

UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA
UNIDAD ACADÉMICA NAVOJOA



**Obtención y evaluación de fagos para el control de bacterias
patógenas tipo *Vibrio* en camarón blanco *Litopenaeus vannamei***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BIOSUSTENTABLES**

Presenta:

Francisco Israel Rentería Flores

Navojoa, Sonora, México.

Julio de 2018

CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada **Obtención y evaluación de fagos para el control de bacterias patógenas tipo *Vibrio* en camarón blanco *Litopenaeus vannamei***, presentada por **Francisco Israel Rentería Flores**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Sistemas de Producción Biosustentables**.



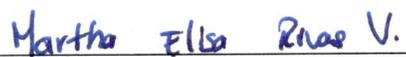
Dr. Anselmo Miranda Baeza

Director interno



Dra. Martina Hilda Gracia Valenzuela

Director externo



Dra. Martha Elisa Rivas Vega

Sinodal

DEDICATORIA

A mi DIOS:

EL SEÑOR JESÚS, por salvarme, permitirme realizar mi maestría, dándome sabiduría, conocimiento y dirección, y mostrarme todas las maravillas y profundidades de su creación que trabajan con una perfección, sincronía y complejidad que me deja perplejo. Con tus virus SEÑOR me dejaste impactado, de verdad que toda la tierra está llena de tu Gloria. Gracias y Gloria a ÉL.

A mi esposa e hijo:

Por apoyarme, orar por mi e interesarse tanto en el tema de los “virus y bacterias”, amarme y estar a mi lado. Gracias.

A mis papás:

Por apoyarme en todos los sentidos, aconsejarme, estimularme a seguir avanzando, interesarse en el tema de mi investigación. Ayudarme en la búsqueda de laboratorios, equipos e investigadores. Gracias.

A mi director de tesis, codirectora y sinodal:

Dr. Anselmo. Dra. Hilda, Dra. Martha. Gracias por dirigirme, apoyarme, enseñarme para poder realizar este trabajo y así obtener este nuevo grado académico. Su colaboración fue muy especial, así como su atención. Siempre valoraré todo el esfuerzo que realizaron en este tan importante nivel académico de mi vida.

CONACYT y al Gobierno Federal

Por pensar en la economía de los becarios y tener un interés genuino en el crecimiento académico, profesional y de investigación en el país. Sin el apoyo económico me habría sido imposible realizar mi maestría.

A todos los interesados en el tema de los “Fagos” ya que este es un tema que apasiona.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Estatal de Sonora, por permitirme realizar mis estudios de Posgrado y por apoyarme con su beca, agradezco también a todo su personal por las atenciones recibidas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el Posgrado (571553), así como el apoyo otorgado a través del proyecto denominado “Fortalecimiento del equipamiento para el desarrollo de sistemas sustentables de producción acuícola” Núm. 206155.

A los miembros de mi comité de tesis: A los directores Dr. Anselmo Miranda Baeza y Dra. Martina Hilda Gracia Valenzuela y a la sinodal Dra. Martha Elisa Rivas Vega, gracias por su gran apoyo.

A mis profesores del Posgrado les agradezco por haber puesto su dedicación y empeño para transmitirme sus conocimientos.

A la empresa Unión de SPR de RI “Ceferino Valenzuela” por apoyar el proyecto vinculado, por el suministro de organismos experimentales.

Al Laboratorio de Investigación de la UES por el uso de sus equipos.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue obtener y evaluar la efectividad de vibriofagos aislados en el sur del estado de Sonora contra cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, para determinar su uso potencial como agente terapéutico en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Se tomaron 13 muestras de: agua, sedimento y camarones en el Sur de Sonora (Agiabampo a Bahía de Lobos). En laboratorio se realizó el aislamiento de los fagos, posteriormente se referenciaron con un número, se purificaron y propagaron con la técnica de la doble capa de agar. Se evaluó la especificidad lítica y efecto inhibitorio de cada vibriófago. La prueba de especificidad indicó que, *Vibrio parahaemolyticus* fue lisada por 8 de 10 fagos aislados (80%); *Vibrio harveyi* fue susceptible a 3 fagos (30%) y *Vibrio alginolyticus* fue lisada solo por 2 fagos (20%). En el ensayo *in vitro*, el fago 3 presentó la inhibición más alta en contra de *Vibrio parahaemolyticus* llegando al 75.08% seguido por el fago 9 con 65.72%. Por otro lado, el fago 3 inhibió en un 29% el crecimiento de *Vibrio harveyi*, mientras que con el fago 9 se registró una inhibición del 64.89%. El efecto combinado (coctel) de la administración de los fagos 3 y 9 no mostró alta efectividad en la inhibición. Se concluye que durante el periodo de muestreo, la costa del sur de Sonora presentó fagos líticos con potencial terapéutico en contra de bacterias patógenas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

ÍNDICE GENERAL

	Página
CARTA DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Antecedentes	9
I.2. Hipótesis	11
I. 3. Objetivos	12
II. METODOLOGIA	13
II.1. Colecta de muestras de vibriófagos	13
II.2. Obtención y mantenimiento de cepas de bacterias objetivo	13
II.3. Aislamiento de Fagos	13
II.4. Purificación de Fagos	15
II.5. Producción masiva de fagos	15
II.6. Evaluación de la especificidad lítica	16
II.7 Pruebas <i>in vitro</i> de inhibición de bacterias objetivo por los fagos aislados	16
II.8 Procesamiento de la información	17
III RESULTADOS	18
III.1. Obtención de vibriófagos en las muestras	18
III.2. Evaluación de la especificidad lítica de fagos contra las bacterias objetivo	19
III.3. Efecto <i>in vitro</i> de los fagos sobre las bacterias patógenas: <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. alginolyticus</i> .	21
IV DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
IV.1. Determinación de la presencia de vibriófagos en muestras	22

IV.2. Especificidad	22
IV.3. Vulnerabilidad de las bacterias patógenas a los fagos	23
IV.4. Abundancia de fagos de bajo y amplio espectro	23
IV.5. Vulnerabilidad a fagos administrados individualmente y en coctel	24
IV.6. Implicaciones del uso de fagos como indicadores de carga bacteriana	25
V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
V.1. Conclusiones	26
V.2. Recomendaciones	26
VI LITERATURA CITADA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Ciclo de replicación de un bacteriófago.	8
2	Concentración de fagos en unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro en las muestras colectadas en contra de las bacterias: <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> .	18
3	Porcentaje de inhibición de las bacterias objetivo al ser aplicados de manera individual y en coctel.	21

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Especificidad de los fagos en contra de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> .	20

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores desafíos que enfrentará la humanidad es la provisión de alimento para los 9,700 millones de personas que se esperan para el año 2050, todo esto en un contexto de cambio climático, incertidumbre económica y daño medioambiental. La pesca y la acuicultura representan una de las principales fuentes de provisión de alimento. Actualmente la población mundial consume 20.1 kg de pescado y productos acuícolas per cápita al año en países en desarrollo y 26.8 kg en países industrializados. La acuicultura y la pesca proveyeron 160 millones de toneladas de alimento en el 2014 (FAO, 2016).

En el año 2013, los productos marinos representaban 17% de la ingestión de proteínas animales de la población mundial. En el 2014, la producción de acuicultura mundial ascendió a 73.8 millones de toneladas con un valor de primera venta estimado en 160, 200 millones de dólares y específicamente la producción de la acuicultura de crustáceos reportó 6.9 millones de toneladas con una ganancia de primera venta de 36, 200 millones de dólares (FAO, 2016). La tendencia de crecimiento anual de la acuicultura es del 10 al 20% (Alagappan *et al.*, 2010).

El camarón representa una de las especies de crustáceos más ampliamente cultivadas en el mundo siendo reportadas 3,668,681 de toneladas para el 2014 específicamente de la especie *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2016).

