

03067



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MEXICO

6
7oj.

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales
Colegio de Ciencias y Humanidades

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
Especialización, Maestría y Doctorado en Ciencias del Mar

"CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE
BACTERIAS DEL GENERO VIBRIO EN SISTEMAS
DE ACUICULTURA EN ENSENADA B. C. MEDIANTE
EL ESTABLECIMIENTO DE UN CONJUNTO MINIMO
DE PRUEBAS TAXONOMICAS."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR
(OCEANOGRAFIA BIOLOGICA Y PESQUERA)

P R E S E N T A

BIOL. LEOBARDO MONTOYA RODRIGUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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 titular de los Derechos de Autor.

INDICE DE APENDICE:

Cuadro 1. Reportes de enfermedades producidas por bacterias del Género <i>Vibrio</i> a organismos acuáticos.	50
Cuadro 2.a. Síntesis de los muestreos bacteriológicos realizados a los sistemas de acuicultura. CICESF - IIO.	53
Cuadro 2.b. Síntesis de los muestreos bacteriológicos en el sistema abierto de cultivo de camarón (<i>P. stylirostris</i>). Progenitores (IIO).	54
Cuadro 2.c. Síntesis de los muestreos en el sistema (semicerrado) de cultivo de larvas de camarón. Temperatura 25°C (IIO).	55
Figura 1. Método de inoculación múltiple	56
Figura 2. Dendrograma	57
Figura 3. Gráficas	58
Esquema 1. Sistema de acuicultura del IIO	62
Esquema 2. Sistema de acuicultura del CICESE	63
Anexo 1. Conjunto de pruebas taxonómicas aplicado.	65
Anexo 2. Descripción de los medios de cultivo y técnicas aplicadas en su elaboración.	66
Anexo 3. Hoja de registro.	78

RESUMEN :

El desarrollo de la acuicultura, en diversas partes del mundo, ha puesto de manifiesto la importancia de algunas bacterias patógenas para los organismos en cultivo y han sido reportados muchos casos de epizootias. Las bacterias que se han aislado de estos casos pertenecen principalmente al género *Vibrio sp.*

Se realizó un estudio de Taxonomía Numérica aplicando un conjunto de 47 pruebas taxonómicas sobre 93 cepas silvestres pertenecientes al género mencionado, aisladas de diferentes sistemas de acuicultura y 6 cepas de colección de la ATCC * que sirvieron como referencia.

El conjunto de pruebas taxonómicas se estableció tomando en cuenta: el grado de complejidad que representa cada una de las pruebas, la infraestructura requerida, la información fenotípica que aporta y la característica discriminante para cada una de las especies del género estudiado.

La similitud entre las cepas fue calculada mediante el coeficiente de Jaccard. El dendrograma correspondiente se elaboró mediante la técnica de pares promediados de acuerdo con Sokal y Sneath, 1963.

* ATCC = American Type Culture Collection.

Se presentó una clara agrupación de las cepas de acuerdo con su procedencia.

Con base en el análisis fenotípico realizado se establecieron dos grupos: el grupo I, fue el más importante cuantitativa y cualitativamente, ya que en él se concentraron la mayoría de las cepas caracterizadas, lográndose identificar cepas silvestres halofílicas pertenecientes a *V. parahaemolyticus* y otras bioluminiscentes como *V. harveyi*.

El grupo II presentó características fenotípicas particulares y un bajo porcentaje de similitud entre las cepas que lo conforman y con el grupo I.

Se presentan los valores de bacterias saprófitas, *Vibrio* y coliformes totales detectados en diferentes puntos de los sistemas muestreados así como en los cultivos de artemia, abulón y camarón.

Estos resultados demuestran la importancia de este tipo de monitoreos bacteriológicos en forma rutinaria con el fin de detectar la presencia de bacterias potencialmente patógenas, controlar las fuentes de contaminación y evitar con ello posibles epizootias debidas a estos microorganismos.

Todo lo anterior constituye un factor determinante en la estabilidad y productividad de los sistemas de acuicultura.

INTRODUCCION :

El incipiente desarrollo de la acuicultura en México se ha favorecido por la diversidad de condiciones geográficas y climáticas imperantes en el país, así como por la variedad de especies cuya biotécnica de cultivo se domina actualmente y por otras cuyo potencial es de gran importancia.

La experiencia obtenida por otros países con mayor tradición en la acuicultura, ha demostrado la necesidad de establecer un control sanitario, desde el punto de vista bacteriológico, con el fin de detectar, evitar y controlar los agentes potencialmente patógenos. Estas experiencias deben ser utilizadas por países como el nuestro para evitar posibles epizootias, erradicar enzootias y de la misma manera, tener la ventaja de obtener un excelente control de calidad del producto sin provocar las alteraciones ecológicas que ocasiona la práctica del cultivo extensivo.

En las últimas dos décadas los estudios bacteriológicos aplicados a la acuicultura han recibido gran importancia y se ha comprobado que las bacterias del género *Vibrio* son los agentes patógenos más importantes, debido a la gran heterogeneidad que muestran con respecto a los organismos que afectan y a los mecanismos de infección que presentan.

De igual manera se ha puesto en evidencia la necesidad de establecer y estandarizar metodologías que permitan la detección e identificación de las especies patógenas presentes en los sistemas de cultivo, así como las posibles fuentes de entrada de estos agentes.

Los trabajos realizados en los últimos años, enfocados a la identificación de dichas especies, utilizan numerosas pruebas de caracterización (> 100) con alto grado de complejidad y requerimientos de infraestructura que no contemplan los recursos y necesidades, tanto de granjas acuícolas como de algunos centros de investigación dedicados a la acuicultura.

El laboratorio de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. (CICESE), ha estado involucrado en la problemática bacteriológica que se presenta en los diferentes sistemas de acuicultura, con el fin de establecer técnicas y metodologías como herramientas eficientes y fácilmente aplicables en centros y granjas acuícolas de nuestro país.

El estudio que se presenta se llevó a cabo en el Centro de investigación mencionado y se dirigió principalmente al cultivo de camarón, debido a la importancia que éste ha adquirido en los últimos años en nuestro país y a la oportunidad que se presentó de trabajar en forma conjunta con un proyecto sobre maduración gonádica de *P. stylirostris* realizado en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC (IIO). De igual manera se hicieron los primeros intentos de un muestreo sistemático conforme el desarrollo larvario de este organismo en cultivo.

También se aislaron, para este estudio, cepas bacterianas a partir de cultivo de Abulón, Artemia y del sistema cerrado de abastecimiento de agua del laboratorio de acuicultura del CICESE.

De las cepas silvestres aisladas durante los muestreos realizados se trabajo finalmente con 93 y se añadieron a este conjunto 6 cepas de referencia del genero *Vibrio* provenientes de la ATCC, que sirvieron como marcadores.

Se estableció un conjunto mínimo de 47 pruebas taxonómicas que se aplicó al 100 % de las cepas mencionadas.

Los resultados se trabajaron a través de métodos estadísticos aplicados a la taxonomía numérica.

Se presentan cuadros, gráficas y figuras de los resultados correspondientes.

OBJETIVOS:

- Aplicación de metodos sencillos, para la evaluación de la calidad sanitaria (desde el punto de vista bacteriológico) en diferentes fases del cultivo de organismos acuáticos.
- Detectar la presencia de bacterias *Vibrio* y fuentes de entrada a los diferentes sistemas muestreados.
- Caracterización e identificación de bacterias del genero *Vibrio* aisladas de sistemas de acuicultura.
- Establecer un conjunto mínimo de pruebas taxonómicas eficaz y facilmente aplicable para la identificación de las principales especies patógenas.

I. ANTECEDENTES.

1.1 CLASIFICACION. El género *Vibrio*, pertenece a la familia vibrionaceae propuesta por Veron en 1965 (Baumann y Schubert, 1984). La decisión de formar este género y abolir los generos *Benekea* y *Lucibacterium* se ha basado en estudios genéticos, bioquímicos y de comparación inmunológica.

En los últimos 15 años, el interés por esta familia, se ha incrementado de manera extraordinaria y se ha logrado una clara distinción entre *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*, de igual manera nuevas especies han sido publicadas (West y Colwell, 1984).

Actualmente y de acuerdo con el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984) dentro de la familia Vibrionacea, el género *Vibrio* comprende bacterias que son bastones rectos o curvados, Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles por medio de flagelos polares, no formadores de esporas, quimio-organotrofos, oxidasa positiva, la mayoría requiere de 2 a 3% de NaCl. Son principalmente acuáticos, encontrándose en el mar, agua dulce y en asociación con animales que viven en estos medios.

Algunas especies son patógenas para el hombre, peces, crustáceos y moluscos, así como para otros vertebrados e invertebrados. El rango óptimo de temperatura es entre 20 y 30 °C.

Las bacterias del género *Vibrio* crecen sobre una gran variedad de medios y muestran un requerimiento de NaCl casi absoluto.

Algunos medios selectivos han sido formulados para el aislamiento de algunas especies patógenas, principalmente *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, considerándose al medio TCBS* como el más selectivo de todos y en el que pueden recuperarse una mayor cantidad de vibrios del medio ambiente (Kobayashi et al., 1963; Bolinches et al., 1988).

Una amplia descripción de propiedades morfológicas, fisiológicas y nutricionales así como la justificación acerca de la clasificación actual de estos organismos, puede encontrarse en el manual antes mencionado.

I.2 ECOLOGIA. Los diversos rangos de temperatura y los distintos requerimientos de concentraciones de NaCl necesarios para el crecimiento óptimo de las especies de *Vibrio*, demuestran su potencialidad para habitar diferentes medios acuáticos: estuarinos, salobres e incluso dulceacuícolas (Colwell, 1984; Roberts et al., 1984).

Se han aislado a partir de sedimentos y de columna de agua, donde participan en los procesos de degradación de materia orgánica; en algunas regiones templadas han mostrado ciclos estacionales, presentándose en el sedimento durante el invierno e incrementando su concentración en la columna de agua conforme ésta supera los 14 °C. Esta variación podría estar relacionada con la cantidad de plancton y ser importante en la degradación de quitina zooplanctónica (Kaneco y Colwell, 1978).

* TCBS = Tiosulfato Citrato sal de Bilis agar Sacarosa (DIFCO)

En la mayoría de los estudios ecológicos de bacterias marinas luminiscentes, *V.harveyi*, *V.splendidus*, y *V.fisherie* han estado presentes (Ruby et al., 1980; Ruby y Nealson, 1978).

Algunas bacterias luminiscentes tienen la capacidad de estar en asociación simbiótica con animales marinos, por ejemplo: *V.fisherie* ha sido encontrado en los órganos luminosos especializados de peces teleosteos y en calamar, y junto con *V.harveyi*, fueron aislados de la superficie corporal y de los contenidos intestinales de organismos marinos (Ruby y Nealson, 1976; Tebo et al., 1979; O'Brien y Sizemore, 1979).

La presencia de bacterias del género *Vibrio* en aguas oceánicas, costeras, estuarinas, y su asociación con numerosos casos de epizootias ha provocado que sean consideradas patógenas oportunistas (Colwell, 1984).

También, especies dulceacuícolas cultivadas se han visto afectadas por *Vibrio sp.*; aunque generalmente han sido especies anadromas o catadromas y las infecciones pudieron ser adquiridas en aguas costeras, estuarinas, (por ejemplo: salmón y anguila) o a través del alimento suministrado (Hedrick, 1990). *

I.3 IMPORTANCIA EN LA ACUICULTURA. Con el auge de las actividades acuiculturales, se han desarrollado y utilizado en varias partes del mundo tres tipos básicos de sistemas de cultivo:

* Comunicación personal. Depto. Med. Vet. Universidad de Davis, Cal.

1) Extensivo. en el cual los organismos son mantenidos en bajas densidades, en estanques rústicos o cuerpos de agua naturales y no se realiza manejo alguno de los parámetros físicos, químicos y biológicos.

2) Semi-intensivo. Son cultivos con densidades moderadas, en estanques, tanques o cajas y en donde se realiza solamente un manejo moderado de los organismos y de los parámetros.

3) Intensivo en el cual los organismos son cultivados en altas densidades y es necesario un control intenso de los parámetros, desde la producción de larvas hasta la obtención de individuos con tallas comerciales. Es en este sistema donde la aparición de enfermedades infecciosas es mayor; pero también donde la detección temprana y el tratamiento es posible.

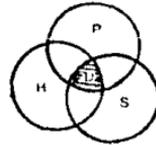
En los dos últimos sistemas descritos, los mismos incentivos económicos que conducen a la práctica de estos cultivos, obligan a realizar esfuerzos para reconocer, controlar y evitar los agentes potencialmente patógenos. De esta manera se tiene la ventaja de obtener un excelente control de calidad del producto sin provocar las alteraciones ecológicas que ocasiona la práctica del cultivo extensivo (Sindermann y Lightner, 1988).

