por siempre apoyarme en todas mis locuras. Te debo absolutamente todo, no hay palabras para expresar lo agradecida que estoy contigo. Gracias por hacerme creer que puedo hacer todo y cumplir cada uno de mis sueños. Te amo mi Normita.

A mi padre, Rafael Verde Ángel, descanse en paz, por acompañarme cada noche de desvelo y aparecer en mis sueños dándome un abrazo y diciéndome lo orgulloso que estas de mí. Se lo feliz que estarías de ver a tu homerunsito realizando este gran sueño. Te amo gordito gracias donde quiera que estés.

A mis hermanos Mariana, Rafael y Diana, gracias por su apoyo incondicional sin ustedes para guiarme no sería lo mismo, soy tan afortunada de tenerlos como hermanos. Gracias por decirme lo orgullosos que están de mí y apoyarme cuando más lo necesito. Son mi ejemplo a seguir los amo.

A mi sobrina Ana Camila, que me impulsa a superarme y ser mejor persona, para poder compartir con ella mis conocimientos y poder sembrar en ella el gusto por hacer lo que ama.

A mi familia, en especial a mis tíos Alba Inzunza, Gabriela Cervantes, Abelardo Montes, Ángel Humberto y mi primo favorito Javier Cervantes por siempre estar al pendiente de mí y sé que puedo contar con cada uno de ellos en cualquier momento.

A Martín Cervantes, quien fue pieza clave de este logro. Gracias por acompañarme durante mis noches de desvelos, apoyarme con trabajos, pero sobre todo por alentarme a seguir adelante cada que sentía que ya no podía. Gracias por escucharme y darme esa confianza que necesitaba. Este logro también es tuyo gracias por hacerme crecer como persona, sé que estarás muy contento de que lo logre. Siempre te querré gracias infinitas chiqui.

A mis niñas lab. Noelia, Ceci, Marce, Mayra, Fati, Ceres por todos los momentos juntas, las risas, los chismes, los momentos serios. ¡¡Sin su amistad esta etapa no sería lo mismo las amooo!!

A mis compañeros de laboratorio, Armando, Marce, José Manuel, Noelia, Fati, gracias por hacer mi estancia en el laboratorio muy agradable, por las risas compartidas. Perdón por culturizarlos con la música sinaloense, yo sé que les encantaba que les pusiera corridos, aunque ustedes digan que no, gracias por aguantarme y demostrarme siempre su apoyo. Los quiero mucho chicos.

A mis amigas de la maestría, Estefanía Murillo y Jocelyne García, ¡¡Gracias por estos dos años de risas, estrés, llantos y cervezas las quiero muchooo!!

A Ulises Ortega gracias por todo lo compartido, me enseñaste tantas cosas que no podría describir. Gracias por las risas, los llantos, los momentos divertidos y no tan divertidos que pasamos juntos. Gracias por todo tu apoyo en los momentos que más necesitaba, sin duda eres esa amistad que deseo conservar. Tk luser.

A mi Psic. Alfredo Blancarte, gracias por llegar a mi vida cuando más hundida estaba, no podría haber logrado esto sin todas tus herramientas. Gracias infinitas.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación.....	6
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	9
2.1 Estandarización de metodologías y ensayos preliminares.....	9
2.1.1 Origen de la cepa de diatomea <i>Nitzschia thermalis</i> f. <i>kurta</i>	9
2.1.2 Mantenimiento rutinario de la cepa.....	9
2.1.3 Cuantificación del crecimiento de <i>N. thermalis</i>	9
2.1.4 Origen y cultivo de <i>Vibrio campbellii</i>	10
2.1.5 Preparación de inóculo de <i>V. campbellii</i>	10
2.1.6 Inhibición de <i>V. campbellii</i> en cocultivo con <i>N. thermalis</i>	11
2.1.7 Conteo de <i>V. campbellii</i> y bacterias heterotróficas.....	11

2.1.8 Efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en la solución salina para los inóculos de <i>Vibrio</i>	12
2.1.9 Bioensayo de alimentación de <i>Artemia franciscana</i> con <i>N. thermalis</i>	12
2.1.10 Efecto de la aireación en el crecimiento de <i>V. campbellii</i>	14
2.2 Bioensayo final	15
2.2.1 Retos de inhibición de <i>V. campbellii</i> en cocultivo con <i>N. thermalis</i> y nauplios de <i>A. franciscana</i>	15
2.3 Análisis estadístico	16
Capítulo 3. Resultados	17
3.1 Estandarización de metodología y ensayos preliminares	17
3.1.1 Caracterización de curva de crecimiento de <i>N. thermalis</i>	17
3.1.2 Bioensayo de alimentación de nauplios de <i>A. franciscana</i> con <i>N. thermalis</i>	18
3.1.3 Efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en la solución salina para los inóculos de <i>Vibrio</i>	20
3.1.4 Efecto de la aireación en el crecimiento de <i>V. campbellii</i>	21
3.2 Experimentación final	23
3.2.1 Retos de inhibición de <i>V. campbellii</i> en cocultivo con <i>N. thermalis</i> y nauplios de <i>A. franciscana</i>	23
Capítulo 4. Discusión.....	28
4.1 Estandarización de metodología y ensayos preliminares	28
4.1.1 Crecimiento de <i>N. thermalis</i>	28
4.1.2 Efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en la solución salina para los inóculos de <i>V. campbellii</i>	29
4.1.3 Bioensayo de alimentación de nauplios de <i>A. franciscana</i> con <i>N. thermalis</i>	30
4.1.4 Efecto de la aireación en el crecimiento de <i>V. campbellii</i>	31
4.2 Bioensayo final de inhibición de <i>V. campbellii</i> en cocultivo de <i>N. thermalis</i> y nauplios de <i>A. franciscana</i>	32

4.2.1 Cocultivo de <i>V. campbellii</i> con <i>N. thermalis</i> y nauplios de <i>A. franciscana</i>	32
4.2.2 Retos de inhibición de <i>V. campbellii</i> en cocultivo con <i>N. thermalis</i> y nauplios de <i>A. franciscana</i>	33
4.2.3 Supervivencia de nauplios de <i>A. franciscana</i> en cocultivo con <i>N. thermalis</i> y <i>V. campbellii</i> ...	37
Capítulo 5. Conclusiones	40
Capítulo 6. Recomendaciones	41
Literatura citada	42
Anexos	50

Lista de figuras

Figura	Página
1. Caracterización del crecimiento de <i>N. thermalis</i> A) Conteos celulares; B) Densidad óptica; C) pH de cultivos mantenidos en matraz Erlenmeyer.....	17
2. Crecimiento de <i>N. thermalis</i> en cocultivo con <i>A. franciscana</i> . Análisis de varianza de 2 vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a>b>c>d$. diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A>B>C$	18
3. Disponibilidad de células de <i>N. thermalis</i> por nauplio de <i>A. franciscana</i> . Análisis de varianza de 2 vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a>ab>>b$. Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A>B$	19
4. Densidad de <i>A. franciscana</i> en cocultivo con <i>N. thermalis</i> . Análisis de varianza de 2 vías y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a>b>c$. Las diferente diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A>B$	19
5. Concentración de <i>V. campbellii</i> en solución salina preparado con 8.9 g de NaCl L ⁻¹ sembrado a las diluciones 10 ⁻¹ , 10 ⁻² y 10 ⁻³	20
6. Concentración de <i>V. campbellii</i> en solución salina preparado con 25 g de NaCl L ⁻¹ sembrado a las diluciones 10 ⁻² y 10 ⁻³ . Se realizó una prueba t de Student para cada tiempo. Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre diluciones, donde: $A>B$	21
7. Curvas de crecimiento de <i>N. thermalis</i> en los distintos tratamientos experimentales del reto de inhibición de <i>V. campbellii</i> . Los tratamientos corresponden a: <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> con aireación (NAVA) y <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> sin aireación (NAV). Análisis t de Student y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A>B$	22
8. Densidad de nauplios de <i>A. franciscana</i> en los distintos tratamientos experimentales del reto de inhibición de <i>V. campbellii</i> . Los tratamientos corresponden a: <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> con aireación (NAVA) y <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> sin aireación (NAV). Análisis t de Student y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A>B$	22
9. Curvas de crecimiento de <i>V. campbellii</i> en los distintos tratamientos experimentales del reto de inhibición de <i>V. campbellii</i> . Los diferentes tratamientos corresponden a: <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> con aireación (NAVA), <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> sin aireación (NAV), <i>V. campbellii</i> en medio "f" con aireación (VFA) y <i>V. campbellii</i> en medio "f" sin aireación (VF). Análisis de varianza de 1 vía y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos por día, donde: $A>B>C$	23

10. Reto de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *A. franciscana* y *N. thermalis*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: Nauplios de *A. franciscana* (■), *V. campbellii* (▲) *V. campbellii* en medio "F" (▲), Bacterias heterotróficas (◆) y células de *N. thermalis* (●). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos por día, donde: A>B>C>D. 25
11. Fotografía de la distribución de sensidiscos impregnados a distintas concentraciones del antibiótico ciprofloxacina (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y agua destilada como control contra *V. campbellii*. 51
12. Fotografía de los halos de inhibición del antibiótico ciprofloxacino a concentraciones (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra *V. campbellii*. 51
13. Crecimiento de *N. thermalis* en cocultivo *A. franciscana*. Análisis de varianza de 1 vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: a>b>c. 52
14. Supervivencia de *A. franciscana* en cocultivo con *N. thermalis*. Análisis de varianza de 1 vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: a>b>c. 52
15. *V. campbellii* en suero fisiológico preparado con 25 g NaCl L⁻¹ de agua destilado sembrado en TCBS en la dilución 10⁻³. Resultados a las 0+1 h. 53
16. Reto de inhibición de *N. thermalis* contra *V. campbellii*. Los datos muestran los valores de *V. campbellii* (■) y bacterias heterotróficas (◆) cocultivadas con *N. thermalis* 55

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Descripción de los tratamientos y controles experimentales del reto de inhibición de <i>V. campbellii</i> en cocultivo con <i>N. thermalis</i> y nauplios de <i>A. franciscana</i>	15
2. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular de <i>N. thermalis</i> (cel mL ⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los cuatro tratamientos corresponden a: <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> (NAV), <i>N. thermalis</i> en medio "f" (NF), <i>N. thermalis</i> y <i>V. campbellii</i> (NV) y <i>N. thermalis</i> y <i>A. franciscana</i> (NA). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey en donde A>B>C. n=3	26
3. Valores promedio y desviación estándar de la densidad de <i>A. franciscana</i> (nauplio mL ⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los tres tratamientos corresponden a: <i>N. thermalis</i> y <i>A. franciscana</i> (NA), <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> (AV) y <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> (NAV). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey en donde A>B>C. n=3	26
4. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de <i>V. campbellii</i> (<i>V. campbellii</i> mL ⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los cuatro tratamientos corresponden a: <i>V. campbellii</i> en medio "f" (VF) <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> (NAV), <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> (AV) <i>N. thermalis</i> y <i>V. campbellii</i> (NV). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey en donde A>B>C. n=3	27
5. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de bacterias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los cinco tratamientos corresponden a: <i>N. thermalis</i> en medio "f" (VF), <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> (NA), <i>N. thermalis</i> , <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> (NAV), <i>A. franciscana</i> y <i>V. campbellii</i> (AV) y <i>N. thermalis</i> y <i>V. campbellii</i> (NV). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey en donde A>B>C>D. n=3	27

Capítulo 1. Introducción

La acuicultura es el conjunto de actividades para el cultivo y producción de organismo acuáticos, tales como peces, reptiles, anfibios, crustáceos, algas y microalgas empleados para la alimentación y conservación (FAO, 2020). En la actualidad la acuicultura es uno de los sistemas de producción alimentaria de mayor crecimiento en el mundo y, de acuerdo con reportes de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, por sus siglas en inglés), en el año 2020 la producción acuícola mundial alcanzó la cifra de 122.6 millones de toneladas (FAO, 2022).

Los crustáceos son el producto acuícola que más ha incrementado su producción y venta debido a su gran valor nutricional y calidad de la carne. Por estas razones, los cultivos de cangrejos, camarón y langostas, conforman uno de los recursos acuícolas de mayor importancia alimenticia y económica en el mundo (FAO, 2020). Sin embargo, la industria acuícola se ha visto afectada por el surgimiento de microorganismos patógenos tales como: virus, hongos, protozoarios y bacterias (Defoirdt *et al.*, 2006). Entre las enfermedades que más afectan al sector acuícola destaca la vibriosis, la cual es causada por bacterias del género *Vibrio*. Este tipo de bacterias se distinguen por estar presentes de forma natural en el medio marino, son bacterias motiles, que requieren de la presencia de cloruro de sodio para su desarrollo y mantenimiento del balance osmótico (Austin y Zhang, 2006). Se ha visto que una concentración de cloruro de sodio de 2.5% mejora el crecimiento en *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* (Castellanos-Ibarra, 2023). Además, son organismos oportunistas, que aprovechan cambios en la calidad de agua, alta cantidad de materia orgánica y bajas concentraciones de oxígeno disuelto para proliferar (Thompson *et al.*, 2004). Hasta el momento, se desconoce el efecto del suministro de aireación en el crecimiento de bacterias tipo *Vibrio*. La enfermedad por vibriosis es una de las más dominantes en la acuicultura y es responsable de la mortalidad en el cultivo de peces, crustáceos y moluscos de todo el mundo (Farisa *et al.*, 2019).

Las especies de bacterias *Vibrio campbellii* y *Vibrio harveyi* son algunos de los patógenos bacterianos más importantes en acuicultura. La mayoría de los organismos acuícolas en cultivo pueden verse afectados por este tipo de bacterias, sin embargo, los problemas más graves se han reportado en cultivos de camarones peneidos, lo que tiene como consecuencia, una limitación en la producción de camarones en América del Sur y Asia (Defoirdt *et al.*, 2007). Por lo tanto, la presencia de bacterias del género *Vibrio* en los sistemas de cultivo acuícola ha sido una preocupación constante para la industria debido a su capacidad de causar enfermedades graves en una amplia variedad de organismos.

La aparición de cepas bacterianas como *Vibrio harveyi* y *Vibrio carchariae* en un cultivo acuícola afectan gravemente los cultivos de peces e invertebrados marinos, en particular camarones peneidos. En peces las enfermedades que provocan son vasculitis, gastroenteritis y lesiones oculares, en tanto que en camarones está asociada a vibriosis luminiscentes. Debido a la alta patogenicidad de bacterias del género *Vibrio* pueden causar altas mortalidades en los cultivos, lo que refleja pérdidas económicas relacionadas a la baja producción y los costos de los tratamientos (Austin y Zhang, 2006).

Una de las vías más comunes de transmisión de enfermedades en cultivos acuícolas es mediante el uso de animales acuáticos congelados o vivos infectados, como alimento (USDA, 2011). Diversas especies de bacterias del género *Vibrio* están comúnmente asociadas a los quistes de *Artemia*, por lo que es frecuente que durante la eclosión de los quistes estas bacterias proliferen y se conviertan en un riesgo sanitario para los organismos que se alimentan de *Artemia* (López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001).

Los quistes de *Artemia* tienen una alta proporción de bacterias *Vibrio*, la cual alcanza un 90% de las bacterias cultivables asociadas al nauplio, incluyendo especies como *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* (Gómez-Gil *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos autores sugieren que las condiciones durante la incubación y los compuestos liberados por los quistes ayudan a la propagación de vibrios, debido a que la proporción de vibrios cultivables presentes en los quistes antes de ser incubados es menor al 2% (Austin y Allen, 1982; López-Torres y Lizárraga-Partida, 2001; Quiroz-Guzmán, 2013).

Los nauplios de *A. franciscana* son ampliamente utilizados para la alimentación en los primeros estadios larvarios de especies acuáticas, esto es debido a su valor nutricional que se puede modificar para que el contenido de aminoácidos y ácidos grasos esenciales sea el requerido en las primeras etapas de vida de peces y crustáceos (Cisneros y Vinatea, 2009).

Debido a la problemática que representa el surgimiento de enfermedades infecciosas en la acuicultura, es importante implementar medidas profilácticas. El uso de antibióticos se ha implementado por muchos años como una estrategia de control microbiano en el cultivo de larvas. Sin embargo, el uso continuo de estos productos ha causado problemas ambientales como cambio en el metabolismo de las colonias microbianas naturales y alteraciones en los ciclos biogeoquímicos en los organismos (Holmström *et al.*, 2003). Además, el uso indiscriminado de antibióticos ha derivado en el surgimiento y la propagación de cepas bacterianas resistentes (Kokou *et al.*, 2012).

Debido a que el uso de antibióticos genera afectaciones ambientales en los cultivos acuícolas, se han realizado investigaciones para sustituir o eliminar el uso de antibióticos y con ello lograr una disminución del impacto de estos productos (Kokou *et al.*, 2012). Investigaciones recientes se han enfocado en el desarrollo de estrategias para la inhibición de bacterias del género *Vibrio*. Estas estrategias incluyen el uso de metabolitos, como los inhibidores del censado de quorum, así como la utilización de extractos de productos naturales con propiedades antimicrobianas.

Una de las técnicas utilizadas para la prevención de la aparición de bacterias patógenas es la inclusión de microalgas en los cultivos, también llamado como cultivo con agua verde. Un sistema de cultivo de agua verde es una técnica innovadora en la que los organismos son cultivados en agua donde crecen abundantemente microalgas (Tendencia *et al.*, 2004). Aún no se ha establecido el principio detrás del éxito de la técnica de cultivo en agua verde, sin embargo, en un estudio realizado por Tendencia y de la Peña (2003), afirman que el sistema de aguas verdes es un método alternativo potencial en el control de poblaciones de bacterias luminosas en camarones, además de tener un bajo costo económico, ser fácil de administrar y ser amigable con el medio ambiente. También mencionan que es posible que las bacterias productoras de ácido láctico tengan un efecto inhibitor sobre las bacterias luminosas.

Las microalgas pueden vivir en diversidad de ambientes y han desarrollado estrategias de supervivencia por lo cual producen compuestos con estructuras químicas nobles y que pueden ser utilizados como antibióticos. El prometedor uso de las microalgas y la producción de compuestos que pueden ser utilizados como antibióticos naturales contra infecciones bacterianas en acuicultura. Lo anterior, podría contribuir a la demanda del productor acuícola para evitar el uso de químicos, lo que respalda una acuicultura sostenible, además de ser respetuoso con el medio ambiente (Falaise *et al.*, 2016).

1.1 Antecedentes

Las bacterias del género *Vibrio* son Gram negativo, pueden presentarse en forma de bacilos rectos o curvos, son anaerobias facultativas, con tamaño de 1.4 a 2.6 micras de longitud y requieren sal para su crecimiento adecuado (Bradford *et al.*, 1994). Este tipo de bacterias se encuentran en ambientes marinos y están fuertemente relacionadas con la mayoría de las infecciones bacterianas en cultivos de camarón (Lightner, 1993). Las bacterias del género *Vibrio* degradan la materia orgánica, regulando el carbono orgánico disuelto a niveles tróficos superiores en la cadena trófica marina (Ina-Salwany *et al.*, 2019). Las

especies *Vibrio harveyi* y *Vibrio campbellii* han sido las especies más reportadas causantes de enfermedades en estadios larvales de camarón (Gómez-Gil, 2004).