En el 2011, la producción acuícola en México incrementó en un 13.7%, superando en 6% al incremento de producción acuícola mundial. La producción nacional de camarón de cultivo y captura superó las 105,000 toneladas en el 2011, siendo el estado de Sinaloa el mayor productor nacional con una producción histórica de 50,734 toneladas y el estado de Sonora posicionándose en segundo lugar con una producción de 40,679 toneladas del crustáceo, mientras que en el 2014

el estado de Sonora tuvo una producción de 26,514 toneladas en peso vivo de camarón blanco en acuacultura (CONAPESCA, 2014).

El reto más importante que enfrenta la industria de la camaronicultura en México es el control de enfermedades virales y bacterianas. Algunas de ellas se han diseminado debido a la intensificación de los cultivos y a la transferencia de organismos alrededor del mundo (Scholz *et al.*, 1999; Saulnier *et al.*, 2000).

Los principales patógenos que pueden causar hasta el 100% de mortalidad en los cultivos son: el virus de la mancha blanca (WSD), virus del síndrome de Taura (TSV), el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoiética (IHHNV), el virus de la necrosis baculoviral de la glándula intestinal (BMN) y la Vibriosis bacteriana (FAO, 2016).

Vibriosis

La vibriosis es el principal problema infeccioso en los cultivos de camarón por la alta mortalidad que provoca (Lightner, 1988; Brocks y Lea Master, 1992; Mohny *et al.*, 1994), especialmente durante el cultivo larvario (Verpraet *et al.*, 1992). Las principales especies del género *Vibrio* que causan mortandad en cultivos larvarios son *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *Vibrio spp.*, y entre ellas se destaca la bacteria luminosa *V. harveyi* siendo una de las principales causantes de la mortalidad masiva en los cultivos de camarón (Chythanya *et al.*, 2001; FAO, 2016).

Las bacterias del género *Vibrio* son gram-negativas, oxidasa positivas (en la mayoría de las especies), rectas o curvas con forma de bastón y anaerobias facultativas (Sung *et al.*, 2001). Son ubicuas y están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos, desde agua salobre hasta agua

de mar profunda, en asociación con animales marinos, algas y detritus (Gopal *et al.*, 2005). Las bacterias de éste género son consideradas parte de la microbiota normal de camarones peneidos, ya que constituyen el mayor porcentaje de las bacterias aisladas del tracto digestivo, branquias y cutícula, ocasionalmente se encuentran en la hemolinfa (Morales-Covarrubias, 2008; Santiago *et al.*, 2009).

Las principales fuentes de transmisión de bacterias tipo *Vibrio* son el agua marina, instrumentos o estanques de larvicultura mal desinfectados, como parte natural de la microflora en nauplios de *Artemia* utilizada como alimento vivo, entre otros (Karunasagar *et al.*, 1994; FAO, 2016).

Los principales síntomas de la vibriosis son músculo abdominal opaco, anorexia, expansión de cromatóforos, ligera pigmentación oscura en superficie dorsal, expansión de cromatóforos rojos sobre los pleópodos y pereiópodos dando un color rojizo a estos apéndices, necrosis interna y externa, baja ingesta de alimento, comportamiento errático y debilitamiento en general. Los camarones en este estado son susceptibles a las infecciones virales (Alabi *et al.*, 1997; FAO, 2016).

Las principales medidas que se han utilizado para contrarrestar la Vibriosis son: desinfección de las instalaciones, equipo, agua y trabajadores, uso de alimento vivo (*Artemia franciscana*) libre de bacterias, cubrir tanques de cultivo con cubiertas de plástico para evitar contaminación a otros estanques, control de densidad de siembra, así como control de aireación para mantener condiciones ambientales óptimas a lo largo del ciclo del cultivo (FAO, 2016). También se han usado bacterias probióticas para el equilibrio microbiano intestinal e inhibición de colonización por patógenos por la competencia por nutrientes y espacio (Principio de exclusión) (Gatesoupe,

1999), empleo de antibióticos, empleo de compuestos bioactivos de algas (Esquer-Miranda *et al.*, 2016), empleo de fagoterapia (Martínez-Díaz, 2014), entre otros.

Un severo problema actual en la acuicultura es la resistencia bacteriana a los antibióticos. Éste fenómeno se ha generado por el uso irracional e inconsciente de bactericidas. Para evitar éste círculo vicioso, las infecciones virales deben ser tratadas con alternativas inocuas, entre ellos la fagoterapia, los compuestos bioactivos de algas o el biofloc (Manilal *et al.*, 2009; Martínez-Córdova *et al.*, 2015).

Empleo de antibióticos en acuicultura

La técnica más común para combatir el problema de la vibriosis en camaronicultura (en todas sus fases de crecimiento) es el empleo de antibióticos. En el estado de Sonora, los antibióticos más comunes empleados son la oxitetraciclina, enrofloxacin y florfenicol, ormetoprim – sulfa – metoxazol, sarafloxacin. Alrededor del mundo se emplean otros antibióticos como: clortetraciclina, quinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido oxolínico, perfloxacina, sulfametazina, gentamicina y tiamulina (Holmström *et al.*, 2003).

Debido al inadecuado uso de los antibióticos y a la capacidad de las bacterias para mutar y reproducirse rápidamente se ha generado el desarrollo de la resistencia bacteriana. Éste problema es el mayor reto de la actualidad al que se enfrentan los acuicultores (Santiago *et al.*, 2009).

Los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos pueden surgir mediante mutaciones cromosómicas individuales (las cuales no pueden ser transferidas) o por adquisición de plásmidos que poseen genes de resistencia que pueden ser transferidos rápidamente. Los

plásmidos con genes de resistencia a antibióticos han sido encontrados en especies marinas de *Vibrio* y pueden ser intercambiados lateralmente (Holmström *et al.*, 2003; Balcázar *et al.*, 2006).

La multirresistencia representa un reto terapéutico que deja pocas posibilidades para el tratamiento de estas infecciones. Los mecanismos que utilizan las bacterias para defenderse de los antibióticos están en constante cambio (Tarfur *et al.*, 2008).

Durante el ciclo de cultivo del 2007, 38.18% de granjas camaronícolas del estado de Sonora emplearon antibióticos, la oxitetraciclina fue el antibiótico más utilizado con un 65.91% (COAES, 2007; Santiago *et al.*, 2009). Otro de los problemas generados por el uso de antibióticos en la camaronicultura es la presencia de residuos en el tejido de los organismos cultivados, los cuales pueden llegar al consumidor (Cabello, 2006). Éstos, pueden afectar la flora intestinal humana ejerciendo una presión selectiva en las bacterias dominantes, promoviendo directa o indirectamente el desarrollo de resistencia, alterando la actividad metabólica enzimática, además de la ocurrencia de alergias e intoxicaciones (OMS, 2015).

El efecto de la bioacumulación que afecte directamente la inocuidad del producto pueden llegar a ser causa de cierre de mercados nacionales e internacionales y generar graves pérdidas económicas (Alagappan *et al.*, 2010), ya que existe una fuerte restricción de los residuos de antibióticos en productos para consumo humano (Santiago *et al.*, 2009).

En la actualidad, es recomendable buscar alternativas para el tratamiento de la vibriosis que sean inocuas, no generen bioacumulación en el tejido del camarón y de los consumidores, adicionalmente se debe evitar alterar el equilibrio y la dinámica ecológica de la comunidad microbiana. Las nuevas opciones deben ser selectivas con el fin de preservar las comunidades de bacterias benéficas.

Fagos

Los bacteriófagos son las partículas más abundantes en el medio marino y se estima que su densidad alcanza hasta los hasta 10^8 fagos por mililitro de agua, llegando a ser de 10 a 100 veces más numerosos que las bacterias. Su importancia ecológica o nicho radica en que son los encargados de destruir diariamente de un 20% a un 40% de la biomasa procariota en los océanos. Alagappan menciona que de 10% a 20% de todas las bacterias heterótrofas mundiales que se pierden diariamente por infecciones virales (Suttle, 2007; Rohwer *et al.*, 2009; Alagappan, 2010) y consecuentemente afectan los ciclos de nutrientes, la estructura y composición de las comunidades microbianas y son la fuerza mayor detrás de los ciclos biogeoquímicos (Ronda *et al.*, 2003; Suttle, 2007).