Desafortunadamente, las condiciones óptimas para el cultivo y desarrollo de los organismos, favorecen tanto el crecimiento y multiplicación de las bacterias, como a la acumulación sus metabolitos.

Por otra parte, los cambios ambientales incrementan el estado de "stress"* del organismo cultivado, disminuyendo sus defensas inmunológicas y propiciando el desarrollo de la infección.

La relación hospedero - patógeno - medio ambiente, ha sido descrita por Smetzko, 1978 de la siguiente manera:

$$H + P + S^2 = D$$



H= representa la especie del hospedero

P= Patógeno

S= "stress" del medio ambiente

D= Enfermedad que resulta si los tres componentes anteriores se presentan en determinada calidad y cantidad.

(Tomado de Wedemeyer et al., 1976)

En la ecuación antes descrita, la "S" es utilizada al cuadrado debido a que el "Stress" causado por el medio ambiente se incrementa en progresión geométrica cuando las condiciones están alcanzando los límites de tolerancia del hospedero.

La mayoría de las epizootias causadas por *Vibrio sp.* en sistemas de acuicultura han estado asociadas a diferentes factores ambientales no óptimos para la especie cultivada.

* "Stress" : Estado fisiológico de tensión que desencadena una respuesta de alerta a nivel endócrino.

Cuatro especies de *Vibrio* han sido las más comúnmente asociadas con epizootias y mortalidades de organismos cultivados (principalmente peces, crustáceos y moluscos), dichas especies son: *V. anguillarum* (Sinderman, 1988; Rosemark y Fisher, 1988; Lightner, 1988), *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* (Lightner, 1988), y en los últimos años *V. ordalii* (Austin y Austin, 1987). Este último corresponde al Viobar II de *V. anguillarum* (Bergey's Manual, 1984).

Otras especies como : *V. fisherie*, *V. logei*, *V. harveyi* y *V. vulnificus* se han reportado en casos esporádicos, asociadas con alguna enfermedad en diversos organismos en cultivo.

El cuadro 1 resume varios reportes de enfermedades producidas por alguna de las especies del género *Vibrio*.

I.4 VIBRIOSIS. Fue descrita por primera vez en peces, por Bonaveri en 1718 (Sinderman, 1984). Tubiash en 1975 reconoció a esta enfermedad como un fuerte obstáculo en el cultivo de moluscos marinos. Sindermann en 1970 y Evelyn en 1971, la consideran como un serio problema en la acuicultura marina en general. Subsecuentes publicaciones han confirmado esta observación (Lewis, 1973; Lightner y Lewis, 1975; Lightner, 1975; Austin y Austin, 1987).

Vibrio anguillarum es el patógeno más importante en peces y fue identificado como la causa de la enfermedad letal llamada "red disease", en anguilas en Europa (Bergman, 1909; Nybelin, 1935). Esta especie ha estado asociada con mortalidades en otros peces, teniendo grandes consecuencias en salmónidos cultivados en ambientes salados.

En los últimos años una nueva especie, *Vibrio ordalii* ha sido descrita como responsable de vibriosis en peces (Schiewe et al., 1981 ; Fryer y Rohovec, 1984).

Otros vibrios como *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* se han encontrado asociados con enfermedades de organismos estuarinos y marinos (Austin y Austin, 1987; Lightner, 1988).

Actualmente, la inmunización de peces con una bacterina polivalente es posible, y aunque la vibriosis continúa siendo un problema, ahora es considerado un factor controlable en el cultivo de salmón en Europa y Norteamérica (Fryer y Rohovec, 1984; Schiewe et al., 1988) sin embargo, en la camaricultura sólo se ha obtenido una ligera protección al aplicar este método de inmunoprofilaxis (Lewis y Lawrence, 1985).

La vibriosis es la enfermedad más importante en los cultivos de moluscos y ha sido encontrada en estadios larvarios y juveniles de diferentes especies de moluscos bivalvos, principalmente *Crasostrea virginica*, *C. gigas*, *Ostrea edulis*, *Mercenaria mercenaria* y *Mytilus edulis* (Tubiaeh et al., 1965, 1970; Brown, 1973; Brown y Losse, 1978; Elston y Leibovitz, 1980).

También ha sido reportada como una enfermedad importante en abulón en la costa oeste de los Estados Unidos (Elston y Lockwood, 1983). (Tabla 1)

En California existe un gran interés por el cultivo del abulón rojo (*H. rufescens*) y bacterias patógenas del género *Vibrio* han sido reconocidas como responsables de mortalidades en estos organismos (Elston y Lockwood, 1983).

En estos cultivos, una fuente importante de entrada de bacterias patógenas, pueden ser los cultivos de microalgas que se suministran como alimento, actuando como una fuente repetitiva de inoculación de organismos patógenos.

Una de las enfermedades más comunes, en crustáceos de importancia económica, es la erosión en el exoesqueleto, debida a la presencia de bacterias degradadoras de quitina, y nuevamente el genero *Vibrio* ha estado presente como un importante agente etiológico de dicha enfermedad (Sindermann, 1989). Cuadro 1.

En el cultivo de camarón, los vibrios han emergido como patógenos importantes, principalmente en organismos juveniles (larvas y primeros estadios), aunque tambien adultos se han visto afectados.

La mayoría de las especies que han sido aisladas de organismos enfermos son: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* (Lightner, 1988). Vanderzant et al., 1970 encontró que la causa de altas mortalidades de *Penaeus aztecus* obtenidas en un cultivo experimental en laboratorio (93.85% en 24 horas) fue la alimentación suministrada que consistió en trozos de *P. setiferus* congelados.

El agente etiológico fue identificado como *V. parahaemolyticus*. De igual manera se ha encontrado que *Vibrio sp.*, produce mortalidades del 100% en poblaciones de larvas, post-larvas y juveniles de camarón cultivado en forma intensiva en estanques (Lightner, 1977).

En México se han reportado algunos casos de epizootias en *P. stylirostris* causadas por *V. anguillarum* (Lightner, 1975).

En cultivos del mismo organismo, se han aislado especies luminiscentes del género *Vibrio* con capacidad quitinoclastica, aunque su papel patogénico no ha sido comprobado (Montoya et al., 1990).

En crustáceos, bacterias del género *Vibrio* son parte de la "flora" normal y son consideradas patógenos oportunistas debido a que diversos factores externos pueden, por un lado, favorecer la proliferación de estas bacterias y por otro, disminuir los mecanismos de defensa de los organismos, propiciando el desarrollo de la enfermedad.

El "stress" causado en los organismos por densidades altas, malos manejos, procesos de muda y captura, pueden provocar mayor vulnerabilidad en los animales y ocasionar que las bacterias infecten, penetren en la hemolinfa y produzcan casos letales de bacteremia (Lightner, 1980).

Todas las especies de *Penaeus* pueden verse afectadas por estas bacterias y los signos clínicos varían con el tipo de infección.

1.5 MECANISMOS DE INFECCION.

La heterogeneidad de *Vibrio sp.*, con respecto a los organismos que afectan, se debe principalmente a los mecanismos de infección que presentan:

1) Producción de enzimas extracelulares (proteasas, lipasas y quitinasas) que permiten la implantación y penetración a los tejidos, causando en casos extremos septicemias. También pueden favorecer la acción de otros organismos oportunistas como hongos u otras bacterias. Afectan a peces, moluscos y principalmente a crustáceos (Sindermann, 1989).

2) Producción de toxinas extracelulares. Se ha observado que causan licuefacción de tejidos produciendo grandes mortalidades, principalmente en larvas de moluscos, también pueden provocar efectos teratogénicos (Elston et al., 1982; Sindermann, 1988).

3) Producción de hemolisinas. Se han reportado que algunas especies de *Vibrio* (*V. vulnificus*, *V. anguillarum* y *V. cholerae*) tienen la capacidad de producir este tipo de enzimas, que causan fuertes anemias en peces (Munn, 1978 y 1980).

4) Presencia de plásmidos de virulencia. Se han encontrado solamente en cepas altamente virulentas de *V. anguillarum* (Austin y Austin, 1987). Estos plásmidos codifican para la producción de un sistema altamente eficiente para el hierro, lo cual capacita a la célula bacteriana para competir por el hierro disponible en el tejido del animal infectado (Crosa et al., 1981; Crosa et al., 1983).

I.6 IDENTIFICACION.

En años recientes el número de especies conocidas del género *Vibrio* que afectan a organismos en cultivo ha aumentado, y se espera que conforme las actividades de maricultura se incrementen se descubran nuevas especies.

Algunos investigadores (Colwell, 1970; Baumann, et al., 1971; Lee, et al., 1978, 1981; West et al., 1983, 1986; West y Colwell, 1984; Brown, y Petti, 1988; Chan, et al., 1989) han caracterizado e identificado, a través de taxonomía numérica, bacterias del género *Vibrio* aisladas de diferentes

ambientes acuáticos con el fin de conocer el papel ecológico de estos organismos e identificar las especies potencialmente patógenas.

Las pruebas de caracterización utilizadas para tal fin, han sido numerosas y presentan un grado de complejidad que no contemplan los recursos y necesidades de granjas acuícolas e incluso de algunos centros de investigación avocados a esta actividad.

El uso de tablas de diagnosis para la identificación de Vibrios patógenos a partir de aislamientos frescos, presenta el riesgo de una sobre-simplificación, por lo que la atención se ha dirigido al desarrollo de técnicas de identificación rápidas y confiables, por ejemplo: Kent, 1982 y Maugeri, et al., 1983; enfatizaron la utilidad del sistema de identificación del "API 20E" *. Sin embargo reportaron patrones diferentes para las mismas especies de *Vibrio* identificadas mediante este sistema.

Generalmente las granjas de acuicultura están lejos de laboratorios e institutos que podrían hacer diagnosis, y es necesario crear una metodología sencilla para que gente con limitada experiencia en bacteriología pueda aislar e identificar, por lo menos a nivel de género, las bacterias patógenas más importantes de peces, moluscos y crustáceos. Otras pruebas adicionales deberían ser realizadas por bacteriólogos con más experiencia y con laboratorios bien equipados para permitir la identificación a nivel de especie.

*API 20E. Este sistema consiste en un conjunto de 20 microtubos que contienen diferentes sustratos deshidratados y que son reconstituídos al adicionar la suspensión bacteriana a identificar. La utilidad de este sistema está ampliamente demostrada para enterobacterias y otras bacterias Gram-negativas, siempre que se utilicen los procedimientos convencionales. Por lo tanto al intentar identificar bacterias marinas del género *Vibrio*, mediante este sistema no es muy confiable.

En base a lo anterior, existe en nuestro país una creciente necesidad de establecer una metodología confiable que permita identificar las especies bacterianas endémicas del género mencionado, mediante pruebas de caracterización que reúnan las siguientes características:

- Que sean lo más discriminantes posible entre las diferentes especies, para que permita el reconocimiento de aquellas potencialmente patógenas.
- Que no requieran personal altamente especializado.
- Mínimos requerimientos de infraestructura.
- Costos reducidos de los medios y reactivos necesarios.
- Bajo consumo de tiempo.
- Que permitan la aplicación de un proceso matemático para agrupar aquellas cepas con mayor porcentaje de similitud y su diferenciación con otras especies.

Entre los diferentes coeficientes de asociación utilizados para taxonomía numérica en bacteriología, se encuentra el coeficiente de Jaccard (S_j). Este coeficiente nos permite conocer la similitud existente entre algunas especies y disimilitud con otras, en base a las respuestas fisiológicas obtenidas de cada una de las pruebas efectuadas a las cepas aisladas y sometidas al proceso de identificación.

El hecho de que este coeficiente sólo considere las respuestas positivas, en la utilización de un sustrato, producción de enzimas u otro tipo de reacciones, es de gran significado si tomamos en cuenta que las respuestas negativas pueden tener implícitas fallas genéticas.

De igual manera existen métodos de agregación taxonómica que junto con el coeficiente mencionado, nos permiten obtener el agrupamiento de algunas cepas estudiadas y la separación con otras hasta constituir el dendrograma correspondiente.

II. REGION DE LOS ESTUDIOS.

Ensenada B.C. está ubicada en la parte norte de la península de Baja California, donde actualmente se desarrolla una intensa actividad acuicultural debido a la alta productividad de sus aguas y gran riqueza de especies marinas potencialmente cultivables (ostión, mejillón, abulón, almeja, erizo, artemia, camarón, microalgas, etc.).

En este lugar se encuentran: el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IO), la Escuela de Ciencias Marinas de la UABC y el Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada B.C. (CICESE); instituciones que ejercen, entre sus actividades, la acuicultura.

Desde 1986, el laboratorio de Biotecnología Marina (CICESE) ha estado relacionado con la problemática bacteriológica que presentan los diferentes sistemas de cultivo de estas instituciones.