Las bacterias del género *Vibrio* pueden infectar una gran variedad de huéspedes, se dice que son las bacterias más comunes y dañinas para el camarón provocando mortalidades masivas en su cultivo (Falaise *et al.*, 2016). Las bacterias tipo *Vibrio* en especies como el camarón, pueden estar presentes en bajas concentraciones, sin embargo, cuando el sistema inmune del camarón se encuentra débil las bacterias alcanzan altas concentraciones y esto puede causar la muerte del organismo (Defoirdt *et al.*, 2011).

Existe una constante investigación para eliminar o limitar el uso de antibióticos, debido a que el uso prolongado o indebido de ellos puede provocar la propagación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Holmström *et al.* (2003), investigaron que 76 granjas de cultivo de camarón entrevistadas en Tailandia, 56 de ellas utilizaban antibióticos, más de 10 tipos de antibióticos diferentes fueron utilizados y cada productor tenía una manera distinta de suministrarlos. El uso de antibióticos en la acuicultura dependerá de las regulaciones de cada país, sin embargo, una gran proporción de la producción acuícola mundial tiene lugar en países que tienen regulaciones nulas o limitadas (Defoirdt *et al.*, 2011).

Charoonart *et al.* (2018) hicieron una revisión de las aplicaciones potenciales de la tecnología de microalgas en el control de enfermedades que causan pérdidas en los cultivos acuícolas, las cuales tienen su agente etiológico en bacterias pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Los autores destacan la importancia de las microalgas al ser una fuente de alimento para alevines de peces y larvas de crustáceos proporcionándoles un alto contenido de proteínas, lípidos y nutrientes esenciales.

Las microalgas son la base de la cadena alimentaria en los ecosistemas acuáticos utilizar agua, dióxido de carbono y energía solar para sintetizar compuestos orgánicos que son secretados como metabolitos primarios o secundarios, los cuales las hacen acreedoras de un potencial único como actores en la biotecnología azul (Pradhan *et al.*, 2014). Además de ser un aporte de alimento, las microalgas poseen compuestos antimicrobianos e inmunoestimulantes naturales que pueden reducir el uso de antibióticos en cultivos masivos. Las investigaciones de ingeniería genética en microalgas, han hecho posible el desarrollo de nuevas cepas que pueden servir como aditivos nutricionales, proporcionando una nutrición natural y efectos benéficos como el control de enfermedades (Defoirdt *et al.*, 2011; Kaur-Kahlon *et al.*, 2021).

Se ha encontrado que un gran número de extractos de microalgas tienen actividad antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica y anti protozoaria). Las diatomeas poseen actividad antimicrobiana contra una amplia gama de especies bacterianas, sin embargo, la diversidad de especies de diatomeas estudiada es limitada. Bajo este contexto, las cianobacterias han sido las más estudiadas para obtener de ellas antibióticos y compuestos farmacológicamente activos. A pesar de esto, la mayoría de los principios activos presentes tanto en cianobacterias como en diatomeas aún se desconocen (Borowitzka, 1995; Defoirdt *et al.*, 2011; Soto-Rodríguez *et al.*, 2022).

Se han realizado estudios donde se ha demostrado que las microalgas tienen un efecto inhibitorio sobre *Vibrio* spp. García-Lagunas *et al.* (2008) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos de especies de cianobacterias contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, siendo *Oscillatoria* sp. y *Lyngbya* sp. quienes tuvieron un mayor halo de inhibición para las cepas de *Vibrio* probadas. Austin y Day (1990) encontraron que un extracto acuoso de *Tetraselmis suecica* produce zonas de inhibición en un ensayo contra *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, sin embargo, se desconoce el mecanismo responsable de la inhibición.

En el año 2010, González-Davis reportó que extractos acuosos de la Primnesiophyceae *Isochrysis* sp. presentaron una inhibición en el crecimiento de *V. campbellii*, además de no presentar efectos tóxicos contra nauplios de *A. franciscana*.

Kokou *et al.* (2012) probaron el efecto antibacteriano de cinco especies de microalgas (*Chlorella minutissima*, *Tetraselmis chui*, *Nannochloropsis* sp., *Arthrospira platensis* e *Isochrysis* sp.) contra seis especies de bacterias *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. scopthalmi*, *V. alginolyticus* y *V. lentus*). Se observó que en todos los cultivos de las especies de microalgas antes descritas se presentó un efecto inhibitorio del crecimiento de los vibrios estudiados, sin embargo, las cepas bacterianas *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* mostraron mayor resistencia a la actividad antibacteriana de las especies de microalgas analizadas.

Se realizó un estudio evaluando el efecto inhibitorio de *Isochrysis galbana* contra cuatro especies de *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, y *V. parahaemolyticus*). El experimento se realizó en cultivos de medio líquido y para cuantificar la densidad de *Vibrio* se utilizaron placas con medio Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa (TCBS). Se encontró que, las especies *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, y *V. harveyi* fueron inhibidas por *I. galbana*, sin embargo, *V. parahaemolyticus* no pudo ser inhibido (Molina-Cárdenas *et al.*, 2014). Los autores mencionan que *Isochrysis galbana* es una especie de microalga que produce altas cantidades de

ácidos grasos de cadena corta, los cuales son liberados cuando las células se lisan y podrían funcionar como compuestos responsables del efecto inhibitorio. Sin embargo, estos autores antes mencionados sugieren más estudios para comprobar que los ácidos grasos son liberados al medio por lisis celular o bien por productos del metabolismo.

El crecimiento de la especie de bacteria patógena *Vibrio cholerae* fue inhibido por la especie de microalga *Isochrysis galbana*, teniendo como consecuencia, una alteración en los niveles de ácidos grasos de las células de *Isochrysis galbana* y un incremento en la producción de ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3), ácido gamma-linolénico (C18:3n6), ácido eicosatrienóico (C20:3n-3) y ácido eicosatetraenóico (C20:4) Molina-Cárdenas *et al.*, 2020). En otros trabajos se ha demostrado que estos ácidos grasos tienen actividad antimicrobiana (Defoirdt *et al.*, 2006; Desbois *et al.*, 2011).

Ayala-García, 2021 evaluó el efecto inhibitorio de *N. thermalis* f. *kurta* y *Navicula* cf. *subinflatooides* contra *V. campbellii*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi* al mantenerse en cocultivo para cada especie. El reto de inhibición se realizó con una concentración de 1×10^2 Vibrios mL⁻¹. En este trabajo la densidad de *V. campbellii* fue evaluada mediante filtración y simbra en medio TCBS, sin embargo, no fue corroborada por medio de conteos en placa después de la inoculación. *N. subinflatooides* y *N. thermalis* inhiben el crecimiento de las tres especies de *Vibrio* durante la fase exponencial de crecimiento

Por su parte Castellanos-Ibarra, (2023) realizó un estudio que evaluó el efecto inhibitorio de las diatomeas *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* contra las bacterias patógenas *V. harveyi* y *V. alginolyticus*. El reto de inhibición se realizó con una concentración de 1×10^4 Vibrios mL⁻¹ y la cual fue corroborada por medio de conteos en placa después de la inoculación. Ambas especies de diatomeas tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *V. harveyi* y *V. alginolyticus* entre las 48 a 96 h.

1.2 Justificación

Las bacterias del género *Vibrio* causan enfermedades en cultivos acuícolas, llegando a causar mortalidades del 100% en los cultivos de diversas especies y generan grandes pérdidas económicas. Una fuente de infección para los organismos en los cultivos es la utilización de *Artemia* spp. como alimento para los estadios larvales de diversas especies. Los antibióticos han sido el método más utilizado para tratar estas bacterias, sin embargo, las bacterias han desarrollado resistencia a estos compuestos, provocando una baja efectividad del antibiótico, afectaciones en la morfología y salud en general de los organismos en

cultivo, tales como deformidad larval, letargia extrema y disminución de palatabilidad en postlarvas. Por estas razones es importante realizar investigación relacionada con el uso de nuevas alternativas, como la técnica de aguas verdes, para la inhibición de bacterias del género *Vibrio*. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto inhibitorio de la diatomea *Nitzschia thermalis* f. *kurta* en la concentración de *V. campbellii* y la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* al estar en cocultivo.

1.3 Hipótesis

La concentración de *Vibrio campbellii* disminuirá menos de 100 *Vibrio campbellii* mL⁻¹ en presencia de *Nitzschia thermalis* f. *kurta* al estar en cocultivo con nauplios de *Artemia franciscana*.

La supervivencia de nauplios de *A. franciscana* será mayor al 50% al estar en cocultivo con *Nitzschia thermalis* f. *kurta* en la presencia de *Vibrio campbellii*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de *Nitzschia thermalis* f. *kurta* en la concentración de *V. campbellii* y en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* al estar en cocultivo.

1.4.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la densidad de células de *N. thermalis* f. *kurta* al ser utilizada como alimento para nauplios de *A. franciscana* y su efecto en la supervivencia.

Evaluar el efecto de *N. thermalis* f. *kurta* en la concentración de *V. campbellii* en cocultivos de *N. thermalis* f. *kurta* al ser cultivada con nauplios de *A. franciscana* y *V. campbellii*.

Evaluar la concentración de bacterias heterotróficas en cocultivos de *N. thermalis* f. *kurta* al ser cultivada en cocultivo con nauplios de *A. franciscana* y *V. campbellii*.

Determinar el efecto de la densidad celular de *N. thermalis* f. *kurta* en la disminución de la concentración de *V. campbellii* al ser cultivada en cocultivo con nauplios de *A. franciscana* y *V. campbellii*.

Evaluar el crecimiento y supervivencia de nauplios de *Artemia franciscana* en cocultivo con *N. thermalis* f. *kurta* y *V. campbellii*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Estandarización de metodologías y ensayos preliminares

2.1.1 Origen de la cepa de diatomea *Nitzschia thermalis* f. *kurta*

La cepa de *Nitzschia thermalis* f. *kurta* fue aislada por Jiménez-Valera y Sánchez-Saavedra (2016) en San Quintín, Baja California, México. Para este estudio la cepa fue obtenida de la colección de especies de microalgas del Laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL), el cual se encuentra bajo el resguardo de la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, investigadora del Departamento de Acuicultura del CICESE.

2.1.2 Mantenimiento rutinario de la cepa

La cepa de *Nitzschia thermalis* f. *kurta* se mantuvo de forma no axénica y monoespecífica en un sistema por lotes o en sistemas estáticos en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de agua de mar con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Para preparar el medio de cultivo se utilizó agua de mar proveniente del sistema semicerrado que abastece al Laboratorio Húmedo Central del Departamento de Acuicultura (CICESE). El agua de mar a utilizar tuvo un proceso filtración que consistió en una sedimentación, para después ser pasada por filtros rápidos de arena y cartuchos de fibra de vidrio de 10, 5 y 1 μm , además fue irradiada con luz ultravioleta. Posteriormente, el agua de mar fue esterilizada en una autoclave a 121 °C y a una presión de 1.02 kg cm^{-2} durante 20 minutos. Los nutrientes del medio de cultivo, se adicionaron después de esterilizar el agua de mar en los recipientes de cultivo a usar.

Para mantener la cepa en cultivo, semanalmente se cosecho el 10% del cultivo madre e inoculó en medio nuevo. Los cultivos se mantuvieron a 22 °C \pm 1 °C, con una irradiancia continua de luz blanca fría (SILVANIA F40W) a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, agitación manual diaria y no se colocó aireación. La irradiancia se ajustó con un sensor esférico Biospherical Instruments modelo QSL-100.

2.1.3 Cuantificación del crecimiento de *N. thermalis*

Para evaluar el crecimiento de *N. thermalis* f. *kurta* se realizaron cultivos monoespecíficos, por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) preparado con agua

de mar. Los cultivos se mantuvieron a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una irradiancia continua de luz blanca fría (SILVANIA F40W) a $100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, agitación manual diaria y no se colocó aireación.

Para cuantificar y monitorear la densidad celular se utilizaron dos métodos: en el primero se realizaron conteos celulares diarios por 14 días con ayuda de un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX-31) con objetivo de 40x. Para el segundo método se cuantificó el crecimiento del cultivo por turbidimetría, colectando 1.5 mL del cultivo y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 680 nm. El pH se monitoreó diariamente con un potenciómetro Ohaus Starter 3100.

2.1.4 Origen y cultivo de *Vibrio campbellii*

La cepa de *Vibrio* seleccionada por ser patógena para organismos acuáticos como peces y crustáceos (Defoirdt *et al.*, 2007) en cultivo fue la cepa de *V. campbellii* (clave CICESE 559). La cepa de *V. campbellii* fue obtenida de la colección de microorganismos del CICESE y que se encuentra bajo el resguardo del Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida, investigador del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE. Esta cepa de bacteria fue aislada por Giffard-Mena (1999) de una granja camaronícola ubicada en el estado de Sonora, México. Esta cepa también forma parte de la colección de Microorganismos de Importancia en la Acuicultura o “Collection of Aquacultural Importance Microorganism (CAIM)” del Centro de Investigación y Desarrollo Alimentario (CIAD) donde tiene la clave CAIM 416.

El cultivo de *V. campbellii* se realizó en cajas Petri con aproximadamente 25 mL de medio ZoBell (Oppenheimer y ZoBell, 1952) esterilizado en una autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a una presión de 1.02 kg cm^{-2} durante 20 min. La siembra de las cajas se realizó por estriado con asa bacteriológica con el fin de obtener colonias aisladas y una vez que las cajas fueron sembradas se incubaron en una cámara de incubación de la marca VWR a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Posteriormente, se tomó una o dos colonias aisladas y fueron sembradas en toda la superficie del agar en otra caja Petri de 100 x 15 mm con medio ZoBell y se incubaron durante 24 h a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la cámara de incubación.

2.1.5 Preparación de inóculo de *V. campbellii*

Se utilizaron tubos de cultivo de 10 mL con tapa de rosca, a los cuales se les adicionaron 9 mL de solución salina y se esterilizaron en las mismas condiciones descritas en la sección 2.1.2.

La cepa de *V. campbellii* se sembró densamente en caja Petri de 100 x 15 mm con medio ZoBell (Oppenheimer y ZoBell, 1952) y se incubó en una cámara de incubación marca VWR a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

Posterior al tiempo de incubación, se agregaron 3 mL de solución salina, y con ayuda de una pipeta serológica se raspó la capa del crecimiento bacteriano, evitando rasgar la superficie del agar. Posteriormente, con la misma pipeta serológica utilizada para verter la solución salina en la caja Petri densamente sembrada, se recolectó la mezcla de solución salina preparada con 25 g NaCl L⁻¹ y bacterias provenientes del cultivo densamente sembrado en medio ZoBell. Una vez recuperada la mezcla, se vertieron en el tubo con solución salina de donde fueron extraídos inicialmente los 3 mL, se agitó manualmente y se dejó reposar por 20 min para facilitar la disgregación de los grumos de bacterias. Esta mezcla de bacterias fungió como inóculo madre y se utilizó para preparar los inóculos de *V. campbellii* que se emplearon en los ensayos de inhibición.

Para preparar los inóculos de *V. campbellii* a utilizar en los ensayos de inhibición a partir del tubo con el inóculo madre de *V. campbellii* se transfirieron gotas de esta mezcla a un nuevo tubo de vidrio de 10 mL con solución salina preparada con 25 g NaCl L⁻¹ y se realizaron mediciones en un espectrofotómetro de la marca HACH DR modelo 4000 a 600 nm, hasta obtener una densidad óptica de 0.05 lo que corresponde a una densidad de 1×10^6 UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colonias) (Anguiano-Beltrán, 1996).

2.1.6 Inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis*

Ayala-García en 2021 reportó la inhibición de *V. campbellii* al estar en cocultivo con *N. thermalis*, lo cual fue corroborado en este trabajo mediante un ensayo preliminar. Para evaluar el efecto inhibitorio de *N. thermalis* sobre *V. campbellii* se realizó un cocultivo microalga-bacteria, en el cual se monitoreó la concentración de *N. thermalis*, la densidad de *V. campbellii* y la concentración de bacterias heterotróficas presentes en él. El cocultivo se realizó en un matraz de 125 mL con 100 mL de medio "F" (Guillard y Ryther, 1962), el cual fue inoculado con una densidad de 100,000 cél. mL⁻¹ de *N. thermalis* y una concentración de 1×10^5 *V. campbellii* mL⁻¹. Las condiciones experimentales del bioensayo fueron: una temperatura de 22 °C \pm 1 °C, con una irradiancia continua de luz blanca fría (SILVANIA F40W) a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, agitación manual diaria y no se colocó aireación.

2.1.7 Conteo de *V. campbellii* y bacterias heterotróficas

Para el conteo de *V. campbellii* se tomaron muestras de 1 y 10 mL de cocultivo de *N. thermalis* con *V. campbellii* y fueron pasados por filtros Millipore, estériles de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro, con cuadrícula de referencia y tamaño de poro de 0.22 μm . Los filtros fueron colocados en cajas Petri de 60 x 15 mm con medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (Tamura *et al.*, 1971). Las cajas Petri con los

filtros se incubaron a 28 °C por 24 h en una cámara de incubación de la marca VWR y transcurridas las 24 h fueron contadas las colonias presentes en el medio para confirmar la presencia o ausencia de colonias de *V. campbellii*. Adicionalmente, se realizaron conteos en placa realizando diluciones seriadas y sembrando 100 µL de las diluciones en cajas Petri con medio TCBS las cuales fueron incubadas a 28 °C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las colonias fueron contadas con ayuda de un contador de colonias y se expresaron en *V. campbellii* presentes en 1 mL (*V. campbellii* mL⁻¹).

El conteo de bacterias heterotróficas se realizó por el método de conteo en placa. Se tomó 1 mL de cultivo de *N. thermalis* y se realizaron diluciones seriadas, posteriormente, se tomaron 100 µL de las diluciones seriadas y se sembraron en cajas Petri con medio ZoBell. Las cajas Petri con las muestras fueron incubadas a 28 °C por un periodo de 48 h. Posterior al tiempo de incubación se contaron las colonias que crecieron en las placas con ayuda de un contador de colonias y se expresaron en UFC presentes en 1 mL (UFC mL⁻¹).

2.1.8 Efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en la solución salina para los inóculos de *Vibrio*

Para evaluar el efecto de la concentración de cloruro de sodio para el crecimiento óptimo de *V. campbellii*. Se tomaron en consideración los resultados obtenidos por Castellanos-Ibarra (2023) y se evaluó el efecto de preparar solución salina con 8.9 g NaCl L⁻¹ y 25 g NaCl L⁻¹. Para la preparación de las soluciones salinas con el inóculo bacteriano se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.1.5. Para cada solución salina (8.9 g NaCl L⁻¹ y 25 g NaCl L⁻¹) se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ y se sembraron 100 µl de cada dilución en cajas Petri con medio TCBS. Posteriormente, se incubaron en una cámara de incubación de la marca VWR a 28 °C por 24 h, esto se evaluó a las 0+1, 24, 48, 72 y 96 h después de la siembra. El crecimiento de *V. campbellii* fue evaluado por medio de conteos como ya se describió en la sección 2.1.7 diariamente.