Suttle (2007), menciona que la densidad de fagos en todas las costas es cerca de 10^8 virus /mL y que cerca de 10% a 20% de todas las bacterias heterótrofas mundiales se pierden diariamente por infecciones virales.

Los bacteriófagos son parásitos obligados altamente específicos debido a su sistema de reconocimiento que sólo se acopla a componentes en la pared celular de las bacterias tales como proteínas, oligosacáridos, ácido teicoico, peptidoglicano y lipopolisacáridos (Hanlon, 2007; Donlan, 2009). En el caso del fago KVP40, el receptor trans-membrana (por el cuál ingresa su material genético al medio intracelular) para diversas especies de *Vibrio* es 26-kDa y posiblemente OmpV (Matsuzaki *et al.*, 1992).

Los fagos se pueden considerar inocuos para otras especies bacterianas, ya que se fijan o adsorben a componentes específicos de la membrana celular bacteriana mediante estructuras complementarias al receptor celular y solo se pueden acoplar e infectar a las bacterias que

contengan dicho receptor. El ingreso del fago para emplear los mecanismos internos de la bacteria huésped consiste en la glicolización y/o metilación de bases específicas (Davis *et al.*, 1979).

Una vez realizada la adsorción, se produce un cambio configuracional en las proteínas de la placa basal, algunas de las cuales tienen actividad enzimática y producen un poro en la membrana citoplasmática de la célula. La vaina del fago se contrae y el material genético viral ingresa en la célula, mientras que la envoltura proteica queda en el exterior. Estas proteínas reparan el poro de la membrana citoplasmática por donde ingresó el genoma viral y degradan el DNA bacteriano, lo que proporciona una fuente de precursores, evita la síntesis de RNA y proteínas bacterianas y proporciona ribosomas para la síntesis de proteínas del fago (Davis *et al.*, 1979;).

Una vez que los fagos ingresan al interior celular bacteriano el material genético (ADN o ARN) se acopla al plásmido bacteriano utilizando la maquinaria celular para su replicación, produciendo desde 100 hasta 1,000 virus y posterior a esto se procede a la generación de enzimas líticas (holinas y lisina) que ocasionan la ruptura celular y la lisis, liberando a los viriones (Mayer, 2016). La segunda ruta pertenece a los fagos lisogénicos que pasan parte de su ciclo de vida en estado de inactividad dentro de la célula huésped y se les suele llamar profagos (Davis *et al.*, 1979; Madigan *et al.*, 1999; Morrison y Rainnie, 2004; Weinbauer, 2004; Hanlon, 2007). En la figura 1, se presenta el ciclo de replicación de un fago.

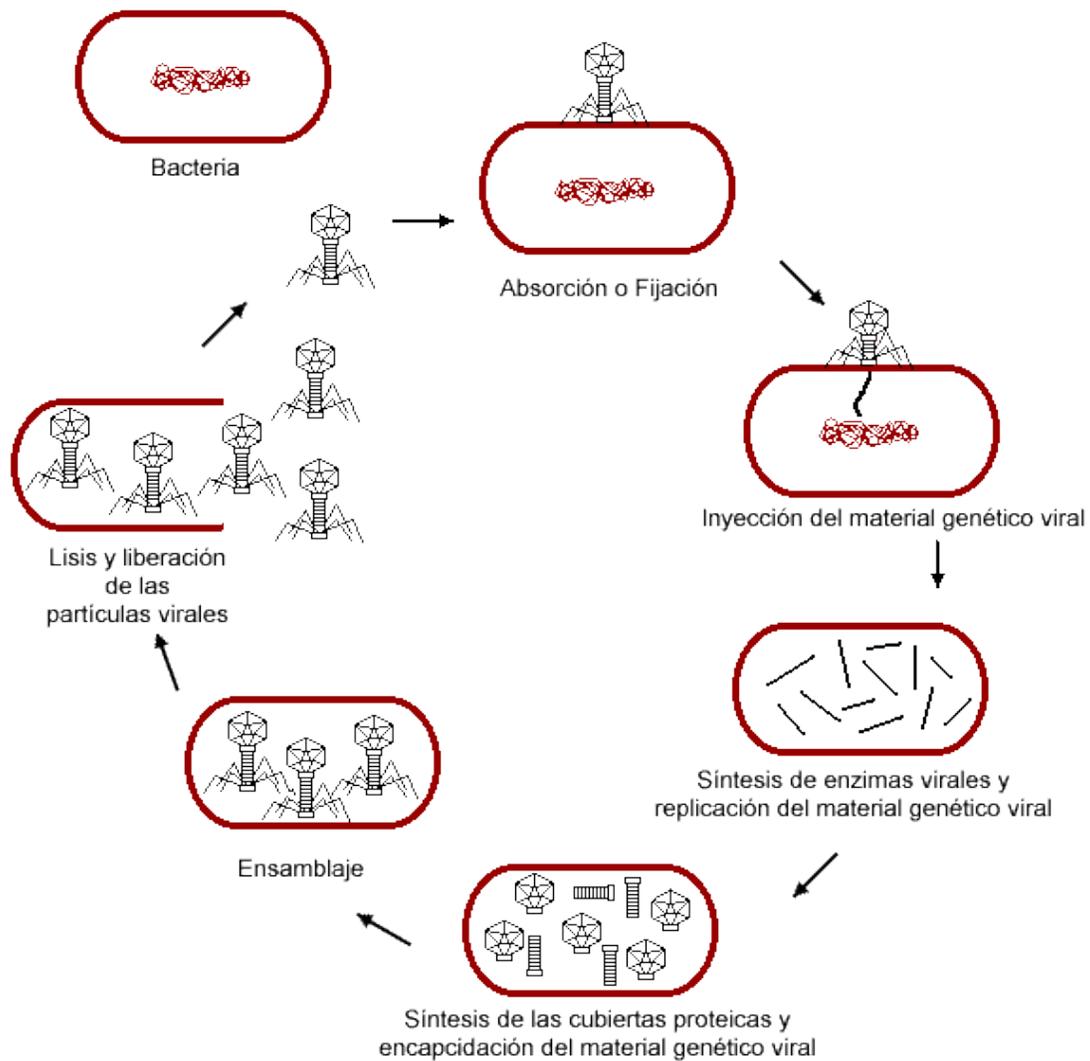


Figura1. Ciclo de replicación de un bacteriófago (tomada de Davis *et al.*, 1979).

La acción lítica de los vibriófagos (T4) sobre bacterias patógenas permitió su uso como alternativa terapéutica frente a infecciones bacterianas. Su eficacia ha sido probada incluso contra microorganismos resistentes a antibióticos (Vispo y Puchades, 2001). El proceso de degradación de los fagos es inocuo (a diferencia con los antibióticos) ya que solo están constituidos de proteínas y ácidos nucleicos (Carlton *et al.*, 2005). Otra de las ventajas del empleo de fagos en el control de bacterias patógenas es su incremento exponencial a partir de

la dosis inicial y el número se seguirá incrementado hasta que la cepa huésped específica o el patógeno atacado desaparezca (Alday-Sanz *et al.*, 2007; Hanlon, 2007).

Otros beneficios de la fagoterapia para el control de bacterias patógenas en acuicultura radican en su bajo costo de producción, alta especificidad, inocuidad, entre otros. La fagoterapia para el control de *Vibrio* se utiliza en acuicultura desde 1954 y ha generado excelentes resultados alcanzando una supervivencia de 70% a 80% en larvas de *Litopenaus vannamei* infectadas con diversas cepas patógenas de *Vibrio*, sin utilización de antibióticos ni probióticos. La sola utilización de fagos líticos específicos (en tiempo y forma) a cultivos de peneidos en estadios larvarios garantiza la reducción de la mortalidad en casi un 80% (Alagappan, 2010).