Los estudios realizados al respecto, (Lizárraga Partida et al., 1987; Montoya y Lizárraga-Partida, 1990) demostraron en forma sobresaliente: que bacterias del género *Vibrio* se encuentran con gran frecuencia, tanto en los sistemas de abastecimiento de agua de mar como en los mismos cultivos y que una fuente de entrada importante de estas y otras poblaciones bacterianas a los estanques de cultivo es el alimento que se suministra a los organismos.

Estos estudios, también revelaron la necesidad de crear una infraestructura que permita la identificación de las especies

potencialmente patógenas (particularmente *Vibrio*) con el fin de desarrollar métodos rápidos de diagnóstico de enfermedades causadas por este tipo de bacterias.

Las características de los sistemas de cultivo muestreados para la elaboración de este trabajo y esquemas correspondientes, se presentan en el capítulo III.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1 ESTABLECIMIENTO DEL CONJUNTO DE PRUEBAS TAXONOMICAS.

Con el fin de establecer el conjunto mínimo de pruebas de caracterización que permitiera identificar las diferentes especies del género *Vibrio* aisladas, se llevó a cabo una exhaustiva investigación bibliográfica de los trabajos más sobresalientes sobre taxonomía de este género bacteriano. Se consideró un resultado positivo cuando en la literatura, una especie presentaba un valor $>$ al 80 % para una característica determinada. de esta manera se obtuvieron resultados teóricos a los que se aplicaron métodos numéricos obteniéndose el dendrograma correspondiente.

Se seleccionaron sólo aquellas pruebas en las que se combinaran sus características discriminantes y los requerimientos mínimos de infraestructura y de reactivos costosos.

Como resultado de lo anterior se estableció el siguiente conjunto de pruebas:

MORFOLOGICAS

- Bastones Gram Negativos
- Morfología Colonial (forma y color en TCBS y Agar Marino)

FISIOLOGICAS

- Movilidad
- Crecimiento a diferentes temperaturas 10, 25 y 42 °C
- Crecimiento a diferentes salinidades 0, 6, 8 y 10 ‰

BIOQUIMICAS

- Ornitina decarboxilasa
- Arginina dihidrolasa
- Lisina decarboxilasa
- Degradación de tiroxina
- Citocromo oxidasa
- Lipasa
- Quitinasa
- Bioluminiscencia
- Alginasa
- Amilasa

NUTRICIONALES

- AMINOACIDOS: Alanina, Asparagina, Aspartato, Glicina, Glutamato, Leucina, Ornitina, Prolina y Serina.
- AZUCARES Arabinosa, Sacarosa y Xilosa
- AZUCAR-ACIDO Glucuronato, Galacturonato
- AZUCAR-ALCOHOL Manitol
- ALCOHOLES Ethanol y Propanol
- ACIDOS DICARBOXILICOS Fumarato y Succinato
- HIDROXIACIDOS Glicerato, Glutarato y Lactato
- ACIDOS GRASOS Acetato, Propionato, Isoaminobutirato e Isoaminovalerato
- AMINAS Putresina

TOLERANCIA

- Crecimiento en el medio TCBS
- Sensibilidad al agente vibriostático O/129 (10,50,150 mg/ml)

III.2 MUESTREOS.

Las cepas bacterianas con las que se trabajó, fueron aisladas a partir de muestreos bacteriológicos realizados a diferentes sistemas de cultivo de organismos marinos. Para lo cual se utilizaron frascos de 250 ml. previamente esterilizados. Los sistemas de cultivo muestreados y sus características fueron las siguientes:

A) ESTANQUES DE MADURACION DE *Panaeus stylirostris*. Estos sistemas consistían en estanques circulares de polietileno de color negro con las siguientes características :

a) DIMENSIONES

CAPACIDAD 5,000 l.

DIAMETRO 3.5 m

ALTURA 0.74 m

b) ABASTECIMIENTO DE AGUA DE MAR

FLUJO CONTINUO (Sistema abierto) 5.0 l./ min

FILTRACION 50 micras

BACTERIAS HETEROTROFAS VIABLES entre 3000 y 4000 UFC/ml

BACTERIAS DEL TIPO *Vibrio* no se detectaron

SALINIDAD 34.5 ‰

TEMPERATURA 28 +/- 0.5 °C

OXIGENO DISUELTO rango entre 4 y 6 ‰

pH rango entre 7.5 y 8.5

INTENSIDAD DE LUZ 0.6 m Es /m² s

FOTOPERIODO 13 hrs luz / 11 hrs obsc.

c) ORGANISMOS

DENSIDAD	6 organismos/m ³
PROPORCION (MACHOS-HEMBRAS)	1:1
PESO PROMEDIO POR ESTANQUE	46.33 g

d) ALIMENTACION

Se les suministró una dieta combinada de calamar fresco congelado, cabeza de camarón picada y alimento preparado en presentación peletizada mezclada en una proporción de 1:2:1 con respecto al 10% del peso total de la biomasa en cada estanque, repartida diariamente en cuatro horarios: 8, 12 y 22 horas.

e) LIMPIEZA

Antes de cada alimentación se llevó a cabo una remoción de residuos, desechos y mudas presentes en el estanque.

f) CALIDAD BACTERIOLOGICA EN EL AGUA DE LOS ESTANQUES

Los muestreos bacteriológicos realizados en los estanques presentaron los siguientes rangos de concentración:

* BHVT:	190.000 - 1.800.000	UFC/ml.
Bacterias <i>Vibrio sp</i> :	90 - 3,700	UFC/ml.
Bacterias Coliformes totales:	no detectadas	

B) SISTEMAS DE CULTIVO DE ESTADIOS LARVIARIOS (*P. stylirostris*)

La eclosión de los huevos fecundados se llevó a cabo en recipientes plásticos de 18 l. de capacidad, con agua de mar

* BHVT: Bacterias Heterótrofas Viabiles Totales.

filtrada (1 micra) e irradiada con luz ultravioleta, a una temperatura de 29 +/- 1 °C. se le agregó EDTA * a una concentración final de 0.01 g/l. y fosfato de erytromicina (5 microgramos/l.). El muestreo bacteriológico para los estadios de nauplio, zoea y mysis, se llevó a cabo en recipientes plásticos para su cultivo, con una capacidad de 21 l. y cambios periódicos de agua filtrada (1 micra) e irradiada con luz ultravioleta y una temperatura promedio de 25 °C. Los rangos de concentración de bacterias en estos recipientes fueron:

ETAPA	HETEROT.VIABLES (UFC/ml)	<i>Vibrio</i> (UFC/ml)
Antes de eclosión	11.000 - 26.000	80 - 160
Nauplio	900.000 - 3.300.000	9.000 - 333.000
Zoea I, II y III	5.000 - 3.600.000	100 - 10.000
Mysis	160.000 - 3.600.000	1.600 - 4.100

C) SISTEMA DE CULTIVO DE LARVAS DE ABULON (*H. rufescens*)

Se llevó a cabo en recipientes plásticos de 18 l. de capacidad, con flujo continuo de agua de mar filtrada (1 micra) e irradiada con luz ultravioleta. Con temperatura de 15 a 17 °C y una densidad de 200 larvas por litro.

Los rango de concentración de bacterias *Vibrio* en estos recipientes fueron de 6 a 22 UFC/ml.

* EDTA: Acido-Etilen-Diamino-Tetraacetico.

D) SISTEMAS DE CULTIVO DE ARTEMIA.

(*Artemia salina franciscana* y *A. salina* del Faro Sn. José B.C.)

Las condiciones de cultivo fueron variables utilizandose agua de mar filtrada e irradiada con luz ultravioleta y recipientes de 3.8 l. de capacidad. Las poblaciones bacterianas presentaron concentraciones de 1,050,000 UFC/ml. para heterótrofas viables y 14,700 UFC/ml. para bacterias *Vibrio*.

E) ALIMENTO SUMINISTRADO A LOS ORGANISMOS PROGENITORES DE *P. stilyrostris*.

Se analizó una mezcla de calamar fresco descongelado y cabeza de camarón, encontrandose valores de 1.0×10^4 a 1.0×10^5 UFC/ml. de BHVT, de 1.0×10^3 a 2.7×10^4 UFC/ml. de bacterias *Vibrio* y de 1.0×10^3 a 6.4×10^5 UFC/ml. para coliformes totales.

III.3 CUANTIFICACION. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE CEPAS

a) Cuantificación: Las muestras obtenidas se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

Se hicieron diluciones seriadas, utilizandose un medio estéril, compuesto por tres partes de agua de mar y una de agua destilada.

Se sembró por duplicado 0.1 ml. de cada dilución en cajas de Petri conteniendo medio tipo ZoBell (Oppenheimer y ZoBell, 1952) para determinar bacterias heterótrofas viables totales. En medio TCBS para bacterias tipo *Vibrio* sp. y medio EMB* para coliformes totales.

* EMB =Eosine Metil Blue.

La cuantificación se efectuó con la técnica de conteo en placa (Bianchi y Bianchi, 1972; Oppenheimer et al., 1977; Kaper et al., 1978) efectuándose dos lecturas, a las 48 y 72 horas después de haberse incubado a una temperatura de 25 °C y a 35 °C para coliformes totales.

b) Aislamiento: A partir de las placas utilizadas para la cuantificación de bacterias del tipo *Vibrio* (TCBS) obtenidas de los sistemas muestreados, se seleccionaron al azar 180 cepas, aproximadamente, de las cuales fueron procesadas sólo 93 debido a diversos problemas técnicos y de manipulación.

c) Purificación: Para la purificación de las cepas aisladas se empleó el método de estrias (Thuabault et al., 1963). Se realizaron de 3 a 5 réplicas sobre TCBS con el fin de aumentar la probabilidad de que las cepas con las que se trabajaría fueran del género deseado. Se efectuaron estrictos controles sobre cada una de las réplicas para comprobar su pureza y evitar su contaminación (tinción de Gram, forma de la colonia, arreglo y forma celular).

Las cepas puras fueron mantenidas por duplicado en cajas de Petri y frascos de vidrio de 10 ml. de capacidad, con tapón de rosca, conteniendo aproximadamente 3 ml. de medio ZoBell a temperatura ambiente (se recomienda mantenerlas a una temperatura de 10 y 15 °C cubriendolas con aceite mineral en caso de mantenerlas por mas de un mes, realizando resiembras cada seis meses).

CEPAS DE COLECCION UTILIZADAS.

Con el fin de identificar las cepas silvestres, se utilizaron en este estudio bacterias pertenecientes a cepas de colección oficiales de la ATCC.

NOMBRE DE LA CEPA	No. CATALOGO	No. ASIGNADO **
<i>V. fisherie</i>	7744	94
<i>V. harveyii</i>	14126	95
<i>V. alginolyticus</i>	17749	96
<i>V. parahaemolyticus</i>	17802	97
<i>V. vulnificus</i>	27562	98
<i>V. mimicus</i>	33653	99

** Este número corresponde al asignado en este trabajo para fines prácticos.

III.4 ESTUDIO FENOTIPICO

El estudio fenotípico de las cepas silvestres y de colección (ATCC) fue hecho en base a los métodos establecidos por Stanier et al., 1966, y modificados por Lizárraga-Partida, 1979.

Se aplicó el conjunto de pruebas taxonómicas establecido (anexo 1) que, de acuerdo con O'Brien y Colwell, 1987 comprende los siguientes grupos:

- MORFOLOGICAS: Todas las pruebas morfológicas se realizaron con bacterias cultivadas a temperatura ambiente (20 - 27 °C) en medio tipo ZoBell, con no más de 48 horas de crecimiento. Las observaciones microscópicas fueron realizadas con microscopio de contraste de fases y de campo claro.

- FISIOLÓGICAS: Para las pruebas de temperatura se utilizó medio tipo ZoBell y se incubó a las temperaturas establecidas. Con el fin de observar la respuesta a diferentes salinidades, se utilizó el mismo medio, preparado con agua destilada, añadiendo NaCl según la concentración deseada.

- BIOQUÍMICAS: Se encuentran comprendidas aquellas pruebas que reflejan la acción metabólica de los organismos y la presencia de enzimas intra y extracelulares.

Para las pruebas de Arginina dihidrolasa, Ornitina y Lisina descarboxilasa se aplicó el método de Moller, 1955.

La detección de bioluminiscencia y citocromo oxidasa se realizó a partir de cultivos crecidos en medio tipo ZoBell.

Para la Quitinasa se le añadió al medio tipo ZoBell 1 % de Quitina en suspensión coloidal preparada, según Colwell, 1984 y modificado por Montoya, 1992.

En el caso de la Alginasa y Amilasa se añadió al medio tipo ZoBell, Ácido Algínico y Almidón respectivamente.

- NUTRICIONALES: Con estas pruebas se determina la utilización de diferentes sustratos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Se trabajó con un medio base preparado con agua de mar artificial según Lyman y Fleming, 1940 con una salinidad final de 20 o/oo. Se utilizó agua de mar artificial para asegurar condiciones reproducibles.