2.1.9 Bioensayo de alimentación de *Artemia franciscana* con *N. thermalis*

El propósito de este ensayo fue evaluar la cantidad de células de *N.thermalis* que consumen como alimento *A. franciscana*. Se buscó además se mantuviera en el medio una concentración de células de *N. thermalis* de 400,000 cél. mL⁻¹, ya que a esa densidad Ayala-García (2021) encontró inhibición del crecimiento de *V. campbellii* al mantenerse en cocultivo con esta especie de diatomea.

Para el ensayo de alimentación, se eclosionaron quistes de *A. franciscana* de la marca INVE provenientes del Gran Lago Salado, Utah, EUA. Se pesaron 50 mg de quistes de *A. franciscana* y fueron hidratados 15 minutos con agua de mar filtrada como se describe en el apartado 2.1.2. Posteriormente, los quistes hidratados fueron desencapsulados con hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 3% durante 15 minutos. Una vez hidratados y desencapsulados los quistes fueron colocados en un tubo cónico con 400 mL de agua de mar. Los quistes se mantuvieron a una temperatura de 25 °C, con aireación e iluminación constante a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 24 horas.

Para evitar la contaminación con bacterias, el aire suministrado a los cultivos, pasó por un filtro de cartucho marca Gelman Science Inc. de 7 cm de longitud y 4 cm de diámetro con membrana de polisulfona y $0.45 \mu\text{m}$ de apertura de poro. Transcurridas las 24 h de haber puesto a eclosionar los nauplios, éstos fueron concentrados por su fototropismo positivo y cosechados por medio de una manguera haciendo un sifón. Los nauplios recién eclosionados se colocaron en un vaso de precipitado de vidrio de 500 mL con agua de mar estéril y aireación para su utilización en los bioensayos. Se evaluó la concentración de los nauplios al contabilizarlos con una pipeta transparente de 1 mL. Los nauplios fueron colocados en matraces de 125 mL con 100 mL de medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) a una densidad de 1 nauplio mL^{-1} según la recomendación de densidad indicada por Soto-Rodríguez *et al.* (2003). El bioensayo de alimentación de los nauplios de *A. franciscana* se realizó utilizando tres concentraciones de células de *N. thermalis* (100,000, 250,000 y 400,000 cél. mL^{-1}). Cada tratamiento experimental se mantuvo por triplicado. Los sistemas experimentales se mantuvieron a una irradiancia continua de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y además se suministró aireación constante la cual tuvo un sistema de filtración como ya se describió en líneas arriba.

A partir del día cero (inicial) y para cada tratamiento se evaluó cada día la densidad de células *N. thermalis* como ya descrito en el inciso 2.1.3. Además, cada día se evaluó la densidad de los nauplios al contabilizarlos con una pipeta transparente de 1 mL. La densidad de los nauplios se evaluó durante 5 días. La supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* se calculó mediante el cociente del valor del conteo de nauplios obtenido cada día entre el valor inicial del conteo de nauplios. Este resultado se multiplicó por cien para expresarlo como porcentaje. Previo y al final del bioensayo se confirmó que no había presencia de bacterias tipo *Vibrio* en el cultivo de *N. thermalis* y en el agua de la eclosión de *A. franciscana*, con la metodología descrita en la sección 2.1.9.

2.1.10 Efecto de la aireación en el crecimiento de *V. campbellii*

Este bioensayo se realizó con el propósito de evaluar la capacidad de *V. campbellii* de crecer con y sin aireación, esto se realizó debido a que los nauplios de *A. franciscana* requieren aireación al momento de su eclosión y fue necesario verificar que no hubiera algún efecto en la concentración de *Vibrio* y la supervivencia de *A. franciscana*. Se mantuvieron cultivos por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 200 mL de medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). Se realizaron cultivos de cuatro tratamientos experimentales (*N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con y sin aireación y además *V. campbellii* en medio "f" con y sin aireación).

La densidad inicial de células de *N. thermalis* para las unidades experimentales fue de 250,000 células mL⁻¹. Para las unidades experimentales que contenían *A. franciscana* se utilizó una concentración de 1 nauplio mL⁻¹. Las unidades experimentales se inocularon a una concentración de 1 x10⁵ *V. campbellii* mL⁻¹. El inóculo de *V. campbellii* se preparó como se describe en la sección 2.1.5.

Para cada unidad experimental se evaluó la densidad celular de *N. thermalis* como se describe en la sección 2.1.3. Se cuantificó la concentración de *V. campbellii* (sección 2.1.7) y la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* (sección 2.1.9) durante 7 días. Los tratamientos experimentales se mantuvieron a 22 ± 1 °C por medio del aire acondicionado del laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura. Se mantuvo una irradiancia constante de 100 μmol m⁻² s⁻¹ por medio de lámpara fluorescentes de luz blanca fría y una aireación constante en los tratamientos que especificaban aireación.

Para evitar la contaminación de *V. campbellii* fuera de los sistemas experimentales al suministrar aireación, se utilizó para cada caso una trampa. El sistema de trampa consistió en mantener un matraz de 250 mL con 200 mL de agua de la tubería de uso doméstico y se le adicionó solución de hipoclorito de sodio comercial cloro (Cloralex®) en una proporción de 6 mL L⁻¹. En cada sistema se colocó un tapón de goma con dos orificios, uno de ellos se conectó a la manguera que desfogó el suministro de aire de los tratamientos con *V. campbellii* y burbujeó dentro de la solución con cloro. El segundo orificio del tapón de goma sirvió para la salida del aire del sistema. El sistema de trampa se mantuvo cubierto con papel aluminio para evitar la entrada de la luz y evitar la degradación del cloro.

2.2 Bioensayo final

2.2.1 Retos de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*

Para el reto de inhibición final se utilizaron las mismas densidades iniciales descritas en la sección 2.1.6. Se mantuvieron cultivos por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 200 mL de medio “f” (Guillard y Ryther, 1962). Se realizaron tres tratamientos y tres controles experimentales descritos en la tabla 1. Previo al bioensayo de inhibición, se descartó la presencia de bacterias tipo *Vibrio* en los cultivos de *N. thermalis* y agua de la eclosión de nauplios de *A. franciscana* siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.1.9. Se utilizó un inóculo de 250,000 cél. de *N. thermalis* mL⁻¹ como se describe en la sección 2.1.2. Para los tratamientos que requerían de *V. campbellii* se siguió la metodología descrita en la sección 2.1.5 para inocular a una concentración de 1 x10⁵ *V. campbellii* mL⁻¹ y finalmente se colocaron los nauplios de *A. franciscana* a una densidad de nauplio mL⁻¹.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos y controles experimentales del reto de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*.

Tratamiento	Control experimental
<i>N. thermalis</i> + <i>A. franciscana</i>	<i>N. thermalis</i> + medio “f”
<i>N. thermalis</i> + <i>A. franciscana</i> + <i>V. campbellii</i>	<i>V. campbellii</i> + medio “f”
<i>N. thermalis</i> + <i>V. campbellii</i>	<i>A. franciscana</i> + <i>V. campbellii</i>

Para los cultivos mantenidos en los distintos tratamientos experimentales y tratamientos control, cada día, se evaluó la densidad celular de *N. thermalis* como se describe en la sección 2.1.3. Se cuantificó la densidad celular de las bacterias heterotróficas de acuerdo a lo descrito en la sección 2.1.7 y la densidad de *V. campbellii* según lo indicado en la sección 2.1.7 durante 7 días. La supervivencia de *A. franciscana* se evaluó utilizando una pipeta de 10 mL y los cálculos se realizaron como se describe en la sección 2.1.9.

Las condiciones experimentales en los tratamientos fueron a una temperatura de 22 ± 1 °C por medio del aire acondicionado del laboratorio húmedo central del Departamento de Acuicultura. Una irradiancia constante de 100 μmol m⁻² s⁻¹ por medio de lámpara fluorescentes de luz blanca fría descrita en la sección 2.1.2

2.3 Análisis estadístico

Para los datos obtenidos se evaluaron los supuestos de normalidad mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad mediante la prueba de Levene.

Las diferencias de la densidad celular de *N. thermalis* respecto al tiempo de cultivo fueron comparados por medio de un análisis de varianza de una vía.

Las posibles diferencias en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* por efecto del tiempo de cultivo y del tratamiento, fueron evaluadas por medio de un análisis de varianza de dos vías para el bioensayo de alimentación.

Para comparar el efecto de la concentración de NaCl utilizado para hacer las diluciones de *V. campbellii* se utilizó una prueba t de Student.

Para el bioensayo de inhibición de *V. campbellii* suministrando aireación y sin aireación se utilizaron las siguientes pruebas: la densidad de *V. campbellii* respecto al tiempo fue analizada por medio de un análisis de varianza de una vía. Para evaluar las diferencias en la densidad celular de *N. thermalis* y la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* se utilizó para cada caso una prueba t de Student.

En el bioensayo final de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y *A. franciscana* se utilizó un análisis de varianza de una vía para evaluar las posibles diferencias en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* respecto al tiempo de cultivo. Esta misma prueba se utilizó para evaluar para cada caso, la concentración de bacterias heterotróficas, la concentración de *V. campbellii* y la densidad celular de *N. thermalis* con respecto al tiempo de cultivo.

En el caso de encontrar diferencias significativas en las pruebas estadísticas antes mencionadas, se utilizó una prueba *a posteriori* de Tukey.

Para las pruebas estadísticas antes mencionadas se utilizó un nivel de confianza del 95%. Los datos fueron procesados en el programa estadístico Statistica versión 7.0.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Estandarización de metodología y ensayos preliminares

3.1.1 Caracterización de curva de crecimiento de *N. thermalis*

La densidad de células máxima alcanzada en las curvas de crecimiento de *N. thermalis* fue de 1.8×10^5 cél. mL⁻¹ (Figura 1A). La fase exponencial del crecimiento se presentó durante los días 3 a 13 y la fase estacionaria no se presentó de manera clara, ya que a partir del día 14 se observó una disminución de la densidad celular. Se realizó el seguimiento del crecimiento de *N. thermalis* mediante densidad óptica a una longitud de onda de 680 nm, teniendo como valor máximo 0.368 (Figura 1B). Los valores de pH del cultivo de *N. thermalis* variaron entre 8.4 a 9.5 (Figura 1C).

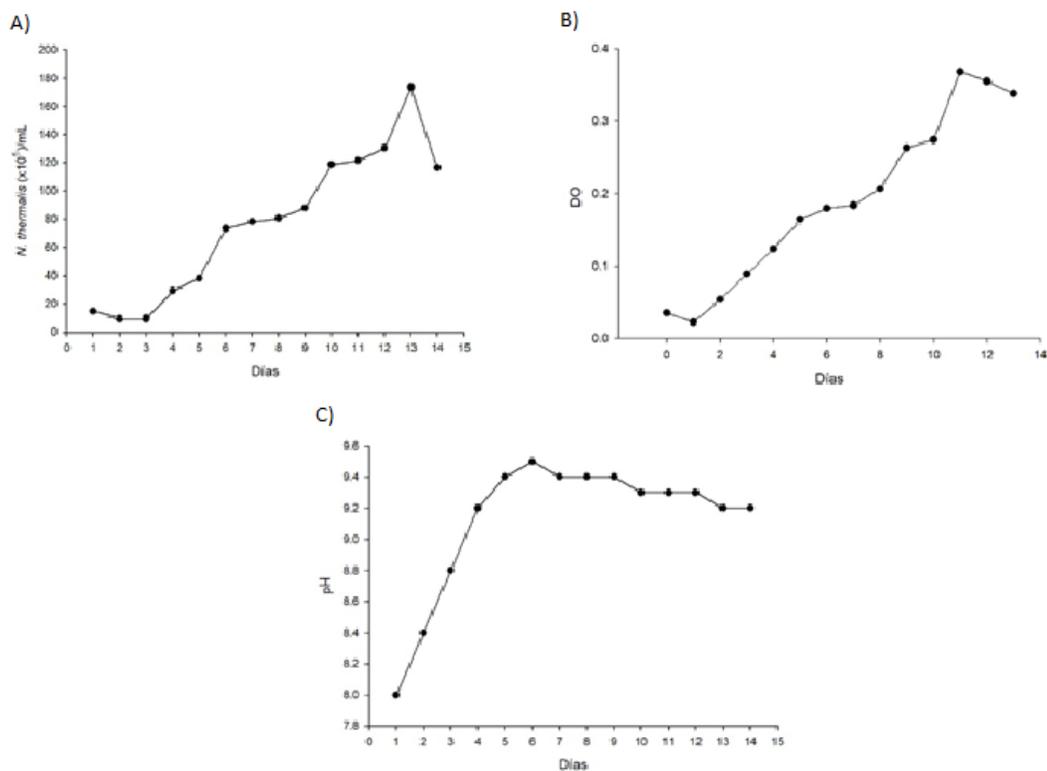


Figura 1. Caracterización del crecimiento de *N. thermalis* A) Conteos celulares; B) Densidad óptica; C) pH de cultivos mantenidos en matraz Erlenmeyer.

3.1.2 Bioensayo de alimentación de nauplios de *A. franciscana* con *N. thermalis*

Durante el bioensayo de alimentación de *A. franciscana*, se encontró que *N. thermalis* tuvo un crecimiento exponencial en las tres concentraciones utilizadas durante los días de bioensayo (Figura 2). La densidad máxima alcanzada por *N. thermalis* fue de 3.6×10^6 cél. mL⁻¹ en el tratamiento que inició con 400,000 cél. mL⁻¹. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la densidad de *N. thermalis* el día 4 con respecto al día inicial, sin embargo, no se encontraron diferencias en los días 2 y 3 de cultivo (Figura 2).

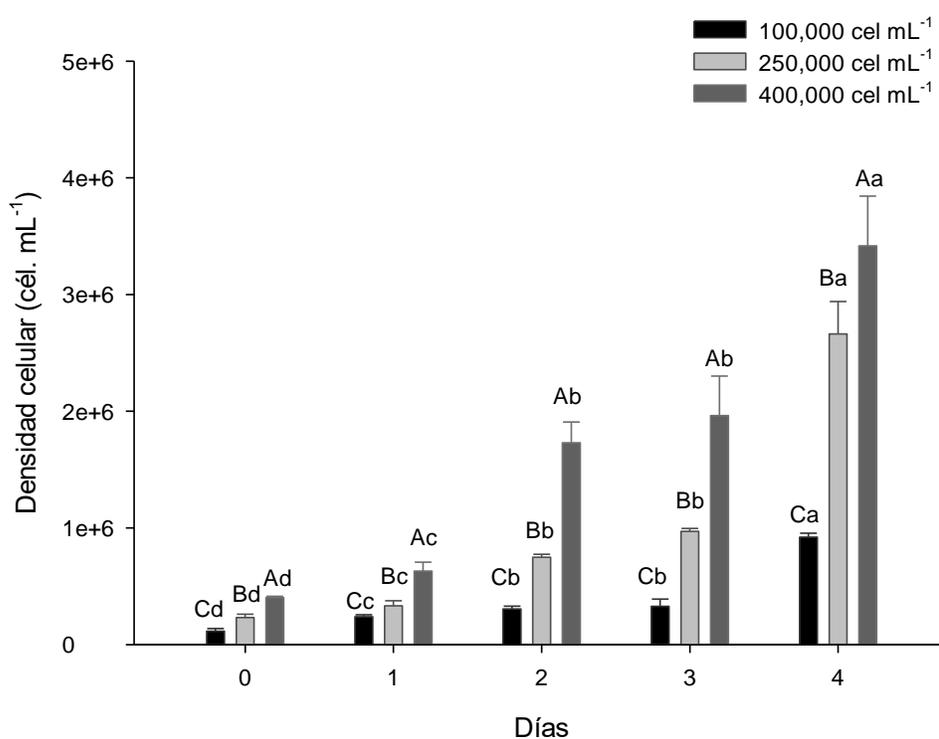


Figura 2. Crecimiento de *N. thermalis* en cocultivo con *A. franciscana*. Análisis de varianza de 2 vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a > b > c > d$. diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A > B > C$.

El número de células disponibles de *N. thermalis* por nauplio aumentó hasta el día 4 en donde alcanzó una densidad máxima de 6.2×10^6 cél. nauplio⁻¹ (Figura 3). No se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las tres concentraciones de células utilizadas como alimento. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los días de medición.

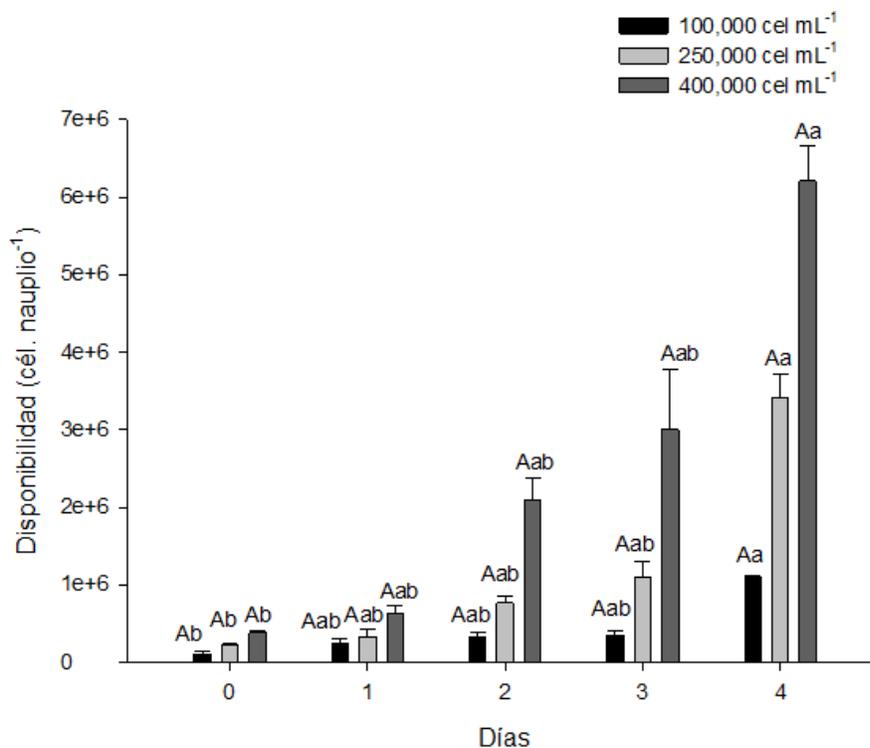


Figura 3. Disponibilidad de células de *N. thermalis* por nauplio de *A. franciscana*. Análisis de varianza de 2 vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a>ab>>b$. Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A>B$.