I.1 Antecedentes

Antecedentes de la aplicación de fagoterapia en diversos organismos cultivados

Karunasagar *et al.*, (2005) aislaron vibriófagos capaces de lisar a *Vibrio harveyi*, obtenidos a partir de muestras de agua de granjas de camarón, observando alta eficiencia en la reducción de los conteos de *V. harveyi* en el microcosmos marino. La aplicación de fagos para controlar la enfermedad bacteriana luminosa en laboratorio, resultó en la reducción (3 unidades logarítmicas) de conteos de *V. harveyi* en agua y larvas (*Penaeus monodon* – PL18), así como una mejora significativa en la sobrevivencia larvaria (80%) al aplicar dos dosis de fagos, cada 24 h. Al aplicar solo una dosis de fagos se obtenía una reducción igual a una unidad logarítmica de *V. harveyi* alcanzándose un 40% de sobrevivencia larvaria.

Así mismo, se aplicó la fagoterapia para tratar la vibriosis luminosa en una granja camaronícola (localizada en Visakhapatnam, India). Se seleccionaron los tanques que presentaban mortalidad y mayor intensidad luminosa para la aplicación del tratamiento, que consistió en 100 mL del

fago (10^8 UFP/mL) añadido al tanque de 10 toneladas, obteniéndose una reducción del conteo de *V. harveyi* de 10^6 /mL a 10^3 /mL en 48 hrs y a niveles indetectables a las 72 hrs, con una sobrevivencia larvaria de 89%. Los resultados mostraron el potencial terapéutico de la fagoterapia para tratar la vibriosis luminosa en laboratorio y en granjas (Karunasagar *et al.*, 2005).

Vinod *et al.* (2006), aislaron un fago (*Siphoviridae*) para *Vibrio harveyi* con una amplia actividad lítica para diversas cepas de la costa este y oeste de la India y se sugiere para potencial forma de biocontrol de la vibriosis luminosa causada por *V. harveyi* en sistemas de acuicultura. Se observó que al infectar en laboratorio larvas de *Penaeus monodon* con *V. harveyi* en presencia del fago aislado se alcanzaba una sobrevivencia del 80% a comparación con el control (25%). Se realizaron ensayos de campo en granjas comerciales que presentaban brotes naturales de vibriosis luminosa. El tratamiento con fagos mejoró la sobrevivencia larvaria (86%) y produjo un declive en los conteos de *V. harveyi* luminiscente en los tanques de siembra hasta llegar a niveles indetectables hasta por 17 días, mientras que el control de estanques con vibriosis luminiscente sin tratamiento de fagos obtuvo una sobrevivencia de 17% y al ser tratados con antibióticos 40% (Vinod *et al.* 2006).

Lomelí-Ortega y Martínez-Díaz (2014), evaluaron la efectividad de la fagoterapia en la prevención y control de la vibriosis en *Litopenaeus vannamei* infectando a las larvas (nauplios etapa IV-V) con 2×10^6 UFC mL⁻¹ de *Vibrio parahaemolyticus* y tratándolas con diferentes dosis de fagos (A3S y Vpms1) y en diferentes tiempos de aplicación. Los resultados revelaron una efectiva reducción de la mortalidad en aplicación temprana (6h post infección) del tratamiento y valores bajos de MOI (< 0.1); sin embargo, al retrasar el tiempo de aplicación del tratamiento se reducía considerablemente la sobrevivencia. Este estudio provee la base para el uso de

bacteriófagos en la prevención y control de *V. parahaemolyticus* en camarones (Lomelí-Ortega y Martínez-Díaz, 2014).

Considerando la especificidad de los fagos para lisar diversas especies de bacterias del género *Vibrio*, se han realizado trabajos de preparación de “cocteles” que contienen una mezcla de diversos tipos fagos líticos de amplio espectro que pertenecen a las familias *Siphoviridae* y *Mioviridae*. Al respecto, Crtothers- Stomps *et al* (2010) prepararon un “coctel” de fagos líticos para la eliminación de vibriosis provocada por *Vibrio harveyi* en larvas de *Palunirus ornatus*, para lo cual se tomaron muestras de diferentes estratos, principalmente de tejidos de organismos enfermos para el aislamiento de los vibriófagos.

Tanji encontró que la efectividad de la fagoterapia se reducía dramáticamente con la aparición de células virulentas resistentes a fagos, por lo que sugirió la administración de cocteles de fagos en múltiples dosis para inhibir la resistencia para reducir el problema (Tanji *et al.*, 2005). Por otro lado, Vinod (*et al.*, 2005) aislaron fagos líticos específicos para *V. harveyi* para controlar la vibriosis luminiscente larvaria de camarón aplicando una dosis diaria de 100 µl de fagos a 10⁹ Unidades Formadoras de Placa (UFP) mL⁻¹ durante 2 días y registró un 80% de sobrevivencia.

En virología, para determinar la infectividad y virulencia de un agente se ha empleado el índice de multiplicidad de infección (MOI), que consiste en el número de partículas virales viables que infectan determinada célula, describiendo este parámetro mediante la distribución de Poisson (Medina-Velázquez *et al.*, 2005).

I.2. Hipótesis

En condiciones naturales los vibriófagos lisan diariamente hasta el 20% las poblaciones bacterianas, se espera que los fagos obtenidos en la zona costera de Sonora serán altamente

efectivos en contra de cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio harveyi*, obtenidas de granjas camaroneras de la misma región.

I. 3. Objetivos.

Objetivo General

Obtener y evaluar la efectividad de vibriofagos aislados en el sur de Sonora contra cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, para determinar su uso potencial como agente terapéutico en el cultivo de camaron blanco *L. vannamei*.

Objetivos Particulares

1. Determinar la presencia de vibriofagos para las bacterias patógenas *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio harveyi* mediante muestreos periódicos en agua, sedimento y camarones en el Sur de Sonora.
2. Evaluar la especificidad lítica de cada vibriófago contra cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus* mediante bioensayos *in vitro*.
3. Evaluar el nivel de inhibición de cada vibriófago contra cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus* mediante bioensayos *in vitro*.

II. METODOLOGÍA

II.1 Colecta de muestras de vibriofagos

Durante los meses de mayo a junio de 2016 se realizó un muestreo en el sur del estado de Sonora (Laguna de Agiabampo a Bahía de Lobos), se colectaron un total de 13 muestras. En las granjas se tomaron muestras de agua (de los estanques y de los efluentes), así como del sedimento y de organismos cultivados (3-5 individuos). En el medio natural se tomaron muestras de agua.

Las muestras fueron colectadas en bolsas estériles marca WHIRL PAK®, se almacenaron en una hielera y se transportaron al laboratorio de Investigación de la Universidad Estatal de Sonora para su posterior aislamiento.

II.2 Obtención y mantenimiento de cepas de bacterias objetivo

Se obtuvieron cepas patógenas puras, libres de profagos lisógenos de las especies: *Vibrio parahaemolyticus* (Cepa: SSA 262 CAIM 1709), *Vibrio alginolyticus* (Cepa: HP113, CAIM 203) y *Vibrio harveyi* (Cepa: CAIM 1792) las cuales fueron aisladas de camarones enfermos por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. CIAD unidad Mazatlán. En el laboratorio de la UES- Navojoa, cada cepa fue sembrada sembradas en agar soya tripticaseína (TSA; NaCl 2.5%) y posteriormente criopreservadas a -70°C hasta su uso.

II.3 Aislamiento de fagos

El aislamiento se realizó mediante la técnica de enriquecimiento (Algappan, 2009), utilizando las muestras previamente colectadas en campo. En el caso de los camarones con signos evidentes de vibriosis, se les extrajo el hepatopáncreas y se colocó en 100 mL de solución salina

al 2.5% y se mezcló. Las muestras de sedimento mezclaron y se homogenizaron, posteriormente se tomaron 10 g y se diluyeron en 100 mL de solución salina al 2.5%.