- PRUEBAS DIVERSAS: La sensibilidad a diferentes concentraciones del agente vibriostático O/120, se estudió sobre medio tipo ZoBell al cual se le incorporó el compuesto a diferentes concentraciones (Colwell, 1984).

Se utilizó el medio TCBS como el medio selectivo más adecuado para el aislamiento y cuantificación de bacterias del género *Vibrio* (Massad y Oliver, 1987; Bolinches et al., 1988).

El sembrado de los medios sólidos específicos se realizó mediante un replicador semiautomático que permite sembrar con rapidez hasta 20 cepas en cada caja de Petri, basando el principio de su funcionamiento en un inculador automático (Multipoint). Watt et al., 1966. (Fig. 1).

En el caso de las pruebas de producción de exoenzimas, el sembrado se realizó de igual manera sembrando únicamente 10 cepas para evitar que se sobrelaparan los resultados, ya que la lectura de estas pruebas se realiza por medio de la detección de halos que se forman en el medio cuando el substrato está siendo degradado.

Para realizar la inoculación de una serie (20 cepas) se llevó a cabo la siguiente rutina:

- Preparación de medios de cultivo específicos.*
- Recuperación de cepas puras y resiembra, por el método de estria cerrada, 48 horas antes a la inoculación.
- Preparación y esterilización del material a utilizar (tubos con medio mineral, placas de plexiglás con 21 recipientes de 1.0 ml. de capacidad, inculadores y pipetas Pasteur).
- De un tubo de ensayo con 7.0 ml. de medio mineral se tomaron, con pipeta Pasteur, aproximadamente 2.5 ml. y se vertieron en cada una de las cajas de Petri que contenían

* En el ANEXO 2 se presenta la descripción de los medios de cultivo utilizados, así como el procedimiento seguido en su elaboración.

el cultivo masivo, formandose una suspensión de la cepa a estudiar. Una vez hecha la suspensión, con la misma pipeta se recoge y se agrega al tubo de ensaye inicial, obteniendose una concentración aproximada de 10 bact/ml. Esta suspensión se homogeneiza y de ella se toman 1.0 ml. para llenar uno de los recipientes de la placa de plexiglas, este procedimiento se repite para cada una de las 20 cepas de las que se compone una serie a estudiar (fig.1).

- Para determinar la producción de exoenzimas, sólo se inoculan 10 cepas por cada para evitar confusión en las lecturas de los resultados.
- A los medios de cultivo líquidos se les agrega 0.5 ml. de la suspensión original que se encuentra en el tubo de ensaye. Este proceso se repite para cada una de las 20 cepas de las que se compone una serie a estudiar.
- Todas las pruebas se realizan por duplicado.
- Para cada serie se formulan hojas de registro que contienen la información necesaria para relacionar el número de cepa con su respuesta en los diferentes medios de cultivo (anexo 3).

III.5 ANALISIS MATEMATICO

COEFICIENTE DE SIMILITUD

Entre los coeficientes de similitud que se han utilizado en Taxonomía Numérica (T.N.) se seleccionó el de Jaccard por su propiedad de considerar unicamente respuestas positivas ya

que, en el caso de bacterias, las similitudes negativas pueden deberse a fallas genéticas ocasionadas por resiembras repetidas u otro factor físico-químico.

El coeficiente se representan con la siguiente ecuación:

$$S_i = \frac{C}{A+B-C}$$

Donde:

- A = Número de respuestas positivas de la cepa "A"
- B = Número de respuestas positivas de la cepa "B"
- C = Número de respuestas positivas comunes en (A y B)

La T.N. refleja las relaciones fenotípicas entre los organismos, por ejemplo: porcentajes de similitudes y disimilitudes en características o propiedades existentes, como distintivas a partir de relaciones filogenéticas.

Una definición descriptiva de T.N. es la siguiente: Es la colección y evaluación de datos de un gran número de propiedades observables de cada organismo bajo estudio, para determinar cuantitativamente la similitud de un organismo con otros, y con ello permitir el arreglo o separación de cada organismo en un grupo o cluster basado en estas similitudes (O'Brien y Colwell, 1967).

Los principios de T.N. están basados en conceptos enunciados primeramente por el botánico francés Michael Adanson en 1763 y aplicados por primera vez en Taxonomía Bacteriana por Sneath en 1957, de acuerdo a los siguientes principios:

- 1) A cada cepa se le prueban todos los caracteres posibles.
- 2) Todos los caracteres tienen el mismo valor.
- 3) Los taxos se establecen en base a la similitud total.

(Colwell y Wiebe, 1970).

ELABORACION DEL DENDROGRAMA

La elaboración del dendrograma correspondiente se llevó a cabo por medio de una matriz de similitud ($R \times Q$), donde las variables fueron, las 99 cepas bacterianas estudiadas contra los resultados de las 47 pruebas efectuadas a cada una de ellas.

Se aplicó el coeficiente de similitud de Jaccard que implica la comparación pareada y mediante la técnica Jerárquica Aglomerativa se elaboró el dendrograma correspondiente.

Se utilizó un sistema de cómputo de tiempo compartido, modelo PRIME - 750 del Centro de Cómputo Electrónico del CICESE, trabajándose con el paquete estadístico LIPREC, perteneciente al departamento de ecología del mismo centro.

- DETERMINACION DEL NIVEL DEL CORTE DEL DENDROGRAMA

La elección del nivel del corte de un dendrograma que permita la individualización de los fenones es arbitraria (Veron, 1969). El método más comunmente utilizado es el criterio de la especie conocida (nomenspecie) (Delabre *et al.*, 1973), que consiste en escoger un nivel tal que los fenones queden constituidos por cepas pertenecientes a generos o especies conocidas.

IV RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron producto de un estudio "in vitro" efectuado sobre 6 cepas de colección (ATCC) del género *Vibrio* y 93 cepas silvestres, pertenecientes al mismo género (crecidas en TCBS), aisladas de diferentes sistemas de acuicultura y mantenidas en medio ZoBell elaborado con agua de mar.

El anexo 1 presenta el conjunto de pruebas taxonómicas establecido y utilizado para el estudio fenotípico de las cepas. Se establecen las diferencias y semejanzas encontradas entre los conjuntos de cepas, constituidos mediante el coeficiente de Jaccard y representados en el dendrograma correspondiente (fig.2).

IV.1 Resultados Cuantitativos

La cuadro 2.a. presenta las cuantificaciones de bacterias heterótrofas viables totales y tipo *Vibrio* obtenidas durante los muestreos realizados a los diferentes sistemas de cultivo, expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

La figura 3.c. muestra graficamente los cambios en las concentraciones de las poblaciones bacterianas estudiadas durante el desarrollo del cultivo de *P. stylirostris*.

IV.2 Resultados Cualitativos

Comprende el estudio de 99 cepas a las que se aplicó el conjunto de 47 pruebas taxonómicas seleccionadas.

El dendrograma obtenido (fig.2) nos presenta dos grupos (I,II) unidos entre sí a un bajo porcentaje de similitud =24 (%S). Cada grupo se encuentra constituido por sus respectivos subgrupos, conjuntos, subconjuntos y Unidades Taxonómicas Operativas (UTO) aisladas.

GRUPO I:

Este grupo esta constituido por 83 cepas distribuidas en 4 subgrupos; representa el grupo más importante cuantitativa y cualitativamente porque en él se encuentran tres especies de *Vibrio* potencialmente patógenas (*V.vulnificus*, *V.parahaemolyticus* y *V.harveyi*).

SUBGRUPO I.1:

Presenta 3 conjuntos, formados por 11 cepas, que se unen entre sí a un 58.5 %S y al subgrupo I.2 en un 52 %S.

CONJUNTO A: Esta constituido por 5 UTO que se unen a un 84 %S, presentando un núcleo de formación (cepas 34, 35 y 36) con un 94 %S y una UTO aislada (cepa 1) que se une a 70 %S.

Las cepas agrupadas en este conjunto fueron aisladas, principalmente de estanques de maduración de *P.stylirostris* (34, 35, 36 y 37) y una obtenida del alimento suministrado a estos organismos (cepa 46). La UTO aislada corresponde a una cepa aislada de estadio larvario de *P.stylirostris*.

Características Generales:

Este conjunto presenta marcada capacidad de utilización de aminoácidos, ácidos grasos, hidroxiaácidos, azúcar-ácidos, alcoholes y aminas.

Presentó Oxidasa (-), amplio rango de tolerancia a la salinidad (0.60, 80 y 100 o/oo) y temperatura (10.25 y 42 °C).

Resistencia a 150 ug/ml de O/129 ; y no producen enzimas amilasa, alginasa, quitinasa y lipasa, a excepción de la cepa 35 que presentó producción de lipasa.

La UTO aislada si presentó amilasa y quitinasa y no toleró salinidades de 100 o/oo.

Se une al conjunto B a un 64 %S.

CONJUNTO B : Formado por las cepas 56, 57 y 58, a un 85 %S, son cepas aisladas del cultivo de semilla de abulón (*H. rufescens*), presentan buena capacidad de utilización de aminoácidos, (a excepción de glicina) ácidos grasos e hidroxiácidos; Oxidasa (+), sólo toleran salinidades de 0 y 23 o/oo y temperaturas de 10 y de 25 °C, todas son sensibles a 150 ug/ml de O/129. Únicamente la cepa 58 produjo quitinasa y la cepa 56 lipasa.

El conjunto B se une al C a un 58.5 %S.

CONJUNTO C: Integrado por las cepas 60 y 61 a un 84 %S, fueron aisladas del cultivo de semilla de abulón (*H. rufescens*); presentan una buena capacidad de utilización de aminoácidos (70 %), ácidos grasos (75 %) e hidroxiácidos (66 %). La cepa 60 es Oxidasa (+) y la 61 (-), ambas toleran 0, 60, 80 y 100 o/oo de salinidad. No toleran temperaturas de 42 °C y son sensibles a 150 ug/ml de O/129, la cepa 61 también es sensible a 50 ug/ml, ambas presentan producción de quitinasa y lipasa.

SUBGRUPO I.2:

Integrado por 44 cepas formando 3 conjuntos que se unen entre ellos a un 57 %S y al subgrupo I.3 en un 46 %S.

CONJUNTO A: Compuesto por 3 cepas (2,3 y 7) que se unen en un 68 %S, presentando un núcleo de origen (2,3) con un 100 %S entre ellas. Son cepas obtenidas del muestreo realizado a estadios larvarios de *P.stylirostris* (nauplio).

Presentan buena capacidad de utilización de aminoácidos, una capacidad media para utilizar ácidos grasos (52%), Oxidasa (+) requieren de NaCl para su crecimiento (no crecen a 0 o/oo), las cepas 2 y 7 unicamente crecen a concentraciones de 23 y 60 o/oo mientras que la cepa 3 tolera salinidades hasta de 100 o/oo.

Las cepas 2 y 3 crecen a temperatura de 10, 25 y 42°C y la cepa 7 unicamente crece a 25 °C. La 2 no presentó sensibilidad al O/129, mientras que la cepa 7 fue sensible a 50 y 150 ug/ml y la 3 solamente a 150 ug/ml.

Las tres cepas produjeron lipasa, la 3 y 7 amilasa y sólo la 3 produjo quitinasa. Se une al conjunto B y C a un 57 %S.

CONJUNTO B: Agrupa a 13 cepas, a un 68 %S, se encuentra incluida una cepa de colección (cepa 95) que caracteriza al grupo como *V.harveyi*; presenta bioluminiscencia, producción de enzimas: lipasa, quitinasa y amilasa, son sensibles a 50 ug/ml de O/129, requieren de NaCl para su crecimiento. Se divide en tres subconjuntos:

- Subconjunto b₁): Compuesto por tres cepas (6,95 y 33) con un 73 %S entre ellas. la cepa 6 presenta un 82 %S con la cepa 95 (*V.harveyi* No.14126 de la ATCC) y fueron aislada de estadio larvario de *P.stylirostris*.

Presentan buena capacidad de utilización de aminoácidos, excepto leucina; no utilizan ácidos grasos en forma considerable y sí presentan buena utilización de hidroxiaácidos, nula capacidad para utilizar azúcares y alcoholes. Oxidasa (+); requieren de NaCl para su crecimiento, la cepa 6 y 95 sólo toleran salinidades máximas de 60 y 80 o/oo, mientras que la 33 solamente de 60 o/oo; presentan reducido rango de tolerancia a la temperatura.

La cepa 6 crece a 10, 25 y 42 °C. la 33 crece a 10 y 25 °C y la 95 sólo a 25 °C. las tres cepas fueron sensibles a 50 y 150 ug/ml de O/129, produjeron amilasa y lipasa, la 6 y la 33 fueron quitinasa (+) y la 6 y 95 presentaron bioluminiscencia.

- Subconjunto b₂): Compuesto por 5 cepas (13,14,16,23 y 21) presentan un 79 %S entre ellas, y queda unido al subconjunto "b₁" en un 68 %S y al "b₃" en un 74 %S. Fueron aisladas de estadios larvarios de *P.stylirostris* (mysis).