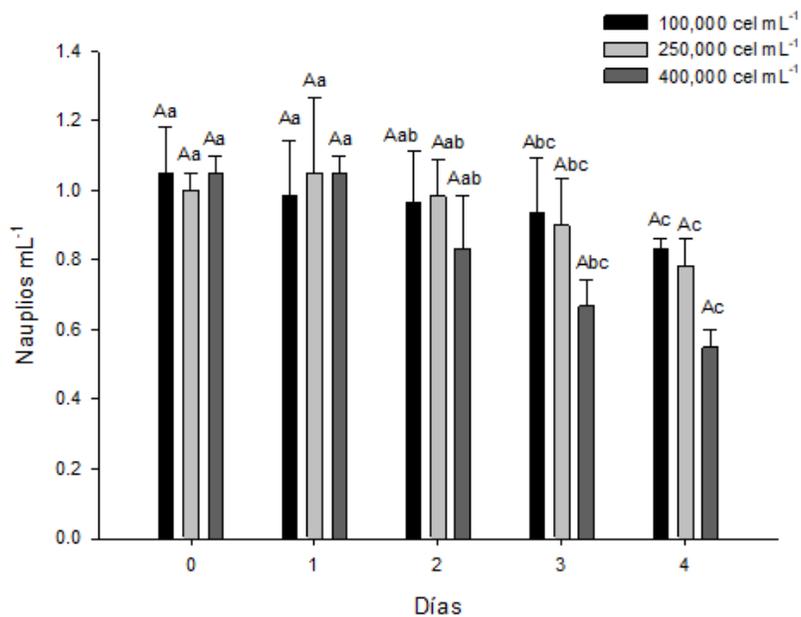


Figura 4. Densidad de *A. franciscana* en cocultivo con *N. thermalis*. Análisis de varianza de 2 vías y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a>b>c$. Las diferente diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: $A>B$.

La densidad de nauplios de *A. franciscana* disminuyó conforme aumentó la densidad de células de *N. thermalis* suministradas como alimento (Figura 4). No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los nauplios por efecto de los tratamientos ($p < 0.05$), sin embargo, si hubo diferencias ($p < 0.05$) en los valores de supervivencia por efecto del tiempo de cultivo, particularmente entre el día 0 y 4 en donde la tendencia fue a disminuir la magnitud de los valores.

3.1.3 Efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en la solución salina para los inóculos de *Vibrio*

La máxima concentración de *V. campbellii* obtenida para la solución salina preparada con 8.9 g NaCl L⁻¹ fue de 72,000 *V. campbellii* mL⁻¹ en la dilución 10⁻² a las 24 h (Figura 5). Sin embargo, no se logró detectar crecimiento de *V. campbellii* en la dilución 10⁻² los siguientes días de sembrado (48 h a 96 h). La dilución 10⁻³ se utilizó hasta las 24 h, sin embargo, se tuvo un crecimiento indetectable a las 24 h. Se encontró que *V. campbellii* tiene un mayor crecimiento en la solución salina preparada a una concentración de 25 g NaCl L⁻¹ de agua destilada (Figura 6). Se detectaron colonias hasta la dilución 10⁻³ utilizando la solución salina preparada con 25 g NaCl L⁻¹ y hasta las 96 h post inoculación. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diluciones a las 96 h. Además, con la concentración de 25 g NaCl L⁻¹ se logró tener una mayor uniformidad en los conteos, mientras que la solución salina a una concentración de 8.9 g NaCl L⁻¹, solamente se lograron tener conteos de *V. campbellii* a una dilución de 10⁻¹.

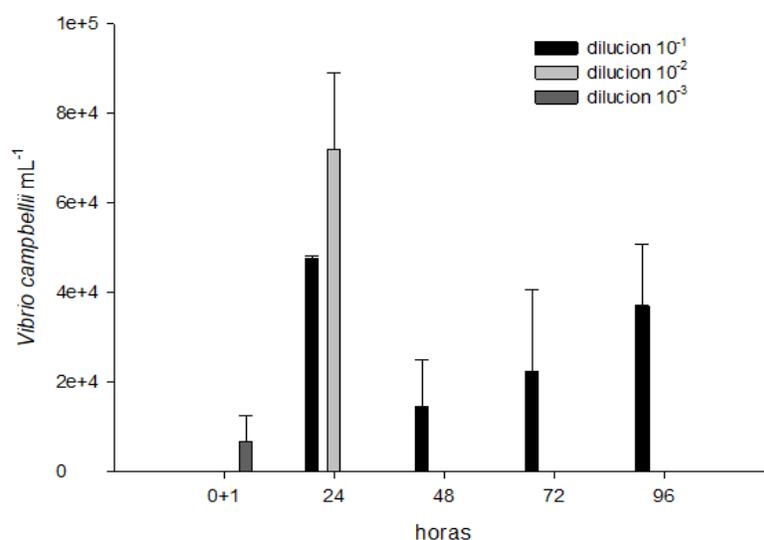


Figura 5. Concentración de *V. campbellii* en solución salina preparado con 8.9 g de NaCl L⁻¹ sembrado a las diluciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³.

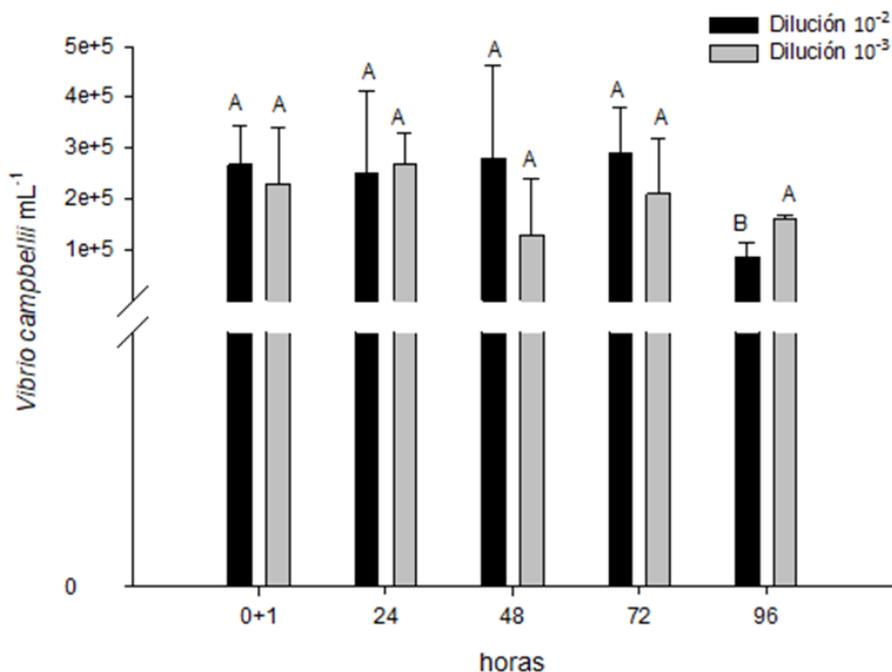


Figura 6. Concentración de *V. campbellii* en solución salina preparado con 25 g de NaCl L⁻¹ sembrado a las diluciones 10⁻² y 10⁻³. Se realizó una prueba t de Student para cada tiempo. Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre diluciones, donde: A>B.

3.1.4 Efecto de la aireación en el crecimiento de *V. campbellii*

La densidad máxima celular alcanzada por *N. thermalis* fue de 4 x10⁶ cél. mL⁻¹ en el tratamiento de *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con aireación al día 7 (Figura 7). Se evaluaron diferencias significativas de la densidad celular de *N. thermalis* entre los tratamientos *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con aireación y sin aireación con respecto a los días de cultivo ($p < 0.05$) a partir del día 4. La densidad de los nauplios de *A. franciscana* fue mayor en el tratamiento sin aireación (Figura 8).

En el tratamiento de *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con aireación al día 7, tuvo una densidad de nauplios de *A. franciscana* de 0 nauplios mL⁻¹, mientras que la densidad de nauplios en *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* sin aireación fue de 0.36 nauplios mL⁻¹. Se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la densidad de nauplios en los tratamientos *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con y sin aireación a partir del día 2 de cultivo.

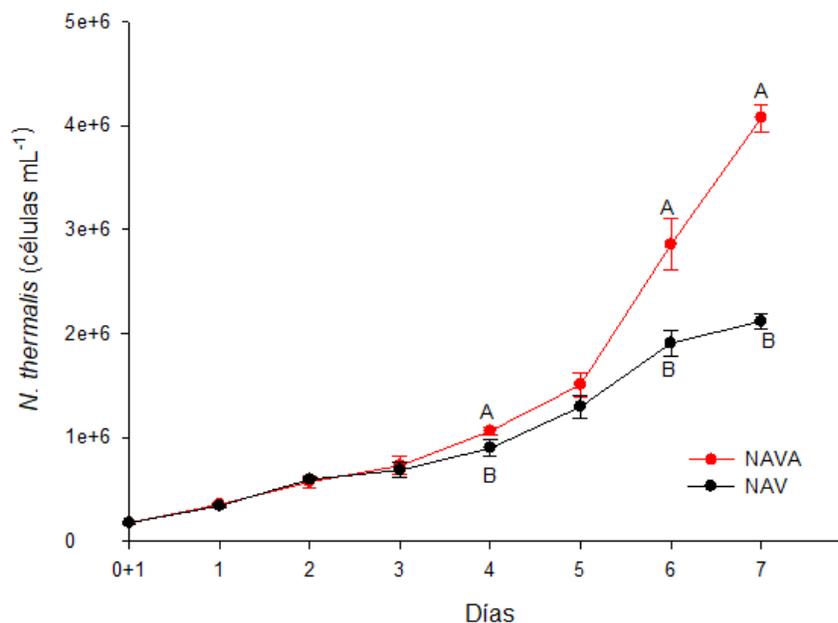


Figura 7. Curvas de crecimiento de *N. thermalis* en los distintos tratamientos experimentales del reto de inhibición de *V. campbellii*. Los tratamientos corresponden a: *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con aireación (NAVA) y *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* sin aireación (NAV). Análisis t de Student y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: A>B.

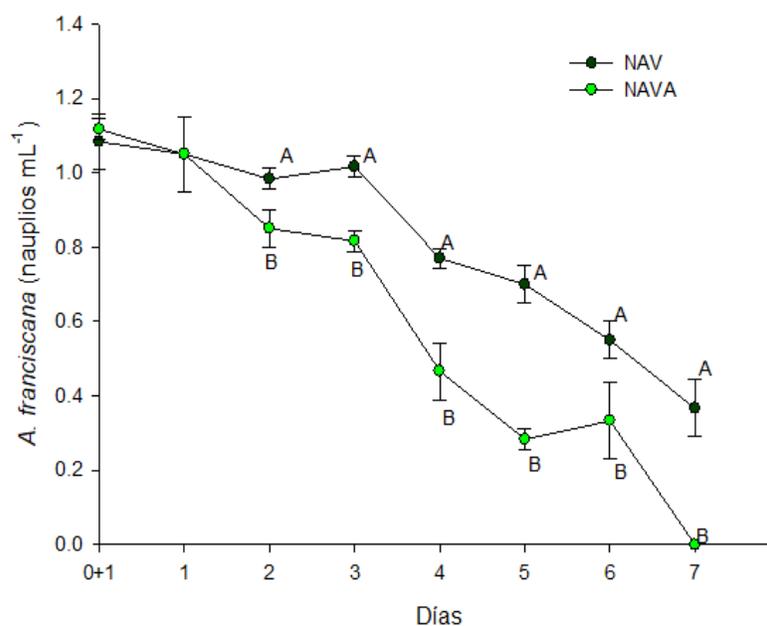


Figura 8. Densidad de nauplios de *A. franciscana* en los distintos tratamientos experimentales del reto de inhibición de *V. campbellii*. Los tratamientos corresponden a: *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con aireación (NAVA) y *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* sin aireación (NAV). Análisis t de Student y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos, donde: A>B.

Se encontró que para todos los tratamientos la concentración inicial de *V. campbellii* fue de 1×10^5 *V. campbellii* mL⁻¹ (Figura 9).

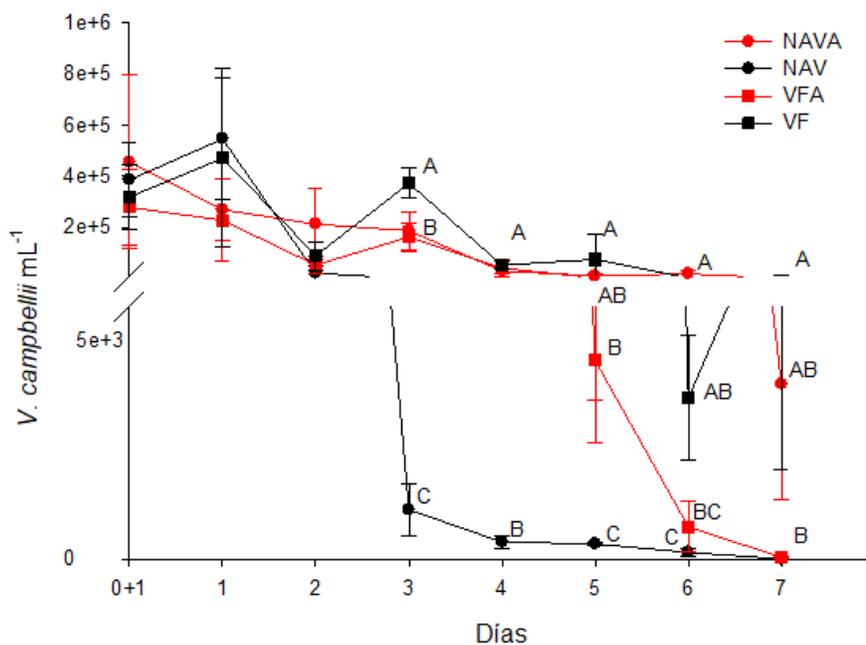


Figura 9. Curvas de crecimiento de *V. campbellii* en los distintos tratamientos experimentales del reto de inhibición de *V. campbellii*. Los diferentes tratamientos corresponden a: *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* con aireación (NAVA), *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* sin aireación (NAV), *V. campbellii* en medio "f" con aireación (VFA) y *V. campbellii* en medio "f" sin aireación (VF). Análisis de varianza de 1 vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos por día, donde: A>B>C.

La densidad de *Vibrio* al día 3 en el tratamiento *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* sin aireación disminuyó significativamente con respecto al resto de los tratamientos y se mantuvo hasta el día 7. El control experimental *V. campbellii* en medio "f" sin aireación mantuvo una concentración de 1×10^4 *V. campbellii* mL⁻¹ hasta el día 7. Sin embargo, *V. campbellii* en medio "f" con aireación no logró mantener su concentración y disminuyó a 40 *V. campbellii* mL⁻¹ al día 7.

3.2 Experimentación final

3.2.1 Retos de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*

Se observó una disminución de la concentración de *V. campbellii* al día 3 después de inocular los cocultivos de *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana* con una concentración inicial de 1×10^5 *V. campbellii* mL⁻¹.

Durante el día 3 se registró una concentración de $103 V. campbellii$ mL⁻¹ y se mantuvo una tendencia a disminuir los valores hasta el día 5 (Figura 10). La disminución de los valores de concentración de *V. campbellii* coincidió con la fase exponencial de crecimiento de *N. thermalis*, que presentó una densidad celular de 1.15×10^6 cél. mL⁻¹ al día 3 de cultivo. El tratamiento control de *V. campbellii* en medio "F" mantuvo su concentración en una densidad de $7.5 \times 10^4 V. campbellii$ mL⁻¹, lo que indica que *V. campbellii* tiene la capacidad de crecer en este medio de cultivo y no presentó inhibición de su crecimiento (Figura 10).

Los valores de densidad de *A. franciscana* tendieron a disminuir respecto al tiempo de cultivo y se encontró una densidad de 0.55 nauplios de *A. franciscana* mL⁻¹ al día 5 (Figura 10). La densidad de bacterias heterotróficas mostró una tendencia a incrementar los valores respecto al tiempo de cultivo. Se encontró que, para las bacterias heterotróficas, al día 0 se registró una densidad de 2.3×10^4 UFC mL⁻¹, mientras que al final del ensayo la densidad fue de 2×10^6 UFC mL⁻¹. Se encontró que los valores de la densidad de células de *N. thermalis* incrementaron de forma constante con respecto al tiempo de cultivo (Figura 10). La máxima densidad celular alcanzada por *N. thermalis* fue de 2.1×10^5 cél. mL⁻¹ en dos tratamientos: *N. thermalis* en cocultivo con *V. campbellii* y para *N. thermalis* en cocultivo con *V. campbellii* y *A. franciscana*. Para todos los tratamientos que consideraron el uso de *N. thermalis*, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de células ($p > 0.05$) durante los días 0, 1 y 2. El tratamiento control cultivando *N. thermalis* en medio "F", para el día 3, presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de células respecto a los demás tratamientos (Tabla 2). Todos los tratamientos que contenían *N. thermalis* tuvieron una tendencia a incrementar los valores de la densidad de células.

La concentración inicial de los nauplios de *A. franciscana* fue de 1 nauplio mL⁻¹ en todos los tratamientos que consideraban *A. franciscana* (Tabla 3). A partir del día 2, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de densidad de los nauplios para el tratamiento *A. franciscana* y *V. campbellii*. La tendencia antes descrita para la densidad de los nauplios, se presentó hasta el final del experimento (día 5), en donde no se encontraron nauplios vivos (0 nauplios mL⁻¹). La alta mortalidad de *A. franciscana* al día 5, muestra que *V. campbellii* a una concentración de 1×10^5 es patógeno para *A. franciscana*. Los cultivos de *N. thermalis* y los de nauplios de *A. franciscana* resultaron estar libres de bacterias tipo *Vibrio* previo al inicio del reto de inhibición. Las concentraciones iniciales en los tratamientos que consideraban la presencia de *Vibrio* se encontraron en valores de 1×10^5 y $1 \times 10^4 V. campbellii$ mL⁻¹ (Tabla 4). Se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) de la concentración de *V. campbellii* respecto al tiempo de cultivo en el día 3 en los tratamientos en donde se encontraba en cocultivo con *N. thermalis* (Tabla 4).