Las muestras de agua, sedimento y de hepatopáncreas se centrifugaron a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C. Se tomó 1 mL del sobrenadante, se pasó por un filtro de 0.2 µm de membrana de acetato de celulosa (VWR) y se añadió por separado al cultivo de cada una de las bacterias objetivo, la cual tenía un periodo de crecimiento de 8 h, posteriormente se incubó por 24 h a 30°C. Finalizado el periodo se agregó cloroformo, se centrifugó nuevamente a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0.2 µm. Se colectó el pellet bacteriano (fondo) al cual se le agregaron 50 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB) 2.5% NaCl y se dejó incubar a 30° C por 24 h. El ciclo de adición de cloroformo, centrifugación y filtración se repitió de 2-3 veces más.

La presencia de fagos se corroboró sembrando masivamente placas de agar soya tripticaseína (TSA; DIFCO) con cada una de las bacterias objetivo (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginoliticus* y *Vibrio harveyi*, ajustadas a una densidad óptica de 1 a 585 nm (OD =1) que corresponde a 10^8 UFC mL⁻¹. Las placas sembradas se incubaron por 12 h, pasado éste tiempo, se inocularon con 13 µL del filtrado de fagos (prueba de puntos). Posteriormente, se incubaron de nuevo por un periodo de 24 h. La presencia de fagos se corroboró cuando se observó la aparición de círculos o anillos líticos (zonas de blanqueamiento) sobre la película de la bacteria objetivo.

La prueba de puntos se realizó por triplicado para cada una de las bacterias objetivo. Como control se agregó una gota de agua de mar estéril a cada placa y así garantizar que efectivamente se trataba de halos de inhibición. La gota de agua fue recubierta por la película de bacterias en la placa, mientras que el halo de inhibición permaneció estable hasta por un mes.

Para cada tipo de fagos se realizó una segunda prueba de detección por triplicado, denominada “Prueba de doble capa de agar” (Carlson, 2005). Esta consistió en agregar 300 μ L de la solución hipotética de fagos, y 700 μ L de la capa bacteriana cepa en caldo de soya tripticaseína (TSB) 2.5% NaCl en 3 mL agarosa 0.8% 45°C (agar blando), el cual fue mezclado suavemente en un vortex y se vertió en una en caja Petri con agar soya tripticaseína (TSA) 2.5% NaCl, la cual fue incubada a 30°C por 24h. Posteriormente, se visualizaron los halos de inhibición o placas de blanqueamiento en la película bacteriana. Esta prueba se realizó por triplicado.

II.4 Purificación de fagos

Los halos de inhibición procedentes de la prueba de doble capa de agar se recortaron. El recorte se realizó con una pipeta Pasteur estéril. Los recortes se colocaron en tubos de ensaye estériles con 5 mL de agua de mar estéril a 35 ppm. Se les adicionó cloroformo en una proporción de 1:10 como agente bacteriostático, se mantuvieron por 30 min a 14°C. Posteriormente la muestra se decantó para retirar el cloroformo. Se centrifugó en ultra centrífuga (Thermo Sorvall Legend XTR) a 10 000 g durante 1 h a 4°C; el sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0.2 μ m. Los halos de inhibición se recortaron y se añadieron a viales con agua de mar estéril a 35 ppm para preservarse a 4°C. Se aplicó nuevamente la prueba de la doble capa de agar para verificar la presencia de virus viables (Renteria, 2009).

II.5 Producción masiva de fagos

Se tomaron muestras de los fagos purificados (1 mL) las cuales se agregaron a matraces con caldo de soya tripticaseína (TSB) 2.5% NaCl con la bacteria objetivo las cuales tenían 24 h de incubación a 30°C. Se dejaron reposar por 1 hora a 30°C se les agregó cloroformo en una relación 1:10 partes, se centrifugó a 1,372 g durante 15 minutos a 4°C para eliminar los residuos

bacterianos y se filtró el sobrenadante (filtro de 0.2 μm de membrana de acetato de celulosa). Se contabilizó el número de fagos viables por mililitro mediante la ecuación de Unidades Formadoras de Placas (UFP) empleando diluciones seriales (UFP's/mL= Núm. de placas/ Factor de dilución X volumen de solución de virus). Se almacenaron las muestras a 4°C en agua de mar estéril a 35 ppm y en Búfer SM pH 8.7 para su posterior uso.

II.6 Evaluación de la especificidad lítica

Los fagos aislados de las muestras de agua, sedimento y organismos fueron sometidos a una prueba de rango lítico o especificidad de hospedero. En esta prueba se usó la doble capa de agar descrita anteriormente. La prueba consistió en elaborar una matriz, cruzando los 13 fagos aislados con las 3 cepas de bacterias patógenas de interés. En esta prueba se marcó como positivo cuando se detectaron halos de inhibición claros, abundantes y repetitivos. Los halos fueron evaluados cuantitativamente de acuerdo al conteo de unidades formadoras de placas (UFP) mL^{-1} y se caracterizaron cualitativamente de acuerdo al catálogo de Ackermann (2006). Esta prueba sirvió para seleccionar a los fagos con capacidad lítica como candidatos a ser aplicados en contra de bacterias patógenas.

II.7 Pruebas *in vitro* de inhibición de bacterias objetivo por los fagos aislados

En viales de 1 mL se añadió caldo de soya tripticaseína (TSB) (2.5% NaCl), posteriormente cada cepa (*V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*) fue inoculada por triplicado a una concentración de 1×10^8 UFC mL^{-1} . A cada vial se añadieron 100 μL de cada uno de los fagos seleccionados por su mayor actividad lítica: fago 3 (muestra de agua de mar de Agiabampo), fago 12 (Agiabampo muestra de agua estanque 6) y en coctel (fago 3 + fago 12). Como blanco se utilizó caldo soya trpticaseína (TSB) sin bacterias y como control caldo TSB

con bacteria y sin fagos. Todos los viales fueron incubados a 30° C por 24 h, al final de éste periodo se contabilizó la densidad bacteriana en un espectrofotómetro Shimadzu a 580nm. El porcentaje de inhibición se calculó por la diferencia de cada tratamiento respecto a su control negativo (bacteria sin vibriofagos).

II.8 Análisis y procesamiento de la información

Con la información recabada se realizaron tablas de especificidad lítica y se calcularon los porcentajes de inhibición.

III. RESULTADOS

III.1 Obtención de vibriófagos en las muestras

De las 13 muestras colectadas, en solo 10 se obtuvieron fagos líticos en contra de las bacterias objetivo, sin embargo, durante ésta primera fase de detección, solo en tres se determinó la densidad por el método de Carlson (2005) debido a la baja concentración de las partículas virales presentes.

Una de las muestras cuantificables provino del agua de mar de la laguna de Agiabampo (fago Núm. 3) con un contenido de fagos de 1.2×10^6 UFP mL^{-1} contra *V. parahaemolyticus*. Mientras que la muestra de agua del estanque 6 de Agiabampo (fago Núm. 9) presentó una concentración de 0.012×10^6 UFP mL^{-1} contra *V. harveyi* y de 0.18×10^6 UFP mL^{-1} contra *V. alginolyticus* (Figura 2).