Presentan una capacidad media (58 %) de utilización de aminoácidos, ácidos grasos (50 %) e hidroxiaácidos (75 %), nula capacidad para utilizar azúcares, alcoholes y aminas. Oxidasa (+); requerimientos de NaCl, pero reducida tolerancia, la cepa 13 fue la única que creció a 0 o/oo y solamente las cepas 13 y 14 crecieron a 80 o/oo. Todas toleraron 10, 25 y 42 °C y

fueron sensibles a 150 ug/ml de O/129; todas produjeron amilasa, quitinasa y lipasa y a excepción de la cepa 21 las restantes fueron bioluminiscentes.

- Subconjunto b₁): Formado por 5 cepas (17, 19, 26, 20 y 22) unidas a 81 %S. forman un núcleo de origen (cepas 19 y 26) con un 96 %S.

Todas las cepas provienen del muestreo realizado a estadio larvario de *P.stylirostris* (mysis); presenta una UTO aislada (cepa 38 aislada de progenitores) que se une en un 63 %S.

Buena capacidad de utilización de aminoácidos (80%), hidroxiacidos (100 %); capacidad media de utilización de ácidos grasos y dicarboxilicos (50 %); nula capacidad para utilizar azúcares, alcoholes y aminas; Oxidasa (+); reducido rango de tolerancia a la salinidad, sólo crecieron a 23 y 60 o/oo; amplio rango de tolerancia a la temperatura, 10, 25 y 42 °C; sensibles a 150 ug/ml de O/129. Producción de amilasa, quitinasa y lipasa. Todas presentaron bioluminiscencia.

CONJUNTO C:

Agrupar 27 cepas con un 67 %S entre ellas; constituido por 3 subconjuntos y 2 UTO aisladas que corresponden a las cepas de referencia cepa 98 (*V.vulnificus* No. 27562 ATCC) y la 97 (*V.parahaemolyticus* No. 17802 ATCC). La presencia de esta última, caracteriza al grupo como *V.parahaemolyticus* en un 72 %S.

Se une en un 67 %S con *V.vulnificus* y a *V.harveyi* en 62 %S.

- Subconjunto c_1): Agrupa 9 cepas con un 81 %S entre ellas. Es un grupo heterogeneo en cuanto a su origen, compuesto por:

- 3 cepas aisladas de cultivo de artemia (68, 69 y 63)
- 2 " " " " larvario de *P. stylirostris* (9, 30)
- 1 " " " " de progenitores " " (39)
- 1 " " " alimento suministrado a " " (43)
- 2 " " provenientes del agua de un sistema cerrado de acuicultura del CICESE (91, 92).

Presentan marcada utilización de aminoácidos, ácidos grasos e hidroxiácidos (98 %); muy baja utilización de azúcares y alcoholes; Oxidasa (+); la cepa 39 fue la única que no presentó requerimientos de salinidad; el resto creció a 60, 80 y 100 o/oo; a excepción de la cepa 9, crecieron a 10, 25 y 42 °C todas fueron sensibles 150 ug/ml de O/129 y las cepas 43, 63, 69 y 92 también fueron sensibles a 50 ug/ml de O/129 y sólo la 63 fue sensible a 10 ug/ml. Todas presentaron producción de amilasa y lipasa y solamente la cepa 9 produjo quitinasa.

Se une al subconjunto " c_1 " en un 75 %S.

- Subconjunto c_2): Esta constituido por 13 cepas (62, 64, 65, 66, 71, 70, 74, 67, 75, 73, 72, 59 y 90) con un 79 %S entre ellas, de las cuales 11 provienen del cultivo de artemia, una de abulón (59) y una del sistema cerrado de acuicultura del CICESE. Presentan alta capacidad (90%) para utilizar los aminoácidos, ácidos grasos, hidroxiácidos y aminas, baja

capacidad para utilizar azúcares y alcoholes. Oxidasa (+). únicamente las cepas 72 y 73 no mostraron requerimiento de NaCl para su crecimiento y el resto, toleró salinidades hasta de 100 o/oo; presentaron amplio rango de tolerancia a la temperatura creciendo a 10, 25 y 42 °C.

Fueron sensibles a 150 ug/ml de O/129 y las cepas 70, 71, 72, 73, 74, 75, 64, 59, 90 y 62 también fueron sensibles a 50 ug/ml. Todas produjeron lipasa, amilasa y a excepción de las cepas 64, 65 y 90 todas produjeron quitinasa.

Los subconjuntos "c₁" y "c₂" se unen en un 72 %S con la cepa 97 de colección que corresponde a *V.parahaemolyticus* y posteriormente se unen al subconjunto "c₃" en un 71 %S.

- Subconjunto c₃): Constituido por 3 cepas (11, 12 y 27) con un 77 %S entre ellas y con *V.vulnificus* en un 67 %S, son cepas provenientes de estadios larvarios (mysis) de *P.stylirostris*. Marcada utilización de aminoácidos (100 %) y alta capacidad de utilización de ácidos grasos (85 %): hidroxiacidos (75 %) y putresina; baja capacidad para utilizar azúcares y alcoholes; Oxidasa (+). Requieren de NaCl para su crecimiento y no toleran concentraciones de 100 o/oo.

Presentan amplio rango de tolerancia a la temperatura (10, 25 y 42 °C), sensibles a 150 ug/ml de O/129; produjeron lipasa y solamente la cepa 27 produjo quitinasa.

SUBGRUPO I.3:

Formado por 16 cepas con 54 %S entre ellas y una UTO aislada (cepa 82), que se une a 40 %S. Presenta 3 conjuntos :

CONJUNTO A: Agrupa a un total de 4 cepas con un 66 %S entre ellas (cepas 10, 25, 15 y 28). Fueron aisladas de estadio larvario (mysis) de *P. stylirestris*. Presenta buena capacidad de utilización de aminoácidos (70 %) y baja capacidad para utilizar ácidos grasos (37.5 %), ácidos carboxílicos, hidroxí- cidos, azúcares, alcoholes y aminas; Oxidasa (+); resultados negativos para las pruebas de ornitina y lisina decarboxilasa y arginina dihidrolasa. Presentan requerimiento de NaCl y no toleran concentraciones de 100 o/oo ni temperaturas de 42 °C, sensibles a 150 ug/ml de O/129; presentaron producción de amilasa, quitinasa y lipasa. Bioluminiscencia positiva. Se une al conjunto "B" en un 58 %S.

CONJUNTO B: Formado por 7 cepas (76, 86, 87, 88, 78, 77 y 81), provenientes del cultivo de artemia y unidas entre sí en un 77 %S, presenta un núcleo de origen (cepas 87, 88) a un 100 %S y una UTO aislada (cepa 89) que se une al conjunto "A" en un 54 %S.

Capacidad media de utilización de aminoácidos (66 %) y casi nula utilización de otros compuestos, negativas para las pruebas ornitina y lisina decarboxilasa y arginina dihidrolasa; Oxidasa (+), requieren de NaCl y no toleran concentraciones de 100 o/oo ni temperaturas de 42 °C. Marcada sensibilidad al O/129 en 10, 50 y 150 ug/ml. Produjeron amilasa y lipasa y únicamente la cepa 77 produjo quitinasa.

CONJUNTO C: Constituido por 4 cepas (18, 24, 29 y 50) con un 54 %S entre ellas, aisladas de estadio larvario de camarón y

del alimento suministrado a cultivos de organismos reproductores de *P. stylirostris*. Se une a los conjuntos "A" y "B" en un 45 %S. Existe una UTO aislada (cepa 82) que se une en un 40 %S.

Presentan una buena capacidad de utilización de aminoácidos (80 %), y ácidos grasos (75 %) y baja o nula capacidad de utilización de los otros compuestos probados; Oxidasa (+), requerimiento de NaCl y tolerancia a 100 o/oo. Crecimiento a 10, 25 y 42 °C; sensibles a 150 ug/ml de O/129 y las cepas 24 y 29 también fueron sensibles a 50 ug/ml. Todas presentaron producción de amilasa y lipasa y únicamente la cepa 18 presentó producción de quitinasa.

SUBGRUPO I.4:

Presenta gran disimilitud (30 %S) entre las 11 cepas que lo conforman y se une al subgrupo I.3 en un 36 %S. Esta dividido en 3 conjuntos:

CONJUNTO A: cepas 79, 80, 84, 83 y 85 unidas en un 47 %S y aisladas del cultivo de artemia. Presentan baja capacidad catabólica, Oxidasa (+), requerimiento de NaCl pero reducido rango de tolerancia, únicamente las cepas 79, 80 y 83 crecieron a 60 o/oo. No toleran temperaturas de 42 °C, todas sensibles a 150 ug/ml de O/129 y las cepas 83 y 84 también fueron sensibles a 50 ug/ml; la cepa 79 produjo amilasa y quitinasa, la 83 alginasa y lipasa y las 80, 84 y 85 únicamente lipasa.

CONJUNTO B : Lo forman 2 cepas (54 y 55), unidas a 52 %S entre ellas, ambas aisladas del cultivo de semilla de abulón; se unen al conjunto "A" en un 32 %S.

Presentan baja o nula capacidad catabólica: Oxidasa (-); requerimiento de NaCl y sólo crecieron a 23 y 60 o/oo; reducido rango de temperatura (10 y 25 °C); sensibilidad a 10, 50 y 150 ug/ml de O/129, la cepa 55 presentó amilasa, lipasa y quitinasa, mientras que la 54 no produjo dichas enzimas.

CONJUNTO C : Constituido por 4 cepas (4, 5, 44 y 99) unidas a un 37 %S entre sí y con los conjuntos "A" y "B" un 30 %S. La cepa 99 corresponde a *V.mimicus* (no. 33653 de la ATCC). Presentan gran disimilitud entre ellas y algunas de sus características más representativas son las siguientes: presentan baja o nula capacidad catabólica (excepto la cepa 4).

Oxidasa (+) y producción de lipasa. Todas presentan amplio rango de tolerancia a la temperatura (crecimiento a 10, 25 y 42 °C). Sensibilidad a 150 ug/ml de O/129, las cepas 4, 44 y 99 fueron sensibles a 50 ug/ml y la 4 y 99 a 10 ug/ml.

Las cepas 4 y 99 produjeron además amilasa y quitinasa.

Únicamente la cepa 44 presentó amplio rango de tolerancia a la salinidad y junto con la 5 y 99 crecieron a 0 o/oo de NaCl. La cepa 5 fue Oxidasa (-) y no produjo enzimas extracelulares.

GRUPO II.

El grupo II está constituido por 16 cepas divididas en 2 subgrupos. En su mayoría son cepas aisladas del muestreo efectuado al alimento suministrado a organismos de *P.styliros-tris* en estanques de maduración.

También se encuentran en este grupo dos cepas de referencia de la ATCC, que corresponden a *V. fisheri* y *V. alginolyticus*.

SUBGRUPO II.1: Formado por 13 cepas agrupadas en 3 conjuntos y unidos en un 49 %S.

CONJUNTO A: Presenta 3 subconjuntos:

- Subconjunto a_1 : Formado por 4 cepas (8, 40, 52 y 53) con un 75 %S entre ellas y un núcleo de formación (40 y 52) con un 91 %S. La 52 y 53 provienen del alimento, la 40 del cultivo de progenitores y la 8 de estadio larvario de *P. stylirostris*.

Baja o nula capacidad catabólica; con excepción de la cepa 53 las demás son Oxidasa (+); presentan amplio rango de tolerancia a la salinidad (crecimiento a 0, 60, 80 y 100 o/oo) y a la temperatura (crecimiento a 10, 25 y 42 °C), sensibles a 50 y 150 ug/ml de O/129.

Únicamente las cepas 8, 40 y 52 produjeron lipasa. La 52 y 53 presentaron colonias con pigmentación color naranja en medio tipo ZoBell.

- Subconjunto a_2): Formado por 3 cepas (47, 51 y 48) con un 78 %S, provenientes de alimento, presentan baja o nula capacidad catabólica, Oxidasa (+), amplio rango de tolerancia a la salinidad (0, 60, 80 y 100 o/oo) y a la temperatura. Sensibles a 150 ug/ml de O/129 y no presentaron producción de amilasa, alginasa, quitinasa y lipasa.

- Subconjunto a_3): Formado Únicamente por 3 cepas (45, 94 y 96), unidas entre sí en un 54 %S y con los subconjuntos " a_1 " y " a_2 " en un 49 %S. Las cepas 94 y 96 corresponden a las cepas de referencia *V. fisheri* (No. 7744 de la ATCC) y *V. alginolyticus* (No. 17749 de la ATCC), con un 88 %S entre ellas.