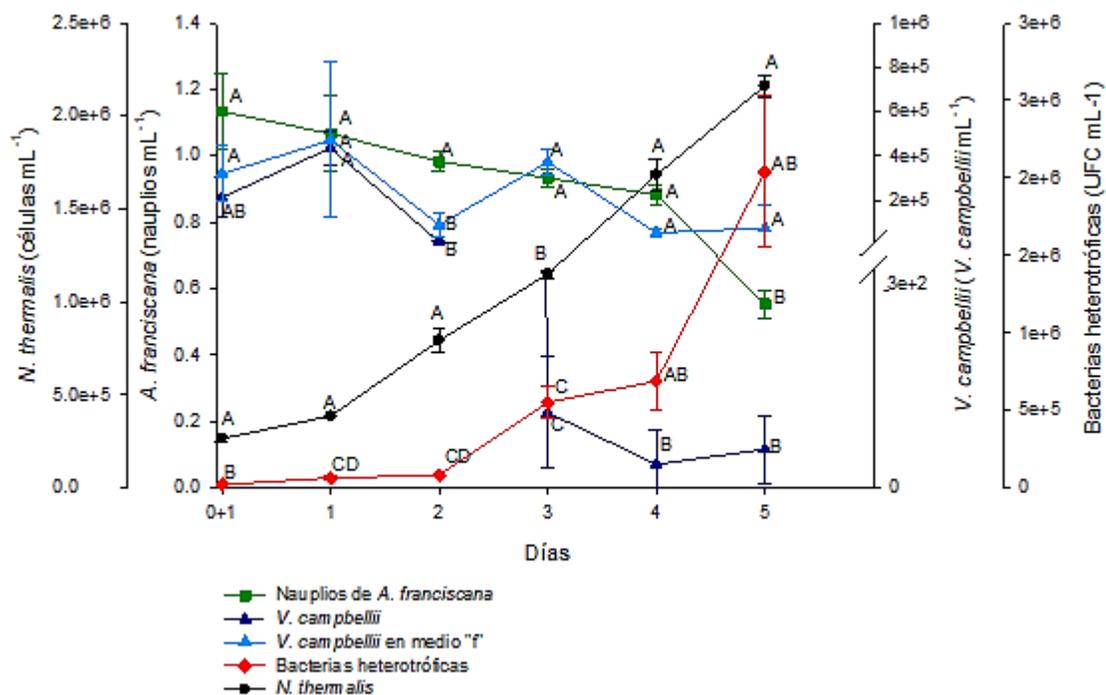


Figura 10. Reto de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *A. franciscana* y *N. thermalis*. Los datos muestran los valores promedio y desviación estándar de la densidad de: Nauplios de *A. franciscana* (■), *V. campbellii* (▲), *V. campbellii* en medio "f" (▲), Bacterias heterotróficas (◆) y células de *N. thermalis* (●). Análisis de varianza de una vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre tratamientos por día, donde: A>B>C>D.

Para las bacterias heterotróficas se evaluó un incremento significativo ($p<0.05$) en los valores de la concentración respecto al tiempo de cultivo (Tabla 5). En el tratamiento *N. thermalis* y *V. campbellii* se encontró la mayor concentración de bacterias heterotróficas (31×10^5 UFC mL⁻¹) al final de ensayo (día 5) (Tabla 5). Los valores significativamente menores ($p<0.05$) de la concentración de bacterias heterotróficas se encontraron en el tratamiento con nauplios de *A. franciscana* y *V. campbellii* al final del ensayo (día 5) (Tabla 5). Los valores de pH del agua en todos los tratamientos experimentales estuvieron entre 9.1 a 9.4, con excepción del tratamiento con nauplios de *A. franciscana* y *V. campbellii* el cual mantuvo valores promedio de 8.3. Para el amonio se encontró que los valores estuvieron entre 0.3 a 0.6 ppm para todos los tratamientos experimentales. Los valores de nitratos se mantuvieron en valores promedio de 2.5 ppm para todos los tratamientos experimentales. Mientras que en los nitritos se tuvieron valores de 0 ppm en todos los tratamientos experimentales.

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la densidad celular de *N. thermalis* (cel mL⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los cuatro tratamientos corresponden a: *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* (NAV), *N. thermalis* en medio "f" (NF), *N. thermalis* y *V. campbellii* (NV) y *N. thermalis* y *A. franciscana* (NA). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *a posteriori* de Tukey en donde A>B>C. n=3

Variable (10 ⁵ cel mL ⁻¹)	Tratamiento	Días											
		0+1	1	2	3	4	5						
<i>N. thermalis</i>	NAV	2.6±0.17	A	3.8±0.05	A	7.9±0.61	A	11.5±0.21	B	16.8±0.83	A	21.0±0.58	A
	NF	2.6±0.18	A	4.0±0.19	A	7.0±0.39	A	8.1±0.45	C	14.2±0.66	B	17.0±0.56	B
	NV	2.6±0.05	A	4.0±0.57	A	7.1±0.57	A	15.0±1.62	A	18.0±1.00	A	21.0±1.80	A
	NA	2.5±0.06	A	4.0±0.22	A	7.5±0.49	A	13.0±0.75	AB	16.0±0.56	AB	19.0±0.05	A

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de la densidad de *A. franciscana* (nauplio mL⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los tres tratamientos corresponden a: *N. thermalis* y *A. franciscana* (NA), *A. franciscana* y *V. campbellii* (AV) y *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* (NAV). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *a posteriori* de Tukey en donde A>B>C. n=3

Variable (Nauplio mL ⁻¹)	Tratamiento	Días											
		0+1	1	2	3	4	5						
<i>A. franciscana</i>	NA	1.06±0.11	A	0.98±0.02	A	0.96±0.02	A	0.93±0.02	A	0.86±0.02	A	0.64±0.04	A
	AV	1.06±0.11	A	0.91±0.02	A	0.90±0.00	B	0.13±0.07	B	0.00±0.00	B	0.00±0.00	C
	NAV	1.13±0.11	A	1.06±0.11	A	0.98±0.02	A	0.93±0.02	A	0.88±0.02	A	0.55±0.04	B

Tabla 4. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de *V. campbellii* ($V. campbellii$ mL⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los cuatro tratamientos corresponden a: *V. campbellii* en medio "f" (VF) *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* (NAV), *A. franciscana* y *V. campbellii* (AV) *N. thermalis* y *V. campbellii* (NV). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *a posteriori* de Tukey en donde A>B>C. n=3

Variable (10 ³ Vibrios mL ⁻¹)	Tratamiento	Días											
		0+1	1	2	3	4	5						
<i>V. campbellii</i>	VF	320±120	A	470±340	A	90±55	B	370±37	A	53±14	A	75±100	A
	NAV	210±90	AB	430±75	A	12±7	B	0.10±0.07	C	0.032±0.04	B	0.05±0.04	B
	AV	73±30	BC	240±140	A	430±140	A	140±100	B	30±10	A	7.60±2.5	AB
	NV	40±16	C	720±280	A	81±52	B	0±0	C	0±0	B	0.01±0.0	B

Tabla 5. Valores promedio y desviación estándar de la concentración de bacterias heterotróficas (UFC mL⁻¹) en los diferentes tratamientos del bioensayo de inhibición. Los cinco tratamientos corresponden a: *N. thermalis* en medio "f" (VF), *N. thermalis*, *A. franciscana* (NA), *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* (NAV), *A. franciscana* y *V. campbellii* (AV) y *N. thermalis* y *V. campbellii* (NV). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba *a posteriori* de Tukey en donde A>B>C>D. n=3

Variable (10 ⁵ UFC mL ⁻¹)	Tratamiento	Días											
		0+1	1	2	3	4	5						
Bacterias heterotróficas	NF	2.60±0.92	A	4.50±0.23	A	7.70±0.38	A	18.00±2.10	A	10.00±1.30	A	17.00±4.60	AB
	NA	2.50±0.15	A	2.90±0.39	B	4.70±0.39	B	8.10±0.97	B	7.40±2.30	AB	11.00±5.00	B
	NAV	0.23±0.02	B	0.65±0.11	CD	0.84±0.01	CD	5.50±1.00	C	6.80±1.80	AB	20.00±4.80	AB
	NV	0.35±0.14	B	0.97±0.11	C	2.40±0.66	C	4.80±1.20	C	6.20±3.20	AB	31.00±0.11	A
	AV	0.03±0.01	C	0.38±0.03	D	0.64±0.08	D	4.80±1.00	C	4.40±0.34	B	1.60±0.43	C

Capítulo 4. Discusión

4.1 Estandarización de metodología y ensayos preliminares

4.1.1 Crecimiento de *N. thermalis*

La densidad máxima de los cultivos de *N. thermalis* en este estudio fue de 1.8×10^5 cél. mL⁻¹, la cual es menor a las 1.69×10^6 cél. mL⁻¹ obtenidas por Jiménez-Valera (2016) para la misma especie empleando en ambos casos medio “f” y una irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, en este estudio los cultivos de mantuvieron a 21 ± 1 °C, lo cual difiere con la temperatura de 19 ± 1 °C empleada por Jiménez-Valera (2016). Ayala-García en 2021, evaluó el crecimiento de dos especies diatomeas bentónicas, una de ellas *N. thermalis*. El autor reporta que al utilizar esta misma especie de diatomea y condiciones experimentales del cultivo similares (temperatura de 21 ± 1 °C e irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obtuvo una densidad de 1.73×10^6 cél. mL⁻¹ mayor a la obtenida en este trabajo. Las diferencias obtenidas en la densidad celular entre los distintos trabajos, se puede deber a la temperatura empleada en los cultivos y a que en el presente trabajo los cultivos de *N. thermalis* presentaron una fase de adaptación más prolongada respecto a lo observado en los trabajos de Jiménez-Valera (2016) y Ayala-García (2021). Además, es importante destacar que la temperatura del sitio en el cual fue aislada esta especie de diatomea es de 17 °C, menor a la temperatura empleada en los trabajos antes mencionados. Esta diferencia de temperatura podría explicar en parte los resultados obtenidos, sin embargo, se tiene evidencia que las especies del género *Nitzschia* son diatomeas termófilas que suelen crecer en temperaturas mayores a 25 °C (Prelle *et al.*, 2021).

Al evaluar el crecimiento de *N. thermalis* aislada de San Quintín, Baja California y mantenerla en distintos niveles de irradiancia, se encontró una densidad de 5×10^5 cél. mL⁻¹ en la irradiancia de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Andrade-Moreno, 2021). Mientras que Correa-Reyes *et al.* (2009) evaluaron el crecimiento de ocho especies de diatomeas bentónicas, entre las que se encuentra *N. thermalis* var. *minor* aislada Isla de Cedros, Baja California, México obtuvieron una densidad de 1.59×10^5 cél. mL⁻¹ en la irradiancia de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las variaciones observadas en el crecimiento de las especies de diatomeas antes mencionadas, podrían deberse a las condiciones ambientales en las que estas diatomeas se desarrollaron en cultivo. Además, las diferencias en las densidades celulares de las especies de diatomeas, pueden ser debidas a una posible adaptación a las distintas condiciones ambientales de donde fueron aisladas. A pesar de ser especies de diatomeas del mismo género, se ha observado que su capacidad de adaptación a la luz

varía según su distribución geográfica (Lavaud *et al.*, 2007). De acuerdo a lo reportado, estas diferencias de densidades celulares con respecto a la densidad máxima alcanzada en este trabajo (1.8×10^5 cél. mL⁻¹) pueden deberse a las condiciones de irradiancia, temperatura y densidad celular empeladas en este estudio y a la adaptación de *N. thermalis* a la luz de acuerdo a la ubicación geográfica de origen del aislamiento de esta especie, el cual fue San Quintín, Baja California, México.

Los valores de pH obtenidos en el presente trabajo (8.4 a 9.5) se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento de este género, según lo reportado por Scholz (2014), quien menciona que el rango óptimo de pH para el crecimiento de diatomeas oscila entre 6.3 a 10.0. El pH es fundamental porque influye en la disponibilidad de nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas y, por lo tanto, en su densidad celular (Sarhou *et al.*, 2005). Es importante resaltar que el pH sólo es uno de los factores que influyen en el cultivo de diatomeas. Como se mencionó anteriormente, la temperatura y la irradiancia también son factores clave que afectan significativamente el crecimiento en las diatomeas. Por lo tanto, para obtener los mejores resultados del crecimiento de *N. thermalis* se debe considerar un enfoque integral incluyendo la optimización de los parámetros ambientales, ajustándose a las necesidades específicas de la especie y considerándose en las condiciones experimentales.

4.1.2 Efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en la solución salina para los inóculos de *V. campbellii*

El cloruro de sodio tiene un efecto significativo en el crecimiento de bacterias tipo *Vibrio* ya que es esencial para mantener la homeostasis osmótica y la estabilidad celular en este tipo de bacterias (Austin y Zhang, 2006).

La concentración adecuada de cloruro de sodio en los medios usados para el crecimiento de *V. campbellii* generalmente se encuentra en el rango de 1 a 3% (Simidu y Tsukamoto, 1980). Este rango de valores de cloruro de sodio, proporciona a las bacterias condiciones similares a su entorno marino natural y fomenta un crecimiento saludable de las bacterias (Eguchi *et al.*, 2000). Considerando esta información, Castellanos-Ibarra (2003) evaluó el crecimiento de *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* empleando dos concentraciones de cloruro de sodio (0.89% y 2.5%) en la preparación de la solución salina para los inóculos de ambas especies de *Vibrio*. Se encontró un mayor crecimiento de ambas especies de *Vibrio* al utilizar la concentración de 2.5% de cloruro de sodio y mayor uniformidad en el conteo de las colonias en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Los resultados anteriores concuerdan con lo obtenido en este trabajo, donde

se obtuvo también un mayor crecimiento de *V. campbellii* y uniformidad en el conteo de las colonias entre las diluciones al usar una concentración de 2.5% de cloruro de sodio.

El cloruro de sodio es esencial para muchas especies tipo *Vibrio*, sin embargo, es importante destacar que concentraciones excesivamente altas pueden tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias del género *Vibrio*. La concentración óptima de cloruro de sodio varía según su especie y el ambiente en el cual se desarrolle *Vibrio* (Higgins *et al.*, 2007). La mayoría de las especies del género *Vibrio* crecen adecuadamente en salinidades desde 1 a 17 ppt, sin embargo, especies como *V. cholerae* y *V. vulnificus* son capaces de tolerar salinidades desde 5 a 25 ppt (Sullivan y Neigel, 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *V. campbellii* tuvo un mayor crecimiento al utilizar una concentración de 2.5% de cloruro de sodio con respecto a los valores obtenidos con la concentración de 0.89% de cloruro de sodio. Estos resultados muestran que *V. campbellii* requiere al menos 2.5% de cloruro de sodio para un crecimiento adecuado al utilizar una solución salina para la realización de diluciones seriadas y el conteo de *Vibrio*.

4.1.3 Bioensayo de alimentación de nauplios de *A. franciscana* con *N. thermalis*

Los nauplios de *A. franciscana* utilizados como alimento para peces y crustáceos son un vector importante para la transmisión de bacterias del género *Vibrio*, así como otras especies de bacterias patógenas (Lizárraga-Partida *et al.*, 1997). De acuerdo a lo reportado por Liltved *et al.* (1995) no es posible desarrollar de manera práctica una eclosión de nauplios en medios estériles, pero es posible controlar las fuentes potenciales de contaminación de patógenos, como el agua. En este trabajo se utilizó agua de mar previamente filtrada y esterilizada para evitar la contaminación por *Vibrio* en la eclosión de nauplios. Además, en el proceso de eclosión, los nauplios fueron previamente sometidos a un proceso de desencapsulación con cloro, el cual actúa como agente desinfectante. Sorgeloos *et al.* (1978) reporta que al desencapsular los quistes de *A. franciscana* se pierde el corion, el cual viene acompañado de esporas, bacterias y otros productos que pueden ser vía de contaminación para el cultivo. Lo anterior concuerda con el resultado obtenido en este trabajo, en donde posterior a la eclosión no se encontró la presencia de bacterias del género *Vibrio* con los métodos utilizados. Estos resultados pueden ser debido al proceso de desencapsulación por el cual fueron sometidos los quistes de *A. franciscana* antes de la eclosión.

Los nauplios de *A. franciscana* enriquecidos con LC-PUFAs son una excelente fuente de alimento vivo para satisfacer los requerimientos nutricionales en la larvicultura de crustáceos y peces marinos debido a su alto contenido de proteínas digestibles, ácidos grasos y su pequeño tamaño (450 μm) (Sorgeloos *et al.*,

2001). Las diatomeas son un aporte nutricional valioso para los nauplios de *A. franciscana* debido a su perfil nutricional, especialmente por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) que contribuyen al desarrollo de los nauplios (Fabregas *et al.*, 1998). Los nauplios de *A. franciscana* se alimentan de pequeñas microalgas, bacterias y protozoarios. El tamaño adecuado de las células de microalga para la alimentación de nauplios de *A. franciscana* está en un rango de 1 a 30 μm (Turcihan *et al.*, 2021). De acuerdo con lo anterior, la especie de diatomea *N. thermalis* utilizada en este trabajo tiene un tamaño de 22 μm y a la densidad de 250,000 cél. mL^{-1} resulta adecuada para ser ingerida por los nauplios de *A. franciscana*. Además, *N. thermalis* proporciona un perfil nutricional adecuado para el crecimiento para larvas de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) (Correa-Reyes *et al.*, 2009).

A medida que la concentración de alimento aumenta, los nauplios de *A. franciscana* tienen un menor gasto energético, debido al menor gasto energético por la búsqueda de alimento. Sin embargo, si la cantidad de alimento es excesiva este se aglomera en el aparato bucal formando una bola de alimento que no puede ser ingerida. Por lo anterior, a altas densidades de microalgas, a pesar de que el organismo tiene disponibilidad de alimento en abundancia, este no llega a ser ingerido y pasar al intestino, lo que provoca la muerte del nauplio (Le *et al.*, 2019). Lo anterior, podría explicar los resultados de esta investigación relativos a los menores valores de supervivencia de los nauplios de *A. franciscana*, al usar una alta concentración de 400,000 cél. mL^{-1} de *N. thermalis* y con respecto al tratamiento donde se utilizó una concentración intermedia de 250,000 cél. mL^{-1} . Estos resultados pueden ser debidos a que en el tratamiento con la mayor concentración de células de *N. thermalis* los nauplios de *A. franciscana* saturaron su atrio bucal impidiéndoles recibir alimento en el intestino y causa la muerte por falta de alimento.

4.1.4 Efecto de la aireación en el crecimiento de *V. campbellii*

Se encontró que en el tratamiento en cocultivo con *N. thermalis*, *A. franciscana* y *V. campbellii* utilizando aireación para el mantenimiento del cultivo, la densidad de células de *Vibrio* se mantuvo en una concentración promedio de 1×10^4 *V. campbellii* mL^{-1} hasta el final del experimento. De acuerdo a lo mencionado por Thompson *et al.* (2004) en cultivos de bacterias del género *Vibrio*, la aireación proporciona un mayor aprovechamiento de la materia orgánica debido a la mayor concentración de oxígeno y propiciando un mayor crecimiento y producción de metabolitos secundarios. Lo anterior sustenta lo obtenido en el presente trabajo, en donde en el tratamiento con aireación del cocultivo de *N. thermalis*, nauplios de *A. franciscana* y *V. campbellii*, no disminuyó la concentración de *V. campbellii* mL^{-1} . Por el contrario, en el tratamiento sin aireación, disminuyó la concentración de *V. campbellii*. Una posible

explicación de estos resultados acerca de la concentración de *V. campbellii* es que, al no tener aireación, no hubo una adecuada resuspensión de los desechos producidos por los nauplios de *A. franciscana* y de los productos de metabolismo de *N. thermalis*. Por esta razón, es probable que *V. campbellii* no tuviera un buen aprovechamiento de la materia orgánica disponible en los cocultivos.