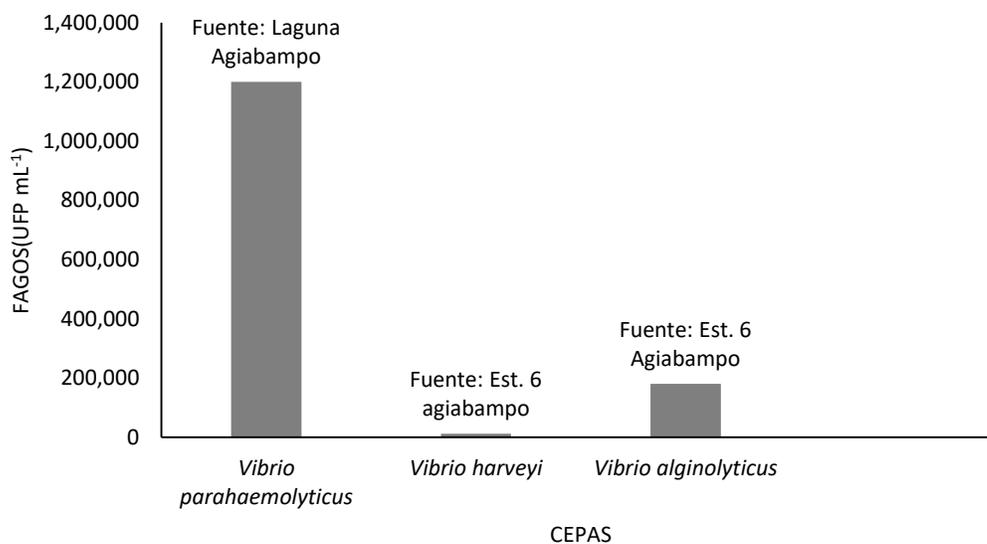


Figura 2. Concentración de fagos en unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro en las muestras colectadas en contra de las bacterias: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*.

III.2 Evaluación de la especificidad lítica de fagos contra las bacterias objetivo

Después del aislamiento, purificación y multiplicación de los fagos, la prueba de especificidad indicó que, *Vibrio parahaemolyticus* fue lisada por 8 de 10 fagos aislados (80%); *Vibrio harveyi* fue susceptible a 3 fagos (30%) y *Vibrio alginolyticus* fue lisada solo por 2 fagos (20%) (Tabla 1).

De los 10 fagos aislados, solo dos de ellos mostraron amplio espectro inhibitorio (especificidad en contra de más de una bacteria patógena). El fago 2 que se obtuvo de la muestra de agua del estanque 1 de Naopatía, mostró especificidad para *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*; mientras que el fago 9 que se obtuvo de la muestra de agua del estanque 3 de Agiabampo fue específico para *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*.

Tabla 1. Especificidad de los fagos en contra de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*.

Número de muestra	Origen de la muestra	<i>V. Parahaemolyticus</i> (núm. de fago)	<i>V. harveyi</i> (núm. de fago)	<i>V. alginolyticus</i> (núm. de fago)
1	Naopatía Sedimento	++ (1)	-	-
2	Naopatía Agua Estanque 1	++ (2)	++ (2)	-
3	Agiabampo Agua de Mar	++ (3)	-	-
4	Bahía de Lobos Camarones	+ (4)	-	-
5	Agiabampo Agua Estanque 1	+ (5)	-	-
6	Naopatía Agua Estanque 2	++ (6)	-	-
7	Agiabampo Agua Estanque 2	-	-	-
8	Naopatía Camarones	-	-	-
9	Agiabampo Agua Estanque 3	-	-	-
10	Agiabampo Agua Estanque 4	++ (7)	-	+ (7)
11	Agiabampo Agua Estanque 5	++ (8)	-	-
12	Agiabampo Agua Estanque 6	-	++ (9)	++ (9)
13	Bahía de Lobos Agua muestra 1	-	++ (10)	-
Total de fagos (10)		Sub tot. 8	Sub tot. 3	Sub tot. 2
Porcentajes		80	30	20

- Sin efecto inhibitorio

+ Con efecto inhibitorio

++ Mayor efecto inhibitorio (áreas de blanqueamiento inhibitorio con mayor diámetro y nitidez).

III.3 Efecto in vitro de los fagos sobre las bacterias patógenas: *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.

Para realizar las pruebas in vitro se utilizaron los fagos que presentaron mayor abundancia durante los muestreos (fago 3 y fago 9), como se muestra en la figura 2. Dado que al ser más abundantes, tienen mayor efecto en contra de las bacterias objetivo.

El fago 3, presentó la inhibición más alta en contra de *Vibrio parahaemolyticus* llegando al 75.08% seguido por el fago 9 con 65.72%. Por otro lado, el fago 3 inhibió en un 29.26% el crecimiento de *Vibrio harveyi*, mientras que con el fago 9 registró una inhibición del 64.89%. El efecto combinado (coctel) de la administración de los fagos 3 y 9 no mostró efectividad en la inhibición siendo de 20.61% para *Vibrio parahaemolyticus*; 12.59 para *Vibrio harveyi* y de 0% para *Vibrio alginolyticus* (Figura 3).

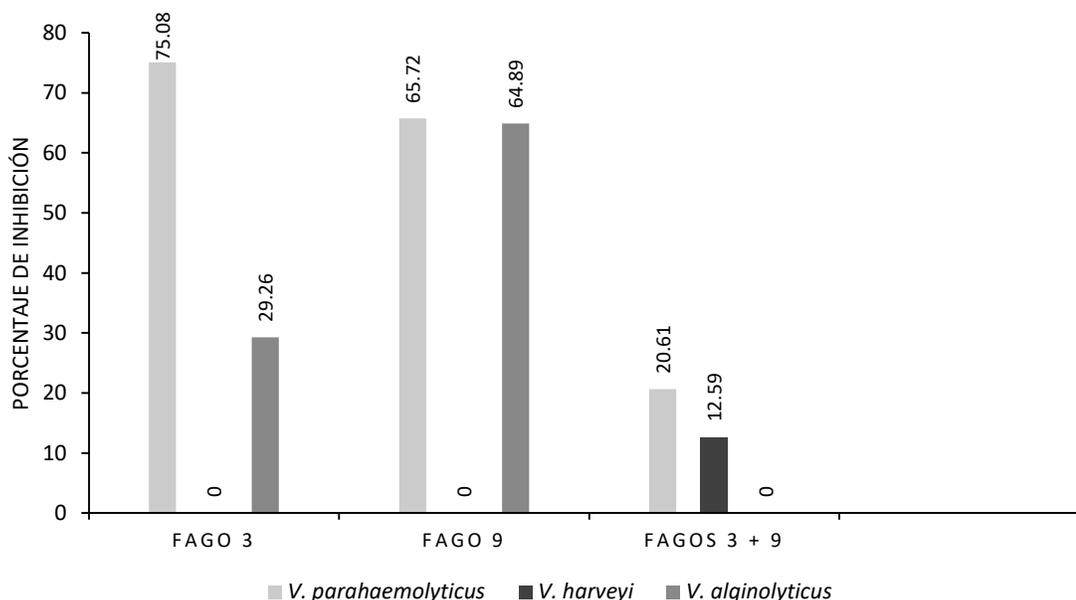


Figura 3. Porcentaje de inhibición de las bacterias objetivo al ser aplicados de manera individual y en coctel.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

IV.1 Determinación de la presencia de vibriófagos en muestras

La presencia de cierto tipo de fagos puede ser empleada como herramienta para indicar la presencia y la concentración de bacterias huésped (bacterias objetivo) en el medio (Havelaar *et al.* 1993, Health Canada 2004, Payment y Locas, 2011). El empleo de los fagos como indicadores de presencia de bacterias objetivo ha sido ampliamente demostrado (Mesquita *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos indican mayor abundancia de fagos específicos para *Vibrio parahaemolyticus*. Esto es consistente con los datos estadísticos que distinguen a *V. parahaemolyticus* como principal patógeno portador de vectores de virulencia lisogénica (EMS) (Zorriehzahra *et al.*, 2015). La técnica utilizada (doble capa de agar) permitió el aislamiento de fagos por lo que puede ser empleada como herramienta indicadora de la presencia, de las bacterias patógenas para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

La concentración de fagos en las muestras refleja la proporción en la que se encuentra de cada tipo de bacteria en el medio marino y por lo tanto es un indicador de la probabilidad de la aparición una infección. Según los resultados obtenidos, *Vibrio parahaemolyticus* fue la bacteria más abundante durante el periodo de muestreo.