Presentan baja o nula capacidad catabólica, la cepa 45 fue oxidasa (-) y no presentó requerimiento de NaCl para su crecimiento, tienen un amplio rango de tolerancia a la salinidad (23, 60, 80 y 100 o/oo). Mientras que las cepas de referencia tienen marcada tolerancia a la temperatura (10, 25 y 42 °C), la cepa 45 únicamente creció a 25 °C. Todas fueron sensibles a 150 ug/ml de O/129 y las cepas 45 y 94 también a 50 ug/ml. Las 3 cepas produjeron amilasa y lipasa.

SUBGRUPO II.2: Constituidas por 3 cepas (41, 42 y 49) aisladas de alimento, unidas entre sí en un 78 %S y al subgrupo II.1 en un 38 %S. Baja o nula capacidad catabólica, Oxidasa (-), limitado rango de tolerancia a la salinidad (crecimiento a 0, 23 y 60 o/oo), y a la temperatura (crecimiento a 10 y 25 °C), sensibles a 150 ug/ml de O/129 y no produjeron las enzimas amilasa, alginasa, quitinasa y lipasa.

DISCUSION :

La cuadro No.2.a y las figuras 3.a y 3.b presentan los valores de bacterias Heterótrofas Viabiles Totales (HVT), *Vibrio* y de coliformes totales obtenidos de los análisis al agua utilizada en los sistemas de cultivo estudiados.

Los muestreos realizados en el sistema de abastecimiento de agua de mar en el CICESE indicaron un alto grado de contaminación orgánica en el sistema, y la necesidad de tomar algunas medidas para disminuir estos valores. Se realizó limpieza de tubería, eliminación del exceso de nutrientes y reposo del sistema.

Como consecuencia de lo anterior, en los muestreos posteriores se obtuvieron valores considerablemente menores de bacterias coliformes. En el último muestreo se observó también la disminución de *Vibrios* en el sistema.

Los valores correspondientes al sistema de abastecimiento de agua en el IIO (tabla 2.a), demuestran que el agua de aprovisionamiento al sistema de acuicultura, presenta una excelente calidad desde el punto de vista bacteriológico, ya que los valores detectados para HVT estan comprendidos dentro del rango de 10^2 - 10^4 , lo cual pertenece al registro para aguas costeras no contaminadas (Lizárraga-Partida 1987).

De igual manera, se constata que los sistemas de filtración y radiación U.V. instalados, reducen la población bacteriana pero no logran eliminarla totalmente.

En los muestreos efectuados en los estanques destinados al proyecto de investigación sobre maduración gonádica (P_1 , P_2 y P_3) la concentración de HVT fluctuó entre valores de 10^0 y 10^4 UFC/ml) y de 10^1 a 10^6 para bacterias *Vibrio* en los diferentes estanques muestreados (tabla 2.b y fig. 3.c).

Tomando en cuenta que el género *Vibrio* es un componente normal de la flora intestinal de los camarones (Colwell, 1984) y que en ciertas condiciones puede ser un agente patógeno, en el sistema estudiado, podría haberse visto afectada la transferencia del espermatóforo, la fertilización de los huevos y presentarse además lesiones cuticulares (Brown, 1979). Sin embargo, dichas concentraciones no interfirieron en el proceso de inducción a la maduración gonádica (Betancourt 1989).

Se evidenció que el alimento suministrado a los organismos en maduración es una fuente importante de entrada de *Vibrio* sp. y de otras bacterias al sistema, puesto que en los análisis bacteriológicos realizados al alimento se detectaron valores de 1.0×10^3 a 2.0×10^6 UFC/ml de HVT; de 1.0×10^3 a 2.0×10^5 UFC/ml de *Vibrio* (valores similares a los reportados por Chan *et al.* 1989) y 1.0×10^4 a 6.4×10^6 UFC/ml para coliformes totales.

Las características fenotípicas de las bacterias aisladas de estos dos sistemas, alimento y progenitores, presentan mayor similitud entre ellas que con el resto de las cepas estudiadas, de tal manera que se encuentran conformando el grupo II en el fenograma correspondiente.

En los estanques de estadios larvarios de *P. stylirostris*, los valores de las poblaciones *Vibrio* fluctuaron desde 80 UFC/ml, en los estanques de desove, hasta 1.2×10^5 UFC/ml en los estadios de nauplio, descendiendo posteriormente a 1.6×10^3 UFC/ml en zoea y mysis. El mismo comportamiento se presentó en las poblaciones de HVT con valores de 1.1×10^4 , 3.3×10^4 y 1.6×10^3 UFC/ml respectivamente.

Las fluctuaciones en los valores obtenidos, posiblemente se deben a los hábitos alimenticios que presentan estos tres estadios; el primero, nauplio, utiliza sus reservas de vitelo y conforme cambian a zoea y posteriormente a mysis, las bacterias pasan a formar parte de su alimentación. Estos resultados coinciden con los expuestos por Yasuda y Kitao, 1980.

Es interesante notar que los valores obtenidos de los muestreos bacterianos al cultivo larvario a 20 °C son considerablemente menores que a 25 °C y que el comportamiento se repite, aunque este descenso en la temperatura trae consigo un lento desarrollo larvario.

La detección de bacterias bioluminiscentes con capacidad quitinolítica y lipolítica, en los muestreos al estadio mysis de *P. stylirostris*, así como su caracterización e identificación como *V. harveyi*, fue otro resultado importante, debido a que en los últimos años ciertos vibrios bioluminiscentes con características semejantes a *V. parahaemolyticus*, se han relacionado con altas tasas de mortalidad en cultivos de camarón en Ecuador y Taiwan (Lightner, 1991). *

* Comunicación personal. Depto. Med. Vet. Univ. Arizona USA.

En este trabajo se logró una clara separación entre *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Fig.2).

Cabe señalar que durante esta investigación se presentó una alta mortalidad en dicho estadio, aunque la patogenicidad de las bacterias aisladas no se estudió.

De los muestreos a cultivos de *Artemia*, se aislaron 11 de las 22 cepas que conforman los subconjuntos c, y g caracterizados como *V. parahaemolyticus*. Esto nos indica el alto riesgo que representa un mal manejo de este crustáceo como alimento para otros organismos acuáticos, ya que esta especie bacteriana es ampliamente reconocida como agente patógeno de organismos acuáticos (Lightner, 1988) y considerada un peligro potencial de salud pública (Chan et al., 1989).

Al igual que en otros crustáceos, *Vibrio* sp. se encuentra en forma natural en *Artemia* por lo que, a pesar de utilizar agua de mar filtrada e irradiada con luz ultravioleta para el cultivo de estos organismos, los valores obtenidos de los muestreos realizados fueron del orden de 1.4×10^4 para bacterias *Vibrio* y de 1.0×10^4 para HVT.

Todo lo anterior lleva a considerar a *Artemia* sp. como un vector potencialmente importante de bacterias patógenas, principalmente de *V. parahaemolyticus*.

El bajo número de bacterias del género *Vibrio* detectadas en los cultivos de larvas de Abulón (de 6 a 22 UFC/ml.), se debe principalmente a las medidas extremas que se toman ya que,

estos organismos son considerablemente afectados por concentraciones mínimas de dichas bacterias.

Algunas de las medidas más importantes fueron:

- El agua utilizada fue filtrada (1 u) e irradiada con luz ultravioleta y se le añadió antibiótico (Penicilina y Streptomina).
- Se cultivaron en un sistema con flujo continuo (8 cambios al día) y la temperatura fue entre 15 y 17 °C.
- Son alimentadas a partir de cultivos monoespecíficos de microalgas.

El 17 % de las cepas estudiadas presentaron oxidasa negativa, la mayoría de estas cepas posiblemente tengan el mismo origen y su entrada al sistema de cultivo de *P. stylirostris*, fue el alimento suministrado a estos organismos.

Integran principalmente los subgrupos I.1 y II.2, ubicados en los extremos del dendrograma, unidos a un bajo porcentaje de similitud con los subgrupos caracterizados por la presencia de cepas de colección del género *Vibrio*.

El hecho de que el 83 % de las cepas estudiadas fueran oxidasa positiva y la mayoría sacarosa negativa (colonias verdes en TCBS), refleja la abundancia relativa de especies potencialmente patógenas, (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. fischeri*) en los sistemas muestreados (Mohney, 1991).*

* Comunicación personal. Depto. de Med. Vet. Univ. Arizona, USA.

El dendronograma constituido a partir de los resultados de las pruebas de caracterización establecidas y a las cuales fueron sometidas las 93 cepas silvestres y 6 de colección, nos muestran diferentes agrupaciones de acuerdo a las similitudes fenotípicas existentes entre ellas (fig.2).

En los resultados se exponen las características fenotípicas más importantes de cada una de las agrupaciones que se obtuvieron.

Se observa una tendencia de agrupamiento de acuerdo al origen de las cepas.

Se presentan dos cepas (11 y 12) con gran similitud con *V. vulnificus*, el cual junto con *V. parahaemolyticus* son importantes desde el punto de vista de salud pública (Colwell, 1984; Chan et al., 1989).

El bajo porcentaje de similitud que se presenta en el fenograma, demuestra el poder discriminativo del conjunto de pruebas establecido y la posibilidad de que se trate de especies no reportadas a la fecha, sobre todo si consideramos que todos los trabajos taxonómicos de *Vibrio* han sido realizados en el extranjero.

Un ejemplo de lo anterior, es el estudio realizado por Lee et al., 1978 sobre vibrios oxidasa negativa crecidos en TCBS e identificados como *V. metschnikovii*.

CONCLUSIONES:

Se demostró la necesidad de realizar, muestreos bacteriológicos, en forma rutinaria, que permitan evaluar la eficiencia de los sistemas de eliminación de bacterias en los centros que se dedican a la acuicultura.

La utilización de los tres medios de cultivo destinados a valorar las concentraciones de bacterias heterótrofas viables totales, coliformes y vibrios, (ZoBELL, EMB y TCBS) demostró ser una herramienta eficaz y fácilmente aplicable en granjas de acuicultura.

La presencia de bacterias halofílicas del género *Vibrio* en los cultivos de Camarón, Artemia y Abulón, así como en los sistemas de abastecimiento de agua estudiados, fue constante.

El alimento suministrado a los organismos, fue una fuente constante de introducción de bacterias potencialmente patógenas.

Artemia sp. demostró ser un vector importante de *V. parahaemolyticus*.

Se identificaron cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi*, mediante la aplicación de el conjunto de pruebas taxonómicas establecido, y del coeficiente de Jaccard. Lograndose de esta manera los objetivos planteados.

Tomando en cuenta el acelerado desarrollo de la camaronicultura en México, es necesario e indispensable considerar las experiencias de otros países, en relación a la problemática común a ellos.

La temperatura y otros factores climáticos dominantes en nuestro país, incrementan la probabilidad de que existan especies no descritas a la fecha, por lo que deben ser contemplados más trabajos taxonómicos sobre este género.

Con lo anterior, México crearía su propia tecnología de acuerdo a las necesidades y posibilidades, vinculando hasta donde sea posible el sector productivo, educativo y de investigación. Disponiendo de servicios de asesoría para identificación y diagnóstico en sitios estratégicamente localizados en el país.

APENDICE

CUADRO 1. REPORTE DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO Vibrio A ORGANISMOS ACUATICOS.

ORGANISMOS AFECTADOS	ETAPA	ENFERMEDAD O LESION	AGENTE CAUSAL	REFERENCIAS
PI ESCALOS MARINOS	III	SINUSITIS BACTERIANA	<u>V. cholerae</u>	GULLAND <u>et al.</u> , 1957.
" "	"	"	<u>V. parahaemolyticus</u>	GULLAND <u>et al.</u> , 1957.
" "	III	"	" "	ANDERSON, 1962.
" "	III	"	" "	BATES & HADGSON, 1967.
" "	III	"	<u>V. cholerae</u>	GULLAND <u>et al.</u> , 1957; LEIGHTON, 1966.
" "	III	"	<u>V. parahaemolyticus</u>	GULLAND <u>et al.</u> , 1957.
SALICICOLAS	I	INFLUENZA BACTERIANA	<u>V. cholerae</u>	GULLAND, 1957; ANDERSON & ANDERSON, 1957.
" "	"	SINUSITIS BACTERIANA	<u>V. cholerae</u>	ANDERSON, 1970; ANDERSON <u>et al.</u> , 1970.
" "	"	SINUSITIS BACTERIANA	" "	ANDERSON <u>et al.</u> , 1970; ANDERSON, 1968.
" "	III	SINUSITIS	" "	FRENCH & GULLAND, 1957.
LANGOSTINOS	I	"	" "	ANDERSON, 1971; ANDERSON & ANDERSON, 1968.
" "	I	"	" "	ANDERSON, 1971; ANDERSON & ANDERSON, 1968.
" "	I	"	<u>V. cholerae</u>	ANDERSON <u>et al.</u> , 1971; ANDERSON & ANDERSON, 1968.
PI ESCALOS BENTONICOLAS	III	SINUSITIS	<u>V. parahaemolyticus</u>	ANDERSON, 1975; ANDERSON <u>et al.</u> , 1977.
" "	"	"	<u>V. cholerae</u>	ANDERSON, 1975, 1977.
CRUSTACEOS				
CRUSTACEOS	III	SINUSITIS	<u>V. parahaemolyticus</u>	TOWNSHIP <u>et al.</u> , 1971; ANDERSON & ANDERSON, 1975.
" "	III	"	<u>V. cholerae</u>	ANDERSON <u>et al.</u> , 1975; ANDERSON, 1975.
" "	III	"	" "	ANDERSON & ANDERSON, 1975; ANDERSON, 1975.
" "	III	"	" "	ANDERSON <u>et al.</u> , 1975.