Existen diversos factores ambientales que influyen en el crecimiento de las bacterias del género *Vibrio*, como la temperatura, la salinidad y la concentración de oxígeno, entre otros (Brumfield, 2021). Las bacterias del género *Vibrio* tienen la capacidad de realizar aerotaxis, es decir que pueden moverse hacia áreas con diferentes concentraciones de oxígeno (Boin y Häse, 2007). Taylor *et al.* (1999) mencionan que las bacterias al realizar aerotaxis optimizan la utilización del oxígeno para su metabolismo y así obtener una mayor eficiencia energética y supervivencia. Sin embargo, pueden ser guiadas a zonas ricas en oxígeno, pero deficientes en azúcares, vitaminas, aminoácidos o compuestos carbonados que puedan ser empleados como fuente de, donde las bacterias morirían por falta de carbono. Lo anterior concuerda con lo obtenido en este trabajo, en donde en el tratamiento control de *V. campbellii* en medio "f" y con aireación, disminuyó la concentración de *Vibrio* a 40 *V. campbellii* mL⁻¹, por el contrario, el tratamiento control de *V. campbellii* en medio "f" sin aireación, se mantuvo la concentración de *Vibrio* en densidades de 1 x10⁵ *V. campbellii* mL⁻¹. Estos resultados pueden ser debidos a que la aerotaxis realizada por *V. campbellii* genera una zona con exceso de oxígeno y en donde no existe una fuente de carbono metabolizable para *V. campbellii*, lo anterior posiblemente ocasiona que no haya crecimiento y reproducción de estas células por falta de aporte de carbono. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan comprobar estas hipótesis.

4.2 Bioensayo final de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo de *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*

4.2.1 Cocultivo de *V. campbellii* con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*

Las microalgas destacan como una buena alternativa en la lucha contra las enfermedades en la acuicultura. Diversas especies de microalgas han demostrado tener actividad antimicrobiana contra bacterias del género *Vibrio* (Shah *et al.*, 2018). Se ha demostrado que un cultivo de *Tetraselmis suecica* tiene actividad antimicrobiana contra varias especies de *Vibrio* (Austin, 1990). Por otro lado, las microalgas no solo han demostrado poseer actividad antimicrobiana, sino también capacidad de interferir en la comunicación celular bacteriana, el cual desempeña un papel clave en la virulencia bacteriana (Natrash *et al.*, 2011).

Las bacterias del género *Vibrio* producen compuestos alguicidas que pueden afectar en el crecimiento de las microalgas (Natrah *et al.*, 2014). Sin embargo, en este trabajo la concentración de *N. thermalis* aumentó en el tratamiento con *V. campbellii*. Esto se puede deber a que *V. campbellii* libera compuestos como ácidos grasos de cadena corta o exopolisacáridos en concentraciones pequeñas o que los cinco días de bioensayo no son suficientes para la producción y liberación de estos compuestos alguicidas. Por otra parte, las bacterias heterotróficas desempeñan un papel importante para el reciclaje de nutrientes, descomponiendo la materia orgánica y liberando nutrientes esenciales que pueden ser utilizados por las microalgas para su crecimiento (Mayali y Azam, 2004). En este trabajo, las bacterias heterotróficas tuvieron una concentración final de 20×10^5 UFC mL⁻¹, lo cual nos indica que los compuestos antimicrobianos producidos por *N. thermalis* solo afectan el crecimiento de la bacteria patógena *V. campbellii*. Es importante resaltar que su crecimiento exponencial en este trabajo pudo deberse a la gran cantidad de materia orgánica proveniente de la microalga y de las heces excretadas por los nauplios de *A. franciscana*.

Una de las técnicas más prometedoras que funciona contra las bacterias luminosas es el cultivo de agua verde. Un cultivo de agua verde es una técnica en la que se cultivan organismos acuícolas en agua donde crecen abundantemente microalgas (Corre *et al.*, 2000). Tendencia y de la Peña (2003), describen que el uso de aguas verdes es un método alternativo potencial para el control de poblaciones de bacterias del género *Vibrio* y que permite incrementar la supervivencia del organismo en cultivo (Douillet, 2000; Chythanya *et al.*, 2002). En este trabajo, el crecimiento y la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* posiblemente se vio beneficiado por los nutrientes aportados en la ingestión de *N. thermalis*. Sin embargo, no podemos atribuir que la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* fue por la protección otorgada por *N. thermalis* a los nauplios o bien por un efecto directo de *N. thermalis* contra la bacteria *V. campbellii*, o bien fue causada por un efecto sinérgico en los nauplios de *A. franciscana* y en la inhibición del crecimiento de *V. campbellii*.

4.2.2 Retos de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*

El presente estudio demostró que *N. thermalis* a una densidad inicial de 250,000 cel. mL⁻¹ es capaz de disminuir el crecimiento de *V. campbellii* (inoculado a una concentración de 1×10^5 *V. campbellii* mL⁻¹), teniendo una concentración de 53 *V. campbellii* mL⁻¹ al final del bioensayo (día 5) en el tratamiento de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana*. Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra (2017), obtuvieron una inhibición de *V. campbellii* al día 4 en cocultivo con la diatomea *Nitzschia frustulum*.

La concentración inicial de *V. campbellii* utilizada fue de 1×10^3 *V. campbellii* mL⁻¹, la cual es inferior a la utilizada en el presente trabajo. De manera similar, este efecto inhibitorio del crecimiento de *V. campbellii* empleando cultivos de especies diatomeas del género *Nitzschia* fue descrito por Ayala-García (2021), quien logró la inhibición del crecimiento de *V. campbellii* en cocultivo con la diatomea *N. thermalis* al cuarto día de haber iniciado los ensayos con una densidad de celular de 400,000 cél. de *N. thermalis* mL⁻¹. Este último autor describe que empleó una concentración inicial de 1×10^2 *V. campbellii* mL⁻¹, concentración inferior a lo utilizado en la presente investigación. Es importante resaltar que en los estudios realizados por Molina-Cárdenas y Sánchez-Saavedra (2017) y por Ayala-García (2021) la evaluación de la concentración de *V. campbellii* en los cocultivos se realizó únicamente por el método de filtración, el cual permitió determinar solamente la presencia o ausencia de *Vibrio*, sin cuantificar con precisión la concentración de esta bacteria patógena en los tratamientos experimentales. Es muy importante destacar que en este trabajo sí fue corroborada la concentración inicial de *V. campbellii* en los distintos tratamientos experimentales mediante conteos en placa. Esta corroboración de la concentración inicial de *V. campbellii* nos permitió verificar la concentración real con la que se iniciaron los distintos tratamientos experimentales. Si bien en este estudio no se logró tener una inhibición total de *V. campbellii*, sí fue posible reducir significativamente la concentración de esta bacteria patógena en los cocultivos. Estos resultados pueden ser debido a la alta densidad de UFC de *V. campbellii* con la que se inició el bioensayo (1×10^5 *V. campbellii* mL⁻¹), densidad mayor a la empleada en los trabajos realizados por Molina-Cárdenas (2011) y Ayala-García (2021) y que anteriormente no se había utilizado en ninguno ensayo previo.

De acuerdo con lo señalado por Borowitzka (1995), las microalgas poseen un gran número de metabolitos o productos extracelulares que han demostrado que tienen actividad antimicrobiana. A partir de diversos estudios se han identificado compuestos responsables de la actividad antimicrobiana, tales como: ácidos grasos y lípidos (Defoirdt *et al.*, 2006; Desbois *et al.*, 2010), terpenoides, carbohidratos (Duff *et al.*, 1966), polisacáridos (Borowitzka, 1995; Amaro *et al.*, 2011). Si bien en este estudio no se puede identificar con certeza cuál de los metabolitos anteriores es el que presenta la actividad antimicrobiana contra *V. campbellii*. Los compuestos antimicrobianos producidos por las microalgas varían según la especie y las condiciones de crecimiento, pero en la mayoría de los casos su actividad suele estar relacionada con los ácidos grasos y sus derivados (Soto-Rodríguez *et al.*, 2021).

Los ácidos grasos han tomado gran relevancia en la acuicultura, como potencial candidatos para disminuir el uso de antibióticos en cultivos acuícolas (Defoirdt *et al.*, 2011). Defoirdt *et al.* (2006), evaluaron el efecto inhibitorio de cinco tipos de ácidos grasos (ácido fórmico, acético, propiónico, butírico y valérico) contra la cepa patógena de *V. campbellii*. Los cinco tipos de ácidos grasos a una concentración utilizada de 100

mM lograron inhibir el crecimiento de *V. campbellii*. También se realizó una prueba para evaluar la protección otorgada de estos ácidos grasos a nauplios de *A. franciscana* en cocultivo con *V. campbellii*. La adición de 20 mM de los ácidos grasos en el cultivo resultó en un aumento significativo de la supervivencia de los nauplios infectados con *V. campbellii*. Lo anterior indica que los ácidos grasos utilizados podrían ser una alternativa para el biocontrol de bacterias del género *Vibrio*.

De acuerdo a Ricke (2003), las propiedades bactericidas de los ácidos grasos pueden cambiar dependiendo del estado fisiológico de los organismos en cultivo y las características fisicoquímicas del entorno. Los ácidos grasos de cadena corta tienen la capacidad de atravesar la membrana celular de las bacterias y disociarse en el citoplasma alcalino, lo que va a aumentar la concentración intracelular de protones (Cherrington *et al.*, 1991). Lo anterior genera un mayor gasto energético en las células bacterianas para mantener un pH intracelular en el nivel óptimo de crecimiento y no tendrá suficiente energía para ser utilizada en otros procesos metabólicos y, en consecuencia, se inhibe la densidad celular de *V. campbellii*.

El censado del quorum es un mecanismo mediante el cual las bacterias regulan la expresión génica en respuesta a la densidad poblacional utilizando moléculas señalizadoras (Brackman *et al.*, 2011; Defoirdt *et al.*, 2011). Cuando se alcanza una concentración específica de la molécula señalizadora extracelular, se activa el censado del quorum, el cual va a desencadenar señales de transducción que resultaran en un cambio en la expresión génica, lo que permite a la población bacteriana trabajar en conjunto y presentan un comportamiento de manera colectiva (Ng y Bassler, 2009). Diversos estudios han propuesto la interrupción del censado del quorum como una nueva estrategia antiinfecciosa para la acuicultura, a partir de los compuestos con actividad antimicrobiana (Defoirdt *et al.*, 2005; Natrah *et al.*, 2011).

El auto inductor 2 (AI-2) es una molécula de tipo N-acyl-L-homoserin-lactona que media el censado del quorum, se demostró que regula la virulencia de *V. harveyi* hacia *A. franciscana* (Defoirdt *et al.*, 2005). El auto inductor AI-2 permite a diferentes especies de bacterias comunicarse entre sí, representando un papel importante en la regulación de la expresión génica y la coordinación de comportamientos específicos en comunidades bacterianas (Higgins *et al.*, 2007). Defoirdt *et al.* (2006), evaluaron la producción del AI-2 en cepas bacterianas de *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus*. Una vez confirmada la producción de este auto inductor en las especies bacterianas, se realizó un ensayo para evaluar la protección otorgada por la furanona a nauplios de *A. franciscana* retados con cada una de las cepas bacterianas. La supervivencia de *A. franciscana* fue al 55% al utilizar 20 mg L⁻¹ de furanona, lo que demuestra que a esa concentración de la furanona es eficiente para controlar el crecimiento de *V. campbellii*. Por su parte, el tratamiento control sin la adición de este compuesto presentó una supervivencia menor al 5%. Se propone

que la supervivencia de *A. franciscana* se debe a la disrupción del censado del quorum de *V. campbellii* por parte de la furanona y no a una interacción con el organismo.

De manera similar, se ha visto que algunos extractos naturales de plantas como el café y el té tienen compuestos polifenólicos (pirogalol), se ha reportado que poseen capacidad de interrumpir el censado del quorum de otras especies de *Vibrio*, como *V. harveyi*. Tal es el caso del estudio realizado por Defoirdt *et al.* (2013), quienes evaluaron la supervivencia de *A. franciscana* cuando se enfrentaba a *V. harveyi* utilizando pirogalol para evaluar sus propiedades antimicrobianas. Utilizaron tres concentraciones diferentes de este compuesto natural (0.30%, 0.10% y 0.03%), para los tres casos la supervivencia de *A. franciscana* fue superior al 85%. En contraste, cuando no se aplicaba el compuesto natural, la supervivencia de *A. franciscana* era inferior al 50%, lo que sugiere que la supervivencia de *A. franciscana* se deba a la capacidad del compuesto natural para la disrupción del censado del quorum de *V. harveyi*.

Los compuestos que muestran capacidad para lograr la disrupción del censado del quorum son de gran importancia, debido a que pueden prevenir la formación de bio películas y factores de virulencia que confieren en la patogenicidad de las bacterias (Casillas-Vargas *et al.*, 2021). Es por eso que es importante encontrar nuevos agentes que ayuden a la disrupción de censado del quorum, y así, ir erradicando el uso de antibióticos y reducir el riesgo de que las bacterias adquieran resistencia bacteriana.

En el presente estudio, *N. thermalis* podría estar liberando productos extracelulares con actividad antimicrobiana como los ácidos grasos, carbohidratos o pigmentos. Sin embargo, no podemos atribuir la disrupción del censado del quorum a alguna de estas opciones, debido a que no se realizaron los ensayos pertinentes o cuantificaron las moléculas correspondientes para elucidar el mecanismo de acción.

Si bien ya se ha reportado el efecto inhibitorio que tiene *N. thermalis* contra *V. campbellii*, aún no existen trabajos de investigación en donde se haya logrado inhibir a *V. campbellii* en concentraciones tan elevadas como las usadas en esta investigación y tampoco han sido puestos a prueba en un cultivo con otros organismos. Es por esto, que los resultados obtenidos en el presente trabajo representan una tecnología prometedora para poder controlar la vibriosis en los cultivos acuícolas.

Por otra parte, Kokou *et al.* (2012) demostró que tres especies de *Vibrio* (*V. lentus*, *V. scopthalmi* y *V. alginolyticus*) tienen la capacidad de crecer en medio "f". Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, muestran que la cepa *V. campbellii* logró mantener su concentración hasta el final del bioensayo (día 5) solo medio "f". Estos resultados indican que la disminución en la concentración de *V.*

campbellii fue por acción de los metabolitos excretados por *N. thermalis* y no por la composición del medio de cultivo, el cual no resultó tóxico para *V. campbellii* y a pesar de no tener una fuente de carbono permite que se mantenga la concentración de esta especie de bacteria patógena.

4.2.3 Supervivencia de nauplios de *A. franciscana* en cocultivo con *N. thermalis* y *V. campbellii*

En el reto de inhibición final de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana* la supervivencia promedio de *A. franciscana* fue de 55% al final del experimento (día 5). Cabe señalar que en el tratamiento control de nauplios de *A. franciscana* en el reto con *V. campbellii* la supervivencia de los nauplios fue de 0% al día 5. Soto-Rodríguez (2003) evaluó el efecto de distintas cepas de *V. harveyi* y *V. campbellii* en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana* inoculados a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹. En ese estudio la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* con la cepa de *V. campbellii* CAIM 416 (clave CICESE 559) fue menor al 45% a las 48 h. Ese resultado contrasta con lo encontrado en el tratamiento control y que no fue inoculado con la cepa bacteriana y en el cual se obtuvo una supervivencia mayor al 80%. Esto indica que la especie de bacteria *V. campbellii* es patógena para los nauplios de *A. franciscana* a una concentración de 1×10^5 *V. campbellii* mL⁻¹, concentración bacteriana que fue empleada en este estudio durante el reto.

Las bacterias del género *Vibrio* utilizan diferentes mecanismos de infección en *A. franciscana*, uno de ellos es la colonización de superficies del organismo, debido a que los *vibrios* tienen la capacidad de adherirse a las superficies como el intestino de los nauplios de *A. franciscana*, donde se facilita la reproducción de la bacteria hasta causar la muerte del organismo (Defoirdt y Sorgeloos, 2012). Otro mecanismo es la manipulación del sistema inmunológico. Vadstein (1997) reporta que bacterias del género *Vibrio* interfieren con el sistema inmunológico de *Artemia*, debilitando la respuesta de defensa de los nauplios, lo cual los vuelve más susceptibles a las infecciones provocadas por *vibrios*.

Zheng *et al.* (2021), evaluaron el efecto protector contra *V. campbellii* de dos aceites esenciales obtenidos de las hojas de árbol de té (*Malaleuca alternifolia*) y de *Litsea citrata* en nauplios de *A. franciscana*. Los aceites esenciales son extractos obtenidos mediante destilación con vapor y los cuales se pueden utilizar partes de plantas como flores, hojas, raíces, semillas, cortezas o tallos. Su composición es mayoritariamente compuestos aromáticos como aldehídos, terpenoides, fenoles y ésteres (Nazzaro *et al.*, 2017) Las concentraciones de los aceites esenciales que se utilizaron en los tratamientos con *V. campbellii* y *A. franciscana* tuvieron valores de 0.0001% a 0.003%. La concentración inicial de *V. campbellii* en los

tratamientos fue de 1×10^7 *V. campbellii* mL⁻¹. La supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* fue mayor al 90% para *M. alternifolia* al usar una concentración de 0.0008% y para *L. citrata* una concentración de 0.002%, lo que demuestra que, a bajas concentraciones, estos aceites esenciales son eficientes para controlar el crecimiento de *V. campbellii*. Por otra parte, el tratamiento sin la adición de estos aceites esenciales presentó una supervivencia menor al 40%. Lo anterior sugiere que estos aceites esenciales utilizados en este estudio pueden modular algunos de los factores de virulencia de *V. campbellii*, como la motilidad de natación y la actividad de enzimas como enzimas líticas, así como mejorar la respuesta inmunológica de los nauplios de *A. franciscana*. Los resultados indican que los ácidos grasos esenciales aumentan la expresión de genes del sistema inmune.

Se menciona que para el buen desarrollo de nauplios de *Artemia* de distintas especies se requieren las siguientes condiciones ambientales de mantenimiento: salinidad de 36 ppt, pH en valores mayores de 7.5, temperatura entre 25 a 30 °C, oxígeno en concentraciones entre 5 a 7 mg L⁻¹ y tolera concentraciones de amonio hasta 50 ppm. El tamaño de partículas alimenticias adecuadas para *Artemia* oscilan entre 1 y 30 µm en los primeros días de vida y de 45 a 50 µm para la etapa de adulto. Se recomienda una densidad de 10,000 cél. mL⁻¹ para partículas de 25 µm. Sin embargo, este valor puede cambiar según las características de cada especie de microalga. La eficiencia de filtración de las partículas alimenticia es muy baja en las primeras etapas de vida de los nauplios debido a que solo cuentan con un par de apéndices para la captura del alimento. Conforme crecen los nauplios de *Artemia* aumenta su capacidad de filtración hasta el valor máximo en etapa adulta cuando tiene los 11 toracópodos bien desarrollados (Castro-Gallardo, 1980).