IV.2 Especificidad

La alta vulnerabilidad de *Vibrio parahaemolyticus* a ser infectado en un 61.5% por los fagos aislados denota que ésta bacteria patógena estuvo presente durante el periodo de muestreo y por lo tanto es consistente con la mayor abundancia de fagos líticos. La alta susceptibilidad ante la presencia de fagos indica la presencia de un receptor trans-membrana genérico que puede ser identificado por los virus.

La baja susceptibilidad de *V. harveyi* y de *V. alginolyticus* puede ser indicador de su alta capacidad de resistir los fagos aislados; o bien también puede deberse a la baja presencia de ambas cepas durante el periodo de muestreo, lo cual reduce significativamente la presencia de sus fagos correspondientes. Algunos estudios han descrito a *V. alginolyticus* como probiótica en bajas concentraciones, pero patógena en altas concentraciones (Gomez-Gil *et al.*, 2002; Villamil *et al.*, 2003), esto puede sustentar el argumento de que se trata de la cepa más resistente debido a su alta capacidad genética para mutar y mediante éstos mecanismos generar resistencia a los fagos.

IV.3 Vulnerabilidad de las bacterias patógenas a los fagos

La cepa de *V. parahaemolyticus* fue la más susceptible a los fagos aislados de todos los puntos de muestreo, lo cual puede coincidir con su mayor abundancia. Esto puede deberse a que el factor de virulencia ocasionado por un virión lisógeno insertado en el cromosoma bacteriano disminuya la capacidad de la bacteria a generar resistencia al fago. Este fenómeno indica que cepas las virulentas de bacterias pudieran ser relativamente más fáciles de tratar con fagos; Labrie *et al.* (2010) indica que este último mecanismo debe ser sujeto a mayor estudio para corroborar que una cepa infectada con un fago lisógeno pueda ser nuevamente infectada con un fago lítico.

IV.4 Abundancia de fagos de bajo y amplio espectro

La mayor abundancia encontrada de fagos líticos específicos (70 %) para una sola cepa en comparación con fagos de amplio espectro (30 %) puede reforzar la teoría anteriormente mencionada de que la inserción de un gen de virulencia en el cromosoma bacteriano, proveniente de un virión lisógeno puede reducir drásticamente la capacidad de dicha cepa para generar resistencia al fago, mientras que las bacterias libres de lisógenos tienen mayor capacidad de resistencia a los fagos. Las cepas infectadas por lisógenos pueden ver comprometida su capacidad

de modificación del receptor trans-membrana OmpV genérico para *Vibrio* (Matsuzaki *et al.*, 1992), mientras que las células libres de profagos pueden ser infectadas por una menor proporción de fagos al poder generar resistencia. Si las zonas de muestreo tuvieron menor proporción de células infectadas por fagos lisógenos, se podrían explicar los porcentajes obtenidos.

IV.5 Vulnerabilidad a fagos administrados individualmente y en coctel

A diferencia de los resultados reportados por Crothers-Stomps *et al.* (2010) donde indicaba el aumento del efecto inhibitorio sobre la bacteria al aplicar un coctel de fagos, en la presente investigación se encontró una drástica disminución de la actividad lítica *in Vitro* y funcionalidad de los fagos administrados como coctel para inhibir a *V. parahaemolyticus*. De 75.08% (fago individual) a 20.61% (coctel). Mientras que para *V. alginolyticus* se evidencia el mismo fenómeno ya que al aplicar el fago de forma individual se obtuvo un 64.89% de inhibición, mientras que la administración en coctel no provoco inhibición.

Esta particularidad no puede ser generalizada ya que en el caso de *V. harveyi* el efecto inhibitorio fue nulo al administrar el fago de forma individual, mientras que en la aplicación del coctel de fagos la inhibición fue del 12.59%, aunque este porcentaje es bajo.

A diferencia de lo reportado por Lomelí-Ortega y Martínez-Díaz (2014), en el presente estudio se encontró que la especificidad de los fagos para lisar al huésped a través del receptor trans-membrana apropiado puede verse comprometida en la mayoría de los casos, si los fagos se administran en forma de coctel. Investigaciones previas indican la viabilidad de aplicación de cocteles de fagos para tratar *Vibrio* generando un porcentaje de inhibición de 80% a 100% (Nakai y Park, 2003; Verner-Jeffreys *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014); sin embargo en éste estudio no se observó éste fenómeno.

IV.6 Implicaciones del uso de fagos como indicadores de carga bacteriana

Es ampliamente conocido que el aislamiento de fagos será más probable en fuentes altamente contaminadas (Carlson, 2005). El presente estudio es evidencia de éste fenómeno. La laguna de Agiabampo fue el punto de muestreo que presentó mayor abundancia de fagos líticos para todas las cepas estudiadas. Esto puede deberse a la poca recirculación de agua que tiene este cuerpo de agua.

En base a lo descrito por Mesquita y colaboradores (2012), se pueden emplear a los fagos como indicadores; los resultados del presente estudio indican una alta polución y saturación de carga bacteriana patógena en la zona. Cabe destacar que en esta zona se encontraron fagos líticos para cepas que no fueron susceptibles a ningún fago de los otros puntos de muestreo. En este sentido Alagappan (2009) indica que la contaminación en las aguas, la poca recirculación y la presencia de gran cantidad de granjas que vierten sus desechos al mar, son características indispensables para el aislamiento de fagos líticos con capacidad terapéutica para tratar cepas patógenas que afectan a la acuicultura.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 Conclusiones

- La presencia y distribución de fagos en los puntos de muestreo en el medio marino no es la misma para todas las especies de bacterias patógenas.
- En el ensayo *in vitro*, el fago 3 presentó la inhibición más alta en contra de *Vibrio parahaemolyticus* llegando al 75.08% seguido por el fago 9 con 65.72%.
- El fago 3 inhibió en un 29% el crecimiento de *Vibrio harveyi*, mientras que el fago 9 mostró una inhibición del 64.89%.
- El efecto combinado (coctel) de la administración de los fagos 3 y 9 no mostró alta efectividad en la inhibición.
- Durante el periodo de muestreo, la costa del sur de Sonora presentó fagos líticos con potencial terapéutico en contra de bacterias patógenas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

V.2 Recomendaciones

Se recomienda:

- Si se desea aislar fagos de amplio espectro y alto efecto inhibitorio se deben tomar muestras de fuentes muy contaminadas, con alta presencia de descargas de granjas de camarón y poca recirculación de agua, tales como esteros, lagunas, ensenadas, bahías muy cerradas.

- Realizar evaluación previa de la funcionalidad de cada fago al ser aplicada como coctel, para observar si existe alguna interferencia, obstrucción o modificación en su efecto inhibitorio de su bacteria objetivo.
- Emplear la detección de fagos como herramienta indicadora de la calidad del agua, considerando la presencia y densidad de fagos como dato homólogo de la carga bacteriana de cepas objetivo en el agua o el tipo de muestra del cual fueron extraídos.
- En el caso de cepas patógenas con posible función probiótica, tal como el caso de *V. alginolyticus* se recomienda descartar la fagoterapia como alternativa de tratamiento.
- Realizar mayor investigación en la modificación de la funcionalidad de los fagos al ser administrados como coctel.
- Realizar estudios *in vivo* para evaluar la efectividad de los fagos en camarones infectados.

VI. LITERATURA CITADA

- Ackermann, H.W. 2006. Classification of bacteriophages. In *The Bacteriophages*, Ed. Calendar R, Oxford University Press, ISBN 0-19- 514850-9, New York, USA.
- Alabi, A. O., Yudiati E., Jones D.A., 1997. Bacterial Levels in *Penaeid* Larval Cultures. *Manila: Asian Fisheries Society*. 181: 25-36
- Alagappan K. M., B. Deivasigamani, S. T. Somasundaram y S. Kumaran. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Specific Phages from Shrimp Ponds in East Coast of India. *Curr Microbiol*. 61:235–240.
- Alday-Sanz, V., Iddya, K., y Indrani, K. 2007. Compositions comprising lytic enzymes of bacteriophages for treating bacterial infections. WIPO Patent Application WO/2007/128348.
- Balcázar J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J.L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114: 173-186.
- Brock J.A, Lea Master B., World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1992 p. 212-226.
- Cabello, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Carlson, K. 2005. Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches (Vol. 1, pp. 439-490). Boca Raton: CRC Press.
- Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., De Meester, E.D. y Loessner, M.J. 2005 Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence,

bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol* 43, 301–312

Castillo, D., Higuera, G., Villa, M., Middelboe, M., Dalsgaard, I., Madsen, L., y Espejo, R. T. 2012. Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids. *Journal of fish diseases*, 35(3), 193-201.