CUADRO I. REPORTES DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO Vibrio A ORGANISMOS ACUATICOS.

ORGANISMOS AFECTADOS	ETAPA DE ENFERMEDAD O LESION	AGENTE CAUSAL	REFERENCIAS
(MOLUSCOS)			
<u>V. anguillarum</u>	J-A	<u>V. anguillarum</u>	ROSS, 1937; ROSEN, 1970; WILCOX, 1978; FISHER et al., 1976; FISHER et al., 1978; ROSEN et al., 1981;
<u>V. parahaemolyticus</u>	J-A	<u>V. parahaemolyticus</u>	AGUILO et al., 1981.
		<u>V. anguillarum</u>	
		<u>V. cholerae</u> sp.	
(PISCICULTIVO)			
<u>C. nigricans</u>	J-A	<u>Vibrio</u> sp.	ROSEN, 1970; 1977; OLS-SHAFET Y COOK, 1972;
		<u>V. parahaemolyticus</u>	OLS-SHAFET, 1978; COOK Y LEFROY, 1973;
			JURANSKY, 1976; KOSIETZ et al., 1979.
<u>C. marginata</u>	J-A	<u>V. anguillarum</u>	BRASS et al., 1978.
(LINGUSTICIVO)			
<u>Ch. striatissima</u> sp.	J-A	<u>Vibrio</u> sp.	BRASS, 1972; DELVES-LEFFROY, 1976.
<u>V. anguillarum</u>	J-A	<u>Vibrio</u> sp.	ANDRASON Y COOK, 1968.

J = Juvenil, A = Adulto.

CUADRO 2.a. SINTESIS DE MUESTREOS BACTERIOLÓGICOS REALIZADOS A LOS SISTEMAS DE ABASTECIMIENTO DE AGUA DE MAR. CICESE - 110.

FECHA	SITIO	ZoBELL	TCBS	EMB	COMENTARIOS
NOV.	C ₁	1.0X10 ⁴ *	5	1.7X10 ⁴	El muestreo realizado antes de introducir el agua a este sistema, no detectó crecimiento en TCBS ni en EMB. (VER I.).
	C ₂	3.1X10 ³	10	7.9X10 ³	
	C ₃	3.1X10 ³	20	1.9X10 ⁴	
	C ₄	7.6X10 ³	N.D.	80	
DIC.	C ₁	4.5X10 ³	2.1X10 ²	5.0X10 ⁴	Los resultados de este muestreo confirmaron la gran cantidad de bacterias coliformes presentes en este sistema. Por lo que se decidió realizar limpieza.
	C ₂	1.6X10 ³	5.2X10 ²	2.0X10 ³	
	C ₃	3.1X10 ³	10	2.0X10 ³	
	C ₄	3.7X10 ³	N.D.	N.D.	
FEB.	C ₁	1.1X10 ⁴	2.7X10 ³	1.5X10 ³	Este muestreo se llevó a cabo después de haberse efectuado la limpieza de la tubería del sistema, de filtros y eliminado el exceso de nutrientes y partículas en suspensión.
	C ₂	7.6X10 ³	1.3X10 ³	3.1X10 ³	
	C ₃	4.2X10 ³	1.1X10 ³	1.4X10 ³	
	C ₄	85	5	N.D.	
FEB.	C ₁	1.3X10 ³	65	20	Estos resultados comprueban la disminución de coliformes y vibrios en el sistema, después de las medidas tomadas.
	C ₂	1.2X10 ³	50	10	
	C ₃	1.6X10 ³	95	60	
	C ₄	6.0X10 ³	N.D.	5	

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

NOV.	I ₁	5.8X10 ⁴ *	2.0X10 ⁴ *	25	El agua es proveniente de Punta Morro; presenta gran cantidad de partículas en suspensión. Del sitio I, se abasteció ese mismo día, al sistema cerrado del CICESE.
	I ₂	4.8X10 ³	N.D.	N.D.	
	I ₃	1.1X10 ³	N.D.	N.D.	
	I ₄	4.1X10 ³	N.D.	N.D.	
NOV.	I ₁	4.5X10 ³	N.D.	35	Debido a la estabilidad de este sistema no se continuaron los muestreos en estos sitios.
	I ₂	4.5X10 ⁴	N.D.	N.D.	
	I ₃	2.8X10 ³	N.D.	5	
	I ₄	7.5X10 ³	N.D.	10	

* Los valores estan dados en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).

CUADRO 2-B SINTESIS DE LOS MUESTREOS BACTERIOLOGICOS EN EL SISTEMA ABIERTO DE CULTIVO DE CAMARON (*P. stylirostris*, progenitores (ITO).

FECHA	SITIO	ZOBELL	TCBS	COMENTARIOS
NOV.	P ₁	1.9X10 ⁸	3.5X10 ⁷	Muestreo realizado después de haber efectuado limpieza de estanques y antes de proporcionar el alimento (calamar congelado) a los organismos. La temperatura promedio fue de 28 °C.
	P ₂	1.8X10 ⁸	5.4X10 ⁷	
	P ₃	2.5X10 ⁸	7.8X10 ⁷	
NOV.	P ₁	2.0X10 ⁸	1.4X10 ⁷	Muestreo realizado después de la limpieza de los estanques y alimentación a los organismos. Temperatura promedio 28 °C.
	P ₂	3.5X10 ⁸	4.0X10 ⁷	
	P ₃	2.8X10 ⁸	2.0X10 ⁷	
DIC.	P ₁	1.5X10 ⁸	7.3X10 ⁷	Este muestreo se realizó antes de la limpieza y de alimentar a los organismos; se muestreo el alimento (cabeza de camarón y calamar congelado) los resultados obtenidos fueron los siguientes: HVT=10 ⁸ ; Coliformes=10 ⁸ ; Vibrios = 10 ⁸ .
	P ₂	1.5X10 ⁸	3.2X10 ⁷	
	P ₃	1.8X10 ⁸	2.6X10 ⁷	
DIC.	P ₁	4.6X10 ⁸	5.7X10 ⁷	Muestreo antes de la limpieza y de alimentar a los organismos.
	P ₂	7.9X10 ⁸	1.3X10 ⁷	
	P ₃	6.5X10 ⁸	1.4X10 ⁷	
ENE.	P ₁	-	2.4X10 ⁸	En estos dos muestreos únicamente se sembró sobre medio TCBS, debido a escasez de material, y se consideró más importante para los fines perseguidos tener el registro de la población bacteriana que crece en dicho medio (<i>Vibrio sp.</i>)
	P ₂	-	1.4X10 ⁸	
	P ₃	-	90	
ENE.	P ₁	-	80	En este caso también se tomó muestra del alimento y los valores obtenidos fueron: Vibrios=2.7x10 ⁸ ; HVT=2.0x10 ⁸ ; Coliformes= 5.4x10 ⁸ (cabeza de camarón y calamar congelado).
	P ₂	-	1.8X10 ⁸	
	P ₃	-	2.1X10 ⁸	
FEB.	P ₁	2.9X10 ⁸	3.2X10 ⁷	En este caso también se tomó muestra del alimento y los valores obtenidos fueron: Vibrios=2.7x10 ⁸ ; HVT=2.0x10 ⁸ ; Coliformes= 5.4x10 ⁸ (cabeza de camarón y calamar congelado).
	P ₂	3.9X10 ⁸	2.6X10 ⁷	
	P ₃	1.5X10 ⁸	2.7X10 ⁷	
MARZ.	P ₁	7.2X10 ⁸	5.0X10 ⁷	
	P ₂	2.1X10 ⁸	5.5X10 ⁷	
	P ₃	5.0X10 ⁸	3.7X10 ⁷	

* Los valores están dados en Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml.
HVT = Bacterias Heterótrofas Viables Totales.

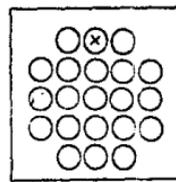
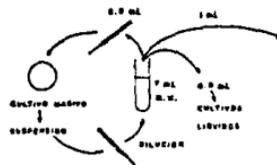
CUADRO 2.c SINTESIS DE LOS MUESTREOS EN EL SISTLMA (SEMICERRADO) DE CULTIVO DE LARVAS DE CAMARON. TEMPERATURA 25 °C (110).

FECHA	SITIO	ZoBELL	TCBS	COMENTARIOS	
4-03-89	E ₁	1.1x10 ⁴	1.5x10 ⁴	Estos muestreos se realizaron en el estanque de denove aprox. 7 horas después de haberse efectuado el - desove. Circuito abierto. E= Embrion.	
	E ₂	2.6x10 ⁴	80		
	E ₃	1.3x10 ⁴	1.6x10 ⁴		
5-03-89	N ₁	3.3x10 ⁴	1.2x10 ⁵	Muestreo realizado 24 horas después del anterior, y aprox. 20 horas después del cambio de agua mas EDTA. La mayoría de los organismos se encuentran entre Nauplio 2 y 3.	
	N ₂	2.7x10 ⁴	6.2x10 ⁴		
	N ₃	2.3x10 ⁴	1.2x10 ⁵		
6-03-89	N ₁	2.5x10 ⁴	9.0x10 ⁴	Los organismos se encuentran entre Nauplio 4 y Nauplio 5.	
	N ₂	1.9x10 ⁴	2.3x10 ⁴		
	N ₃	9.0x10 ⁴	3.3x10 ⁵		
7-03-89	Z ₁	1.0x10 ⁴	1.0x10 ⁴	Se trasladaron los organismos a un tanque de mayor capacidad, realizándose a la vez el cambio de agua. Los organismos se encontraban en Zoa 1; se alimentaron con - <i>Isachrysis tshitiana</i> , abastecida por el laboratorio de microalgas del mismo instituto.	
	A.M. Z ₂	1.0x10 ⁴	1.0x10 ⁴		
	P.M.	Z ₁	2.8x10 ⁴		1.0x10 ⁴
		Z ₂	1.3x10 ⁴		1.0x10 ⁴
8-03-89	Z ₁	2.6x10 ⁴	3.5x10 ⁴	Al igual que en el muestreo anterior se llevaron a cabo dos muestreos al día. Los organismos de Z ₂ murieron, no se determino la causa.	
	A.M. Z ₂	6.5x10 ⁴	7.0x10 ⁴		
	P.M. Z ₂	5.6x10 ⁴	2.1x10 ⁵		
9-03-89	Z ₂	4.6x10 ⁴	3.4x10 ⁴	La mayoría de los organismos se encuentran en Zoa 2.	
10-03-89	Z ₂	6.0x10 ⁴	6.4x10 ⁴	Los organismos se encuentran entre Zoa 2 y 3.	
	A.M.				
	P.M. Z ₂	6.1x10 ⁴	4.0x10 ⁴	Los organismos se encuentran entre Zoa 2 y 3.	
15-03-89	MY	3.6x10 ⁴	4.1x10 ⁴	Ultimo muestreo realizado, los organismos se encuentran en Mysis.	
	MY	1.6x10 ⁴	1.6x10 ⁴		

Los valores estan dados en Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml.

NUMERO DE CUADRO			
1	X	2	
3	4	5	6 7
8	9	10	11 12
13	14	15	16 17
18	19	20	

EL NUMERO EN CADA CUADRO
 REPRESENTA EL LUGAR DE LA CELA
 EN LA CAJA PETRI



PLACA DE PLESIOLAS CON 24 CUADROS
 CADA UNO CON 1 ml DE SUSPENSION DE
 LA CPA A PROBAR
 X = REFERENCIA PARA LECTURA

INCUBAR
 4 DIAS
 A 30 °C

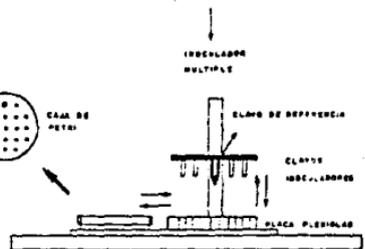
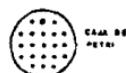


Fig. 1. METODO DE INOCULACION MULTIPLE EN CAJA DE PETRI.