En diversos estudios se ha descrito que se puede usar *Artemia* para mejorar la calidad del agua en sistemas acuícolas, debido a su alta capacidad de tolerancia a elevadas concentraciones de productos nitrogenados en proporciones de C:N de 20:1 y ayuda en la eficiente conversión del nitrógeno amoniacal total, nitritos y nitratos (Abbaszadeh *et al.*, 2022). En un cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* y *A. franciscana* mantenida en distintas densidades (0, 1, 2, 3 y 4 organismo L⁻¹), se encontró alta tolerancia a la concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) con la mayor densidad de *Artemia* al ser mantenidos con la siguiente calidad de agua: TAN 8 mg L⁻¹, nitritos hasta 0.1 mg L⁻¹, nitratos hasta 8 mg L⁻¹ y fosfatos hasta 10 mg L⁻¹ (Campaña-Torres *et al.*, 2010).

En el reto de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana* se obtuvieron valores de la calidad de agua dentro del rango mencionado por otros autores (Castro-Gallardo, 1980; Abbaszadeh *et al.*, 2022; Campaña-Torres *et al.*, 2010), lo cual indica que en los tratamientos experimentales no tuvieron un efecto negativo debido a la calidad de agua. Los bajos valores de pH en los

tratamientos con nauplios de *A. franciscana* y *V. campbellii* y en el tratamiento con *N. thermalis* y *V. campbellii*, pueden ser resultado de la degradación de la materia orgánica y de uso de compuestos nitrogenados para el mantenimiento del crecimiento de *V. campbellii*.

Capítulo 5. Conclusiones

La densidad celular de *N. thermalis* aumentó en cocultivo de *V. campbellii* y nauplios de *A. franciscana* en los cultivos.

Los nauplios de *A. franciscana* tienen una supervivencia mayor del 80% y el número de células de *N. thermalis* disponibles para la alimentación de los nauplios es mayor al emplear una densidad inicial de 250,000 cél. mL⁻¹ de *N. thermalis* en los cocultivos en comparación con los tratamientos de 100,000 y 400,000 cél. mL⁻¹.

La densidad de *V. campbellii* y la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* fueron mayores en los cocultivos sin aireación, por consiguiente, en el bioensayo de inhibición de *V. campbellii* en cocultivo con *N. thermalis* y nauplios de *A. franciscana* no se empleó aireación.

La concentración de *V. campbellii* disminuyó a 53 *V. campbellii* mL⁻¹ al día 5 en presencia de *N. thermalis* durante su fase exponencial al estar en cocultivo con nauplios de *A. franciscana*. El tratamiento control de *V. campbellii* en medio "f" se mantuvo en valores de 1 x10⁵ UFC mL⁻¹ hasta el día 5.

La supervivencia promedio de nauplios de *A. franciscana* fue de 55% al día 5 en presencia de *N. thermalis* al estar en cocultivo con *V. campbellii*, mientras que el tratamiento sin la presencia de *N. thermalis* obtuvo una supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* del 0%.

El cultivo de *N. thermalis* puede ser utilizado como método de control de la patogenicidad de *V. campbellii* en cultivos en nauplios de *A. franciscana*.

Capítulo 6. Recomendaciones

Evaluar la presencia de *N. thermalis* en cultivos de organismos de importancia acuícola en etapas larvales en presencia de *V. campbellii* para cuantificar la supervivencia de los organismos de cultivo y los posibles efectos inhibitorios de la bacteria patógena.

Identificar el o los posibles mecanismos de inhibición de *N. thermalis* contra *V. campbellii*.

Identificar y utilizar el o los posibles metabolitos producidos por *N. thermalis* contra *V. campbellii*.

Realizar los ensayos con *N. thermalis*, *V. campbellii* y nauplios de *A. franciscana* en un mayor volumen de cultivo para verificar el efecto inhibitorio contra *V. campbellii* y la supervivencia de nauplios de *A. franciscana*.

Literatura citada

- Abbaszadeh, A., Mozanzadeh, M. T., Qasemi, A., Oujifard, A. & Nafisi, M. (2022). Effects of the addition of *Calanopia elliptica*, *Artemia franciscana*, and *Brachionus rotundiformis* in a nursery biofloc system on water quality, growth, gut morphology, health indices, and transcriptional response of immune and antioxidant-related genes in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture International* 30(2), 653-676. doi: [10.1007/s10499-021-00823-1](https://doi.org/10.1007/s10499-021-00823-1)
- Amaro, H., Guedes, A. & Malcata, F. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88(10),340-345. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>
- Andrade-Moreno, B. (2021) Efecto de la irradiancia en la composición bioquímica de las diatomeas *Amphora helenensis* y *Nitzschia thermalis* f. *curta*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California] Repositorio institucional: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3616>
- Anguiano-Beltrán, C. (1996). Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y poslarvas de abulón rojo *Haliotis rufescens*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California] Repositorio institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1951>
- Austin, B. & Allen, D. A. (1982). Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*, 26 (3-4), 369-383. doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90170-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90170-3)
- Austin, B. & Day, J. G. (1990). Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 90, 389-392. doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90261-K](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90261-K)
- Austin, B. & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 119–124. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>
- Ayala-García, J. C. (2021). Efecto inhibitorio de dos especies de diatomeas contra *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California] Repositorio Institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3596>
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Boin, M. & Häse, C. (2007). Characterization of *Vibrio cholerae* aerotaxis. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 193-201. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00931.x>
- Borowitzka, M. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7, 3-15. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00003544>

- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. & Coenye, T. (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), 2655-2661. doi: <https://doi.org/10.1128/aac.00045-11>
- Bradford, A., Cheryl, A. & Joy G. (1994). Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. En: Wachsmuth, I.K., Blake, P.A. y Olsvic, O. (ed.). *Vibrio cholerae* and *Cholera*. *American Society for Microbiology*. 465 pp. doi: <https://doi.org/10.1128/9781555818364.ch1>
- Brumfield, K., Usmani, M., Chen, K., Gangwar, M., Jutla, A., Huq, A. & Colwell, R. (2021). Environmental parameters associated with incidence and transmission of pathogenic *Vibrio* spp. *Environmental Microbiology*, 23(12), 7314-7340. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15716>
- Campaña-Torres, A., Martínez-Córdova, L. R., Villarreal-Colmenares, H. & Cortés-Jacinto, E. (2010). Evaluation of different concentrations of adult live *Artemia* (*Artemia franciscana*, Kellogs 1906) as natural exogenous feed on the water quality and production parameters of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) pre-grown intensively. *Aquaculture Research*, 42(1), 40-46. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02527.x>
- Cárdenas-Carreón, A.A. 2019. Desarrollo y evaluación *in vitro* de andamios a base de colágeno y compuestos fitoquímicos para cicatrización. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.] Repositorio institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3059>
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Del Valle, R., Carballeira, N. & Sanabria-Ríos, D. (2021). Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, 82, 101093. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101093>
- Castellanos-Ibarra, A. (2023). Efecto inhibitorio de diatomeas contra bacterias patógenas del género *Vibrio* en acuicultura. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.] Repositorio Institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3839>
- Castro-Barreda, T. (1980). *Artemia* sp. en investigación y docencia. Cuadernos CBS. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
- Charoonnart, P., Purton, S. & Saksmerprom, V. (2018). Applications of microalgal biotechnology for disease control in aquaculture. *Biology*, 7(2), 24. doi: <https://doi.org/10.3390/biology7020024>
- Cherrington, C., Hinton, M., Mead, G. & Chopra, I. (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in Microbial Physiology*, 32, 87-108. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60006-5)
- Chythanya, R., Karunasagar, I. & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208(1-2), 1-10. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00714-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00714-1)
- Cisneros, R. & Vinatea, E. (2009). Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellogg 1906 utilizando diferentes dietas. *Ecología Aplicada*, 8(1/2), 9-14. doi: <https://doi.org/10.21704/rea.v8i1-2.377>

- Corre, V., Janeo, R., Caipang, C. & Calipe, A. (2000). Use of probiotics and reservoirs with "green water" and other tips for successful shrimp culture. *Aquaculture Asia*, 5(2), 34-38. doi: https://www.jstage.jst.go.jp/article/fishsci1994/68/sup1/68_sup1_835/pdf
- Correa-Reyes, J. G., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Viana, M. T., Flores-Acevedo, N. & Vásquez-Peláez, C. (2009). Effect of eight benthic diatoms as feed on the growth of red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Journal of Applied Phycology*, 21, 387-393. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9381-x>
- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W. & Bossier P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnology*, 25(10), 472-9. doi: [10.1016/j.tibtech.2007.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.001)
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2005). The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology*, 7(8), 1239-1247. doi: [10.1111/j.1462-2920.2005.00807.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00807.x)
- Defoirdt, T., Brackman, G. & Coenye, T. (2013). Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence?. *Trends in Microbiology*, 21(12), 619-624. doi: [10.1016/j.tim.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.09.006)
- Defoirdt, T., Halet, D., Sorgeloos, P., Bossier, P. & Verstraete, W. (2006). Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture*, 261(2), 804-808. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.038>
- Defoirdt, T. & Sorgeloos, P. (2012). Monitoring of *Vibrio harveyi* quorum sensing activity in real time during infection of brine shrimp larvae. *The ISME Journal*, 6(12), 2314-2319. doi: [10.1038/ismej.2012.58](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.58)
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P. & Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*. 14, 251-258. doi: [10.1016/j.mib.2011.03.004](https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004)
- Desbois, A. & Smith, V. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 1629-1642. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Douillet, P. A. (2000). Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 1. Evaluation of commercial products and pure isolates. *Aquaculture*, 182:241-248. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00271-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00271-9)
- Duff, D., Bruce, D. & Antia, J. (1966). The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Canadian Journal of Microbiology*, 12(5), 877-884. doi: <https://doi.org/10.1139/m66-120>
- Eguchi, M., Fujiwara, E. & Miyamoto, N. (2000). Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: adaptation or debilitation?. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6(2), 126-129. doi: <https://doi.org/10.1007/PL00012152>
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E. D., Arredondo-Vega, B. O. & Patiño, M. (1998). Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. *Aquaculture*, 169(3-4), 167-176. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00376-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00376-7)

- Falaise, C., François, C., Travers, M. A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V. & Mouget, J. L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*, 14(9), 159. doi: <https://doi.org/10.3390/md14090159>
- FAO Food and Agriculture Organization. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma, FAO. <https://www.fao.org/3/ca9229es/online/ca9229es.html>
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://www.fao.org/3/cc0461es/online/cc0461es.html>
- Farisa, M., Namaskara, K., Yusuf, M. & Desrina, M. (2019). Antibacterial potention of extract of rotifers fed with different microalgae to control *Vibrio harveyi*. *Earth and Environmental Science*, 246. doi: [10.1088/1755-1315/246/1/012058](https://doi.org/10.1088/1755-1315/246/1/012058)
- García-Lagunas, N. (2003). Bioprospección de compuestos activos de cianobacterias aisladas de estanques de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). [Tesis de licenciatura en Biología Marina. Universidad del Mar]. Repositorio institucional <http://localhost:8383/jspui/handle/123456789/620>
- Giffard-Mena, I. (1999). Incidencia de bacterias luminiscentes en cultivos larvarios de *Penaeus stylirostris*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2976>
- Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vázquez-Juárez, R., Thompson, F. & Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*: related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150, 1769–1777. doi: [10.1099/mic.0.26797-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.26797-0)
- Gómez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson, C.C., Garcia-Gasca, A., Roque, A. & Swings, J. (2004). *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 261-265. doi: [10.1099/ijs.0.02775-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02775-0)
- González-Davis, O. (2010). Bioprospección de cianobacterias y microalgas como agentes de biocontrol contra *Vibrio campbellii* m1 y su uso en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. <https://biblioteca.cicese.mx/catalogo/tesis/ficha.php?id=18562>
- Guillard, R.L. & Rhyter, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*, 8, 229-239. doi: [10.1139/m62-029](https://doi.org/10.1139/m62-029)
- Higgins, D., Pomianek, M., Kraml, C., Taylor, R., Semmelhack, M. & Bassler, B. (2007). The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature*, 450(7171), 883-886. doi: <https://doi.org/10.1038/nature06284>
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B.E. & Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 255-266. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x>

- Ina-Salwany, M.Y., Al-Saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M.N.A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T. & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 3-22. doi: <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Jiménez-Valera S. & Sánchez-Saavedra, M.P. (2016). Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Peninsula México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4): 689-702. doi: <https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-4>
- Kaur-Kahlon, G., Kumar, B. K., Ruwandepika, H. A., Defoirdt, T. & Karunasagar, I. (2021). Quorum sensing regulation of virulence gene expression in *Vibrio harveyi* during its interaction with marine diatom *Skeletonema marinoi*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(4), 2507-2519. doi: <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.4.78>
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M. & Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43, 1520–1527. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02955.x>
- Lavaud, J., Strzepek, R.F. & Kroth, P.G. (2007) Photoprotection capacity differs among diatoms: possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography*, 52:1188–119. doi: [10.4319/lo.2007.52.3.1188](https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.3.1188)
- Le, T., Hoa, N., Sorgeloos, P. & Van Stappen, G. (2019). *Artemia* feeds: a review of brine shrimp production in the Mekong Delta, Vietnam. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1169-1175. doi: [10.1111/raq.12285](https://doi.org/10.1111/raq.12285)
- Lightner, D. (1993). Diseases of penaeid shrimp. En: Handbook of mariculture: Crustacean Aquaculture (Segunda edición) Volumen 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. doi: https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/36652/noaa_36652_DS1.pdf
- Liltved, H., Hektoen, H. & Efraimsen, H. (1995). Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering*, 14(2), 107-122. doi: [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(94\)P4430-J](https://doi.org/10.1016/0144-8609(94)P4430-J)
- Lizárraga-Partida, M., Montoya-Rodríguez, L. & Gendrop-Funes, V. (1997). The use of bacterial counts in two mexican shrimp hatcheries. *Ciencias Marinas*, 23(1), 129–140. doi: <https://doi.org/10.7773/cm.v23i1.770>
- López-Torres, M. A. & Lizárraga-Partida, M.L. (2001). Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture*, 194, 11–20. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00505-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00505-6)
- Mayali, X. & Azam, F. (2004). Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(2), 139-144. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00538.x>
- Molina-Cárdenas, C.A., Licea-Navarro, A.F. & Sánchez-Saavedra, M.P. (2020). Effects of *Vibrio cholerae* on fatty acid profiles in *Isochrysis galbana*. *Algal Research*, 46, 101802. doi: [10.1016/j.algal.2020.101802](https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101802)
- Molina-Cárdenas, C. & Sánchez-Saavedra, M.P. (2017). Inhibitory effect of benthic diatom species on three aquaculture pathogenic vibrios. *Algal Research*, 27, 131-139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.004>

- Molina-Cárdenas, C.A., Sánchez-Saavedra, M.P. & Lizárraga-Partida, M.L. (2014). Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*, 1, 1-9. doi: [10.1007/s10811-014-0270-1](https://doi.org/10.1007/s10811-014-0270-1)
- Natrah, F., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, M. & Defoirdt, T. (2014). Significance of microalgal–bacterial interactions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 48-61. doi: [10.1111/raq.12024](https://doi.org/10.1111/raq.12024)
- Natrah, F., Defoirdt, T., Sorgeloos, P. & Bossier, P. (2011). Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Marine Biotechnology*, 13, 109-126. doi: [10.1007/s10126-010-9346-3](https://doi.org/10.1007/s10126-010-9346-3)
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86. doi: <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Ng, W. & Bassler, B. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43, 197-222. doi: [10.1146/annurev-genet-102108-134304](https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304)
- Oppenheimer C. H. & ZoBell, C.E. (1952). The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *Journal of Marine Research*, 11:10–18. doi: https://elischolar.library.yale.edu/journal_of_marine_research/755
- Packer, L. & Cadenas, E. (2011). Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(1):26-32. doi: <https://doi.org/10.3164/jcbrn.11-005FR>
- Pradhan, J., Das, S. & Das, B. (2014). Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(32), 809-818. doi: [10.5897/AJPP2013.0002](https://doi.org/10.5897/AJPP2013.0002)
- Prelle, L., Albrecht, M., Karsten, U., Damer, P., Giese, T., Jähns, J., Müller, S., Schulz, L., Viertel, L. & Glaser, K. (2021). Ecophysiological and cell biological traits of benthic diatoms from coastal wetlands of the Southern Baltic Sea. *Frontiers in Microbiology*, 12, 642811. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642811>
- Quiroz-Guzmán, E. (2013). Control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana* mediante un consorcio de bacterias probióticas y fagos. [Tesis de doctorado en Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas La Paz, Baja California Sur, México]. Repositorio institucional <http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/16745>
- Ricke, S. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82(4), 632-639. doi: [10.1093/ps/82.4.632](https://doi.org/10.1093/ps/82.4.632)
- Sarthou, G., Timmermans, K., Blain, S. & Tréguer, P. (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*. 53, 25-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seares.2004.01.007>
- Scholz, B. (2014). Effects of varying pH on the growth and physiology of five marine microphytobenthic diatoms isolated from the Solthorn tidal flat (Southern North Sea, Germany). *Phycologia*, 53(3), 252-264. doi: <https://doi.org/10.2216/13-240.1>

- Shah, M., Lutz, G., Alam, A., Sarker, P., Kabir-Chowdhury, M., Parsaeimehr, A. & Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30, 197-213. doi: [10.1007/s10811-017-1234-z](https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z)
- Simidu, U. & Tsukamoto, K. (1980). A method of the selective isolation and enumeration of marine *Vibrionaceae*. *Microbial Ecology*, 6 (1980): 181-184. doi: [10.1007/BF02010557](https://doi.org/10.1007/BF02010557)
- Sorgeloos, P., Dhert, P. & Candreva, P. (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200(1-2). doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00698-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00698-6)
- Sorgeloos, P., Persoone, G., Baeza-Mesa, M., Bossuyt, E. & Bruggeman, E. (1978). The use of *Artemia* cysts in aquaculture: the concept of "hatching efficiency" and description of a new method for cyst processing. *The annual meeting-World Mariculture Society*, 9 (1-4). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1978.tb00285.x>
- Soto-Rodríguez S., Roque, A., Lizárraga-Partida, M., Guerra-Flores, A. & Gómez-Gill, B. (2003). Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53(231), 231-240. doi: [10.3354/dao053231](https://doi.org/10.3354/dao053231)
- Soto-Rodríguez, S. A., Magallón-Servín, P., López-Vela, M. & Nieves-Soto, M. (2022). Inhibitory effect of marine microalgae used in shrimp hatcheries on *Vibrio parahaemolyticus* responsible for acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research*, 53, 1337-1347. doi: [10.1111/are.15668](https://doi.org/10.1111/are.15668)
- Sullivan, T. J., & Neigel, J. E. (2018). Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. *Journal of invertebrate pathology*, 151, 82-90. DOI: [10.1016/j.jip.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.004)
- Tamura, K., Shimada, S. & Prescott, L.M. (1971). *Vibrio* agar: A new plating medium for isolation of *Vibrio cholerae*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 24 ,127. doi: [10.7883/yoken1952.24.125](https://doi.org/10.7883/yoken1952.24.125)
- Taylor, B., Zhulin, I. & Johnson, M. (1999). Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 103-128. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.103>
- Tendencia, E. & de la Peña, M. (2003). Investigation of some components of the green water system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture*, 218, 115-119. doi: [10.1016/S0044-8486\(02\)00524-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00524-0)
- Tendencia, E., de la Peña, M., Fermín, A., Lio-Po, G., Choresca, C. & Inui, Y. (2004). Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 232(1-4), 145–152. doi: [10.1016/S0044-8486\(03\)00531-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00531-3)
- Thompson, F., Lida, T. & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431. doi: <https://doi.org/10.1128/mnbr.68.3.403-431.2004>
- Turcihan, G., Turgay, E., Yardımcı, R. E. & Eryalçın, K. M. (2021). The effect of feeding with different microalgae on survival, growth, and fatty acid composition of *Artemia franciscana* metanauplii and on predominant bacterial species of the rearing water. *Aquaculture International*, 29(5), 2223-2241. doi: [10.1007/s10499-021-00745-y](https://doi.org/10.1007/s10499-021-00745-y)

- USDA (2011). Bioseguridad y prevención de enfermedades en la acuicultura. Iowa, 2011. doi: <https://www.cfsph.iastate.edu/pdf-library/Acreditacion-Veterinaria/NVAP-Mod-15-AQBIO.pdf>
- Vadstein, O. (1997). The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155(1-4), 401-417. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00114-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00114-2)
- Zheng, X., Han, B., Kumar, V., Feyaerts, A.F., Van Dijck, P. & Bossier, P. (2021). Essential oils improve the survival of gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*) challenged with *Vibrio campbellii*. *Frontiers in Immunology*, 2021:693932. doi: [10.3389/fimmu.2021.693932](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.693932)

Anexos

Antibiograma

Se realizó un antibiograma para determinar la susceptibilidad de *V. campbellii* al antibiótico ciprofloxacina en cuatro diferentes concentraciones (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) siguiendo la metodología descrita por Cárdenas-Carreón (2019). Las evaluaciones se realizaron por triplicado para cada caso.