Chythanya R., Karunasagar I. y Karunasagar I., 2001 Inhibition of shrimp pathogenic *Vibrios* a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208: 1-10.

CONAPESCA 2014. Información Estadística por Especie y por Entidad. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Recuperado el 14 de septiembre del 2016. http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/informacion_estadistica_por_especie_y_entidad

Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, A. C. (COSAES). 2008. Informe final del ciclo 2007: Campaña de manejo integral contra patologías de camarón.

Crothers-Stomps, C., Høj, L., Bourne, D. G., Hall, M. R., y Owens, L. 2010. Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*. *Journal of applied microbiology*. 108(5): 1744-1750.

Donlan, R.M. 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in microbiology*. 17(2): 66-72.

Esquer-Miranda E., Nieves-Soto M., Rivas-Vega M. E., Miranda-Baeza A., y Piña-Valdez P. 2016. Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva*

- lactuca* on *Litopenaeus vannamei* survival in the presence of *Vibrio* bacteria. Fish & shellfish immunology. 51: 346-350.
- FAO. 2016. Biología y Ecología de *Artemia*. Depósito de Documentos de la FAO, Departamento de Pesca. Recuperado el 14 de septiembre de 2016. <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab474s/AB474S02.htm>
- FAO 2006-2016. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Actualizado 7 April 2006. [Citado 14 Septiembre 2016]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.
- Gatesoupe F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., y Velasco-Blanco, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. Aquaculture, 211(1-4), 43-48.
- Gopal, S., S. Otta, S. Kumar, I. Karunasagar, M. Nishibuchi y I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. Int J Food Microbiol. 102: 151–159.
- Hanlon, G.W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. International Journal of Antimicrobial Agents. 30: 118-128.
- Havelaar, A. H. 1993. Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. ASM news, 59(12), 614-619.

- Health Canada 2004. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation. Protozoa: Giardia and Cryptosporidium. Enteric viruses. Prepared by the Federal-Provincial- Territorial Committee on Drinking Water. Ottawa, Ontario, Canada.
- Holmström K., S. Gräslund, A. Wahlström, S. Pongshompoo, B.E. Bengtsson y N. Kautsky. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38:255–266.
- Karunasagar I., R. Pai, G.R. Malathi y I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture.* 128:203–209.
- Karunasagar, I., Vinod, M. G. Kennedy, B. Vijay, A., Deepanjali, A., Umesha, K. R., y Karunasagar, I. 2005. Biocontrol of bacterial pathogens in aquaculture with emphasis on phage therapy. *Diseases in Asian Aquaculture V.* Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 535-542.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., y Moineau, S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317-327.
- Lightner, D. V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science (Netherlands).*
- Lightner D.V., Redman R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture.* 164: 201–220.
- Madigan M.T, J.M. Martinko y J. Parker. 1999. Brock. *Biología de los Microorganismos.* Prentice Hall, España, 1064 p.
- Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Shakir, C., Gandhimathi, R., y Panikkar, M. V. N. 2009. Biopotentials of seaweeds collected from southwest coast of India. *Journal of Marine Science and Technology*, 17(1), 67-73.

- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., y Martínez-Porchas, M. 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7(2), 131-148.
- Martínez-Díaz, S. F., y Hipólito-Morales, A. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, 400, 120-124.
- Martínez-Díaz S.F. y C.O. Lomelí-Ortega. 2014. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture* 434: 208-211.
- Matsuzaki, S., Tanaka, S., Koga, T., y Kawata, T. 1992. A Broad-Host-Range Vibriophage, KVP40, Isolated from Sea Water. *Microbiology and immunology*, 36(1), 93-97.
- Mayer G. P. y F. Arredondo. 2016. Microbiología e Inmunología, Bacteriología – Capítulo Siete: Bacteriófagos. Universidad de Carolina del Sur e Instituto Politécnico Nacional. Recuperado el 6 de Septiembre del 2016 <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter7.htm>
- Medina-Velázquez L.Q., Guerrero-Morales J.Y., Palomar-Morales L., Rico-Prince G., Mesquita, M. M., y Emelko, M. B. 2012. Bacteriophages as surrogates for the fate and transport of pathogens in source water and in drinking water treatment processes. In *Bacteriophages*. InTech.
- Mohney L.L. y Lightner D.V. 1994 An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J World Aquacult Soc.* 25:116–125.
- Morales-Covarrubias, M. S. 2008. Enfermedades bacterianas (capítulo 3). En *Patología e Inmunología de Camarones*. Morales y, V., Cuellar-Angel, J.(Eds.), Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá, 120-134.

- Morrison, S., y Rainnie, D. J. 2004. Bacteriophage therapy: an alternative to antibiotic therapy in aquaculture? Science, Oceans and Environment Branch, Department of Fisheries and Oceans.
- OMS. 2015. Inocuidad de los Alimentos. Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 7 de Septiembre de 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- Park, S. C., y Nakai, T. 2003. Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. Diseases of aquatic organisms, 53(1), 33-39.
- Payment P. y Locas A. 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. Ground Water 49(1): 4-11.
- Renteria, F.I., (2009), Evaluación de la Fagoterapia para Control de *Vibrio* en Acuicultura. Memoria de Residencias Profesionales de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Bahía de Banderas, Nayarit, México.
- Rohwer F., Prangishvili D., y Lindell D. 2009. Roles of viruses in the environment. Environmental Microbiology, 11(11): 2771
- Ronda C., Vázquez M., y López R. 2003. Los bacteriófagos Como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. Revista AquaTIC. 8: 3-10.
- Santiago, M.L., A. Espinosa y M.C. Bermúdez. 2009. Use of antibiotics in culture shrimp. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 40:3.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., y Ansquer, D. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture, 191(1-3), 133-144.
- Scholz, U., Diaz, G. G., Ricque, D., Suarez, L. C., Albores, F. V., y Latchford, J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture, 176(3-4), 271-283.

- Silva, Y. J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, Â., Calado, R. y Almeida, A. 2014. Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PloS one*, 9(12), e114197.
- Sung, H. H., Hsu, S. F., Chen, C. K., Ting, Y. Y., y Chao, W. L. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture*, 192(2-4), 101-110.
- Suttle C. A. 2007. Marine viruses, major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5: 801-812.
- Tanji Y., Shimada T., Fukudomi H., Miyanaga K., Nakai Y. y Unno H. 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157: H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of bioscience and bioengineering*. 100(3): 280-287.
- Tarfur J. D., J.A. Torres y J.M. Villegas. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*. 12:227-232.
- Verner-Jeffreys, D. W., Algoet, M., Pond, M. J., Virdee, H. K., Bagwell, N. J., y Roberts, E. G. 2007. Furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is not readily controllable by bacteriophage therapy. *Aquaculture*, 270(1-4), 475-484.
- Verpraet R., Chair M., Leger P., Nelis H., Sogeerloos P. y De Leenheer A., 1992. Livefood mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and *Artemia* nauplii. *Aquaculture Engineer*. 11:113– 139.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., y Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219(1-4), 43-56.

- Vinod M.G., M.M. Shivu, K.R. Umesha, B.C. Rajeeva, G. Krohne, I. Karunasagar y I. Karunasagar. 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255:117–124.
- Vispo N. S. y Y. Puchades. 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*.18:135-147.
- Weinbauer M.G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol.* 28:127-181.
- Zorriehzahra, M. J., y Banaederakhshan, R. 2015. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(2S), 64-72.