Para evaluar la actividad antimicrobiana se llevó a cabo por el método de difusión de disco en agar, la cual consiste en utilizar una caja Petri de 10 cm con doble capa de agar, una capa de base sólida y una capa líquida que contiene el inóculo de *V. campbellii*, la cual es vertida sobre la capa sólida con el fin de obtener un crecimiento bacteriano uniforme sobre la superficie de la caja Petri (Balouiri *et al.*, 2016).

Se utilizaron sensidiscos estériles, con diámetro de 6 mm los cuales fueron impregnados con 30 μL de las soluciones preparadas con ciprofloxacina en las cuatro concentraciones (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se utilizó agua destilada como control negativo y el ensayo se realizó por triplicado. Una vez impregnados con cada concentración de antibiótico, los sensidiscos se dejaron secar en una campana de extracción, para evitar su contaminación. Una vez impregnados y secos los sensidiscos se colocaron en las cajas Petri con medio ZoBell (Figura 11).

Para obtener el inóculo bacteriano de *V. campbellii* se sembró densamente una caja con medio ZoBell con la cepa de *V. campbellii* y se incubó a 28 °C durante 24 h. Posterior al tiempo de incubación, se removió el crecimiento bacteriano con ayuda de suero fisiológico y la punta de una pipeta serológica, teniendo precaución de no raspar la superficie del agar. Posteriormente, se ajustó la turbidez de la solución a 0.08-0.12 leída a 625 nm con ayuda de un espectrofotómetro, lo cual equivale a una concentración aproximada de 1.5×10^8 CFU mL^{-1} .

Después, una alícuota de aproximadamente 50 ml de medio ZoBell líquido se inoculó con un volumen apropiado de bacterias para obtener una concentración de 1×10^6 UFC mL^{-1} . Se tuvo cuidado de verter el inóculo bacteriano cuando la temperatura de la alícuota del medio ZoBell fue de aproximadamente 37 °C, ya que una mayor temperatura impide el crecimiento bacteriano y si es menor el medio se solidifica y no permite una obtener una capa homogénea de agar con el inóculo bacteriano. Una vez incorporado el inóculo al medio líquido, se vertieron aproximadamente 12 mL de esta mezcla en las cajas que contenían

los sensidiscos, formando una capa delgada y homogénea. Posteriormente, se dejaron solidificar en la campana de flujo laminar AirClean 600 PCR Workstation (ISCBioExpress) y se colocaron en una incubadora a 30 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó la efectividad del antibiótico sobre *V. campbellii* midiendo el diámetro de los halos de inhibición.

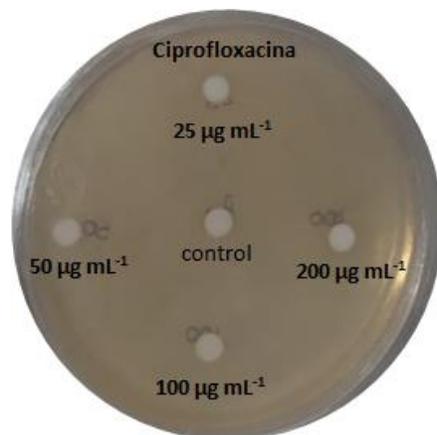


Figura 11. Fotografía de la distribución de sensidiscos impregnados a distintas concentraciones del antibiótico ciprofloxacina (25, 50, 100 y 200 µg mL⁻¹) y agua destilada como control contra *V. campbellii*.

En el ensayo realizado contra *V. campbellii*, el antibiótico utilizado ciprofloxacina presentó inhibición en todas las concentraciones utilizadas (25, 50, 100 y 200 µg mL⁻¹). El mayor halo de inhibición fue de 3.6 cm de diámetro con la concentración 200 µg mL⁻¹, después de 24 h de incubación a 30 °C (Figura 12). El menor halo de inhibición se presentó en la concentración de antibiótico más baja, con un diámetro de 1.2 cm.



Figura 12. Fotografía de los halos de inhibición del antibiótico ciprofloxacina a concentraciones (25, 50, 100 y 200 µg mL⁻¹) contra *V. campbellii*.

Bioensayo de alimentación de *A. franciscana* con *N. thermalis*

Durante el bioensayo de alimentación de los nauplios de *A. franciscana*, *N. thermalis* tuvo un crecimiento exponencial durante los 5 días de bioensayo (Figura 13). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la densidad de *N. thermalis* los días 5 y 4 con respecto al día 0 y 1.

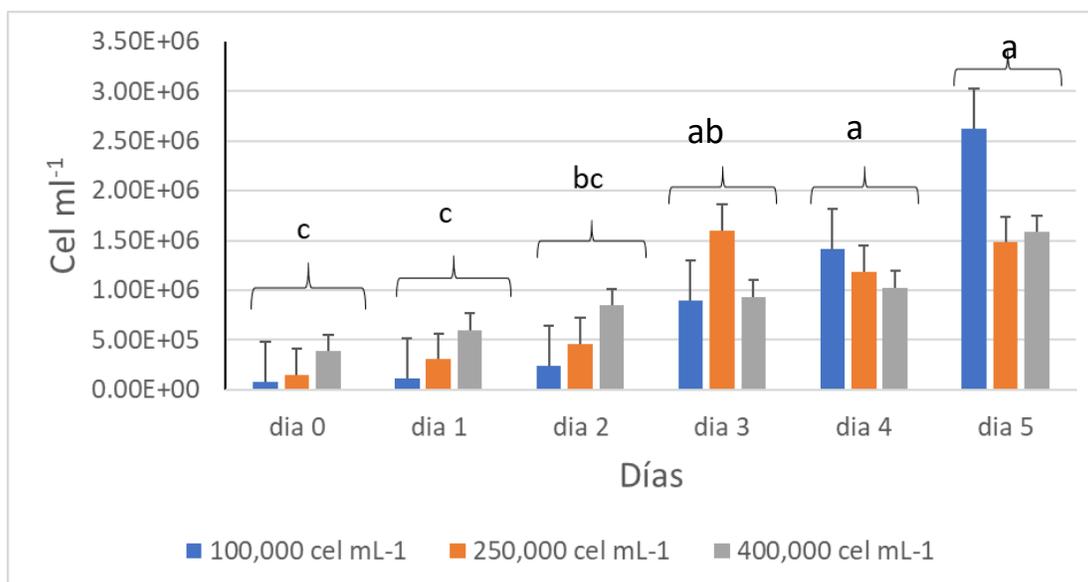


Figura 13. Crecimiento de *N. thermalis* en cocultivo *A. franciscana*. Análisis de varianza de 1 vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a > b > c$.

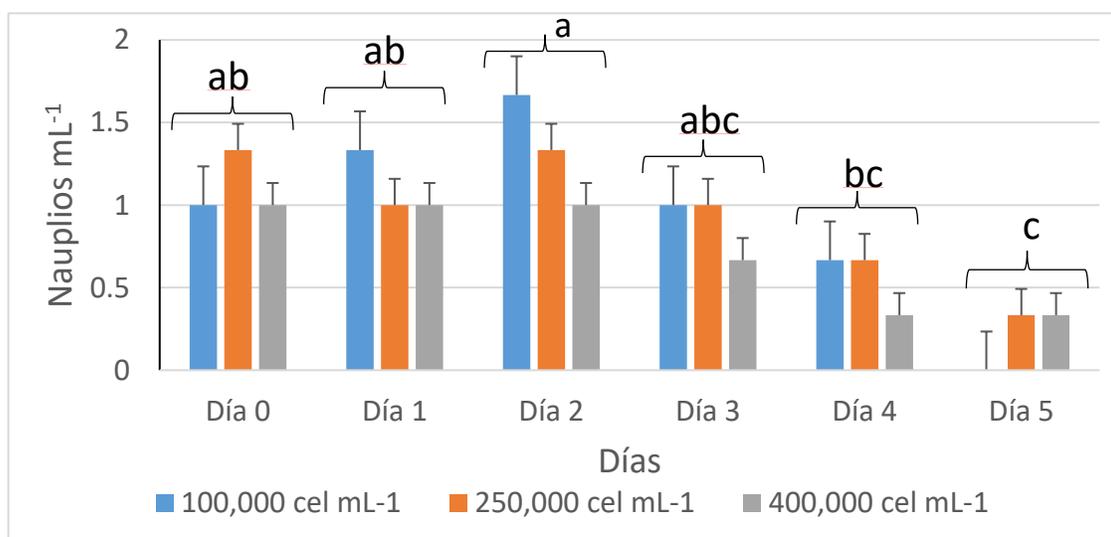


Figura 14. Supervivencia de *A. franciscana* en cocultivo con *N. thermalis*. Análisis de varianza de 1 vía y prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0.05$). Las diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas en el tiempo de medición, donde: $a > b > c$.

Vigor de la cepa

Tomando en cuenta el poco crecimiento de *V. campbellii*, se decidió realizar un experimento para verificar el vigor de la cepa. Se inocularon tubos de 10 mL por triplicado a una concentración de 1×10^6 *V. campbellii* mL⁻¹, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.6

Se evaluó el crecimiento en suero fisiológico con concentración de 25 g NaCl mL⁻¹. Se midió el crecimiento en TCBS realizando diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}).

Resultados de vigor de la cepa

Se logró el crecimiento de *V. campbellii* en sembrados de TCBS utilizando una cepa diferente a los experimentos anteriores. Los resultados obtenidos mostraron una densidad de 1×10^6 *V. campbellii* mL⁻¹ en una dilución de 10^{-3} (Figura 15).

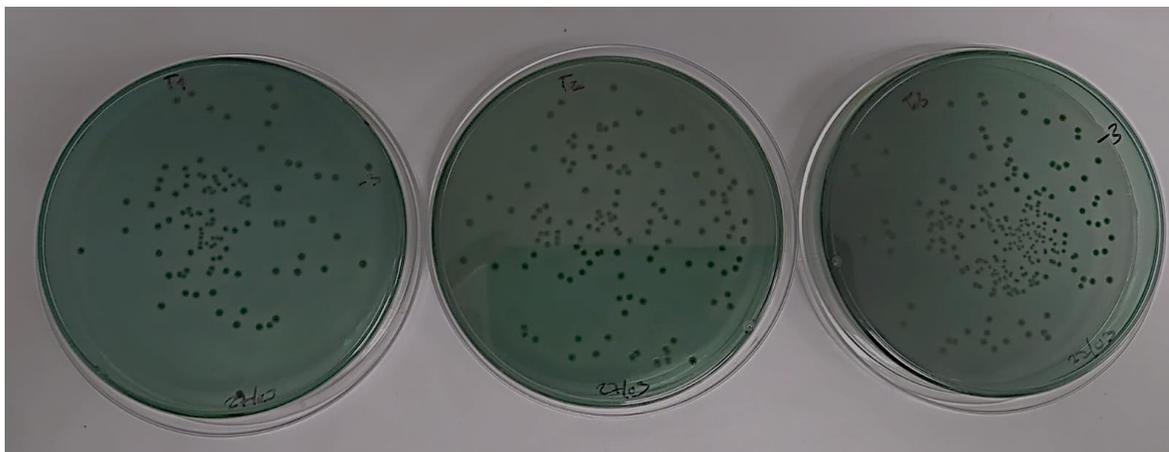


Figura 15. *V. campbellii* en suero fisiológico preparado con 25 g NaCl L⁻¹ de agua destilado sembrado en TCBS en la dilución 10^{-3} . Resultados a las 0+1 h.

Reto de inhibición del crecimiento de *V. campbellii*

Se realizó un cultivo de *N. thermalis*, no axénico en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 100 mL de medio "F" (Guillard y Ryther, 1962). La concentración inicial de células de *N. thermalis* fue de 100,000 cél. mL⁻¹ y se corroboró la ausencia de bacterias tipo *Vibrio* siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.7.

Para el reto de inhibición del crecimiento de *V. campbellii*, el cultivo de *N. thermalis* fue inoculado con un volumen de bacterias necesario para obtener una concentración final de 1×10^5 UFC mL⁻¹ de *V. campbellii*, partiendo de un inóculo preparado de acuerdo a lo descrito en la sección 2.1.5.

El cocultivo se mantuvo a $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, con una irradiancia continua de luz blanca fría (SILVANIA F40W) a $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ todo se realizó en el Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE.

Para evaluar el efecto inhibitorio de *N. thermalis* sobre el crecimiento de *V. campbellii* se cuantificó el número de bacterias heterotróficas por conteo en placa descrita en la sección 2.1.7 así como la densidad celular de *N. thermalis* descrito en la sección 2.1.3 y la densidad de *Vibrio* por filtración y conteo en placa descrita en la sección 2.1.7, se evaluaron a las 0, 24, 48, 96, 120 y 144 h.

Resultados del reto de inhibición del crecimiento de *V. campbellii*

Previo a la inoculación con *V. campbellii*, se evaluó que el cultivo de *N. thermalis* estuviera libre de bacterias tipo *Vibrio* ssp. Se encontró que el cultivo de *N. thermalis* resultó estar libre de bacterias tipo *Vibrio*. El ensayo se siguió durante 6 días, tiempo en el cual *N. thermalis* alcanzó la fase exponencial, obteniendo las mayores densidades celulares de *N. thermalis* al mantenerse en cocultivo con *V. campbellii* (2.5×10^6 cél. mL⁻¹).

Al inicio del ensayo en el día 1, se presentó un aumento en la densidad de *V. campbellii* de 5.2×10^5 *V. campbellii* mL⁻¹ en cocultivo con *N. thermalis*, sin embargo, durante la fase exponencial del crecimiento de *N. thermalis*, se obtuvieron valores de 0.7 *V. campbellii* mL⁻¹ en el día 6 de cultivo (Figura 16). La concentración inicial de bacterias heterotróficas fue en aumento desde el día 0 hasta el día 6. La concentración inicial de bacterias heterotróficas fue de 1×10^5 UFC mL⁻¹, mientras que en el último día de bioensayo (día 6) alcanzó una concentración de bacterias heterotróficas de 1.1×10^6 UFC mL⁻¹ (Figura 16).

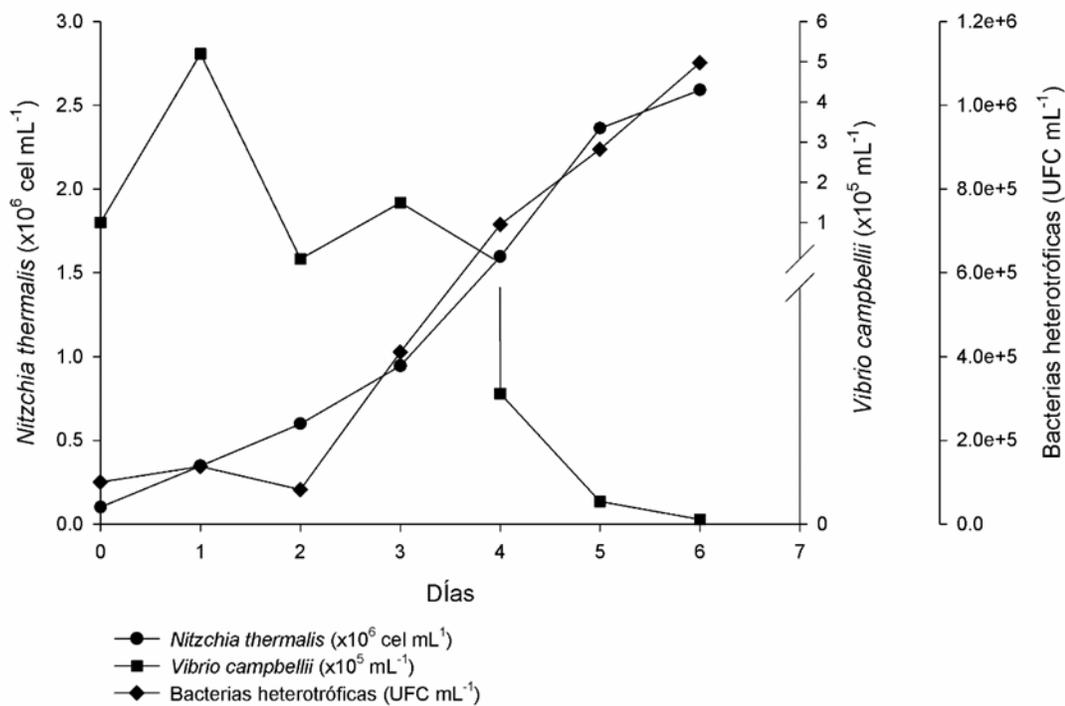


Figura 16. Reto de inhibición de *N. thermalis* contra *V. campbellii*. Los datos muestran los valores de *V. campbellii* (■) y bacterias heterotróficas (◆) cocultivadas con *N. thermalis* (●).