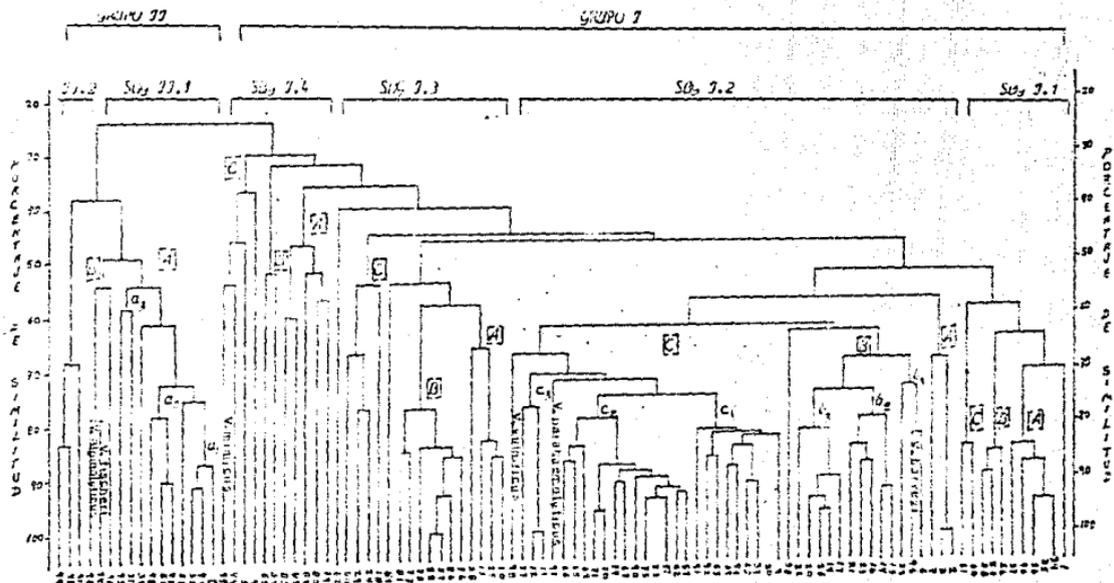


Fig. 2. UNUMA VIDA DE DEPTA INACTIVANS DEL GÉNERO Lebeus (excepción en TCDS) CLASIFICADA POR UN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS HIERÁRQUICA.

AU = Abulón
 AL = Alimento
 AR = Armonia

MY = Mysis
 NA = Nauplio
 PL = Planococcus lecanoides
 ZU = Zoea

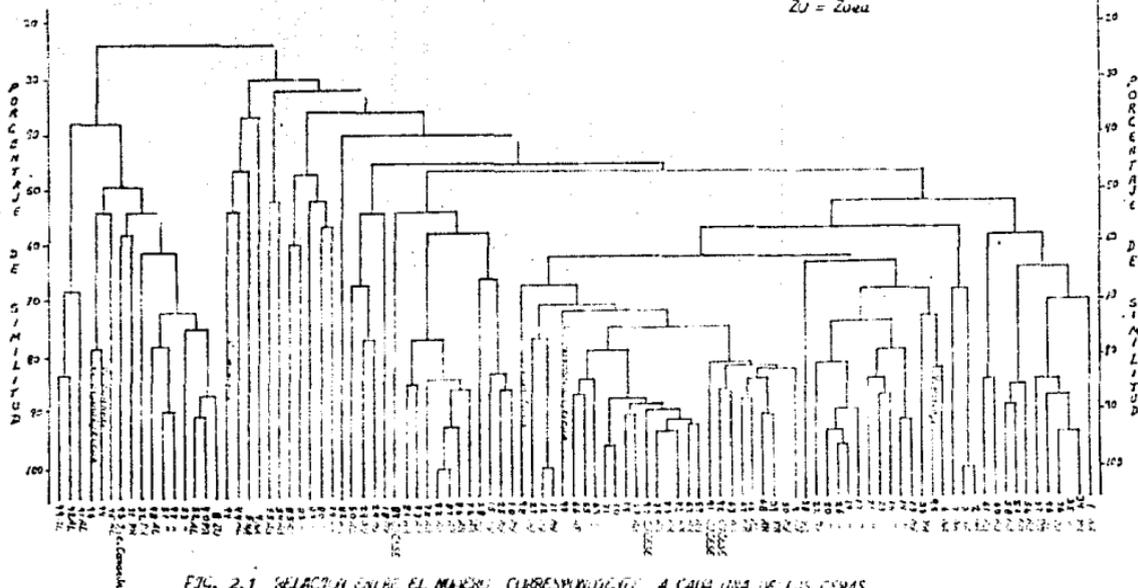


FIG. 2.1 RELACION ENTRE EL NOMBRE CORRESPONDIENTE A CADA UNA DE LAS OSMAS
 Y SU ORIGEN Y SITIO DE AISLAMIENTO.

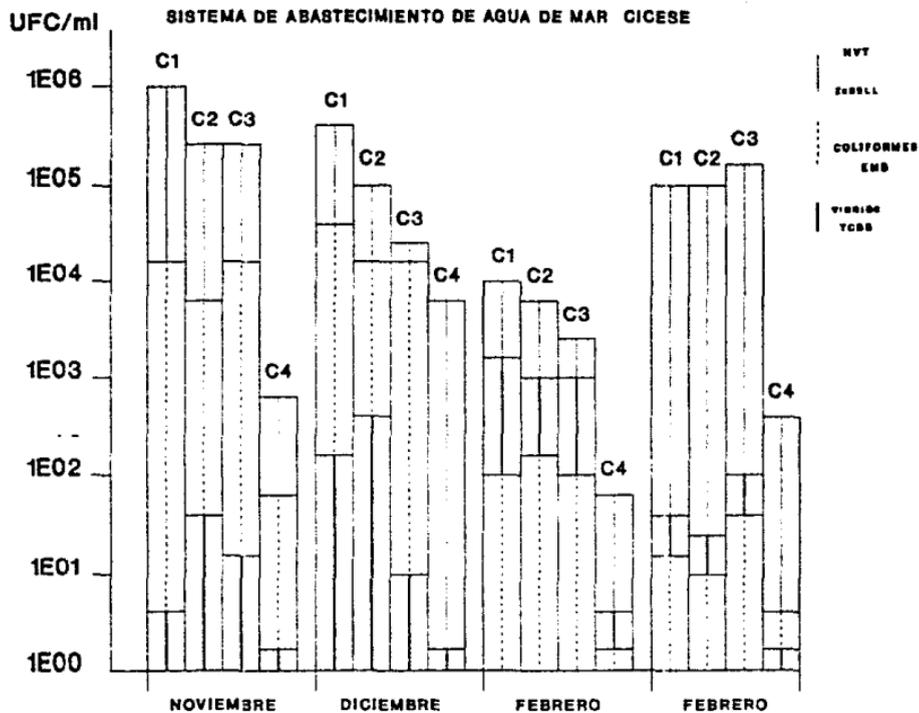
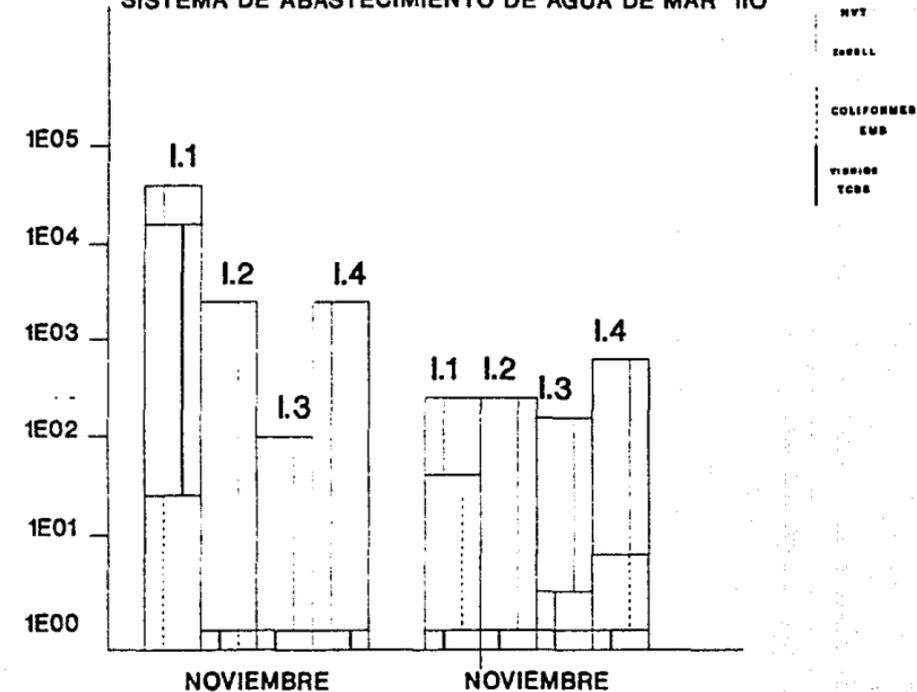


Fig.8a. MUESTREOS BACTERIOLÓGICOS

SISTEMA DE ABASTECIMIENTO DE AGUA DE MAR IIO



NOVIEMBRE
NOVIEMBRE
Fig.3b. MUESTREO BACTERIOLOGICO

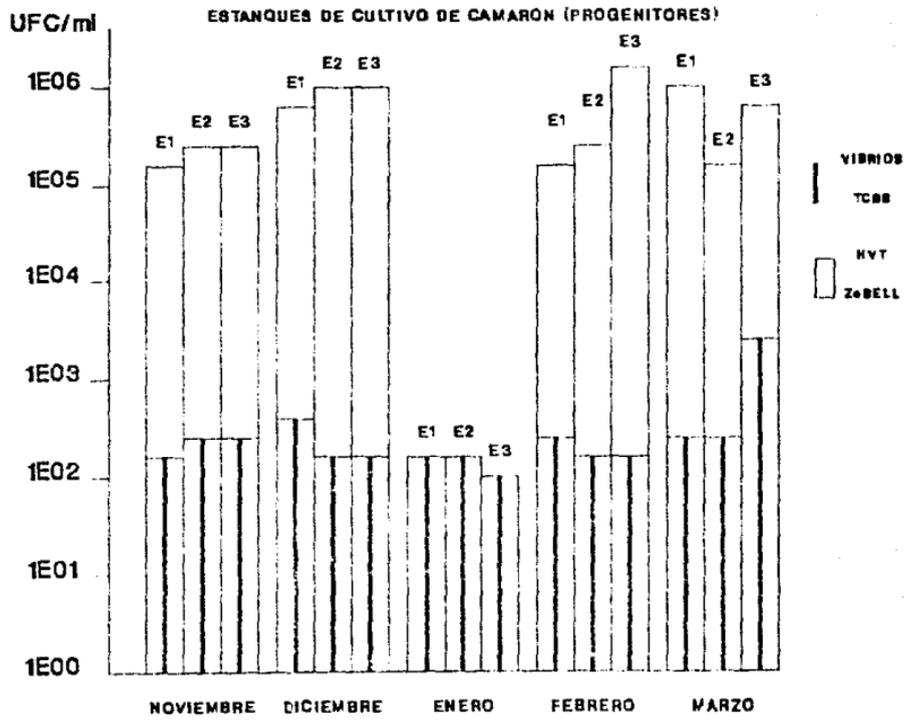
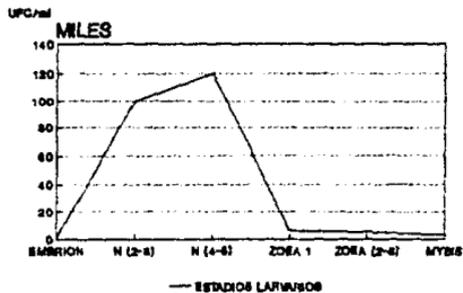
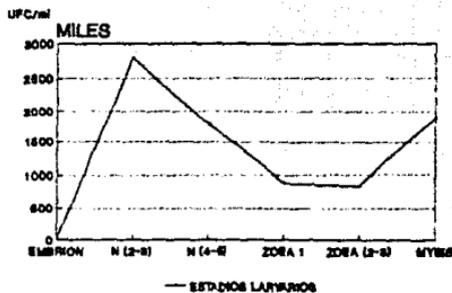


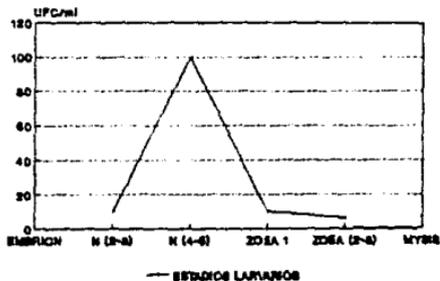
FIG. 3a VALORES PROMEDIO DE MUESTREOS BACTERIOLÓGICOS



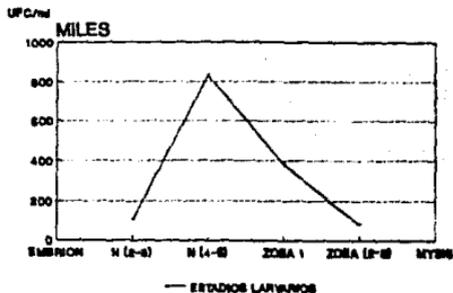
CULTIVO DE LARVAS 25 C (TCBS)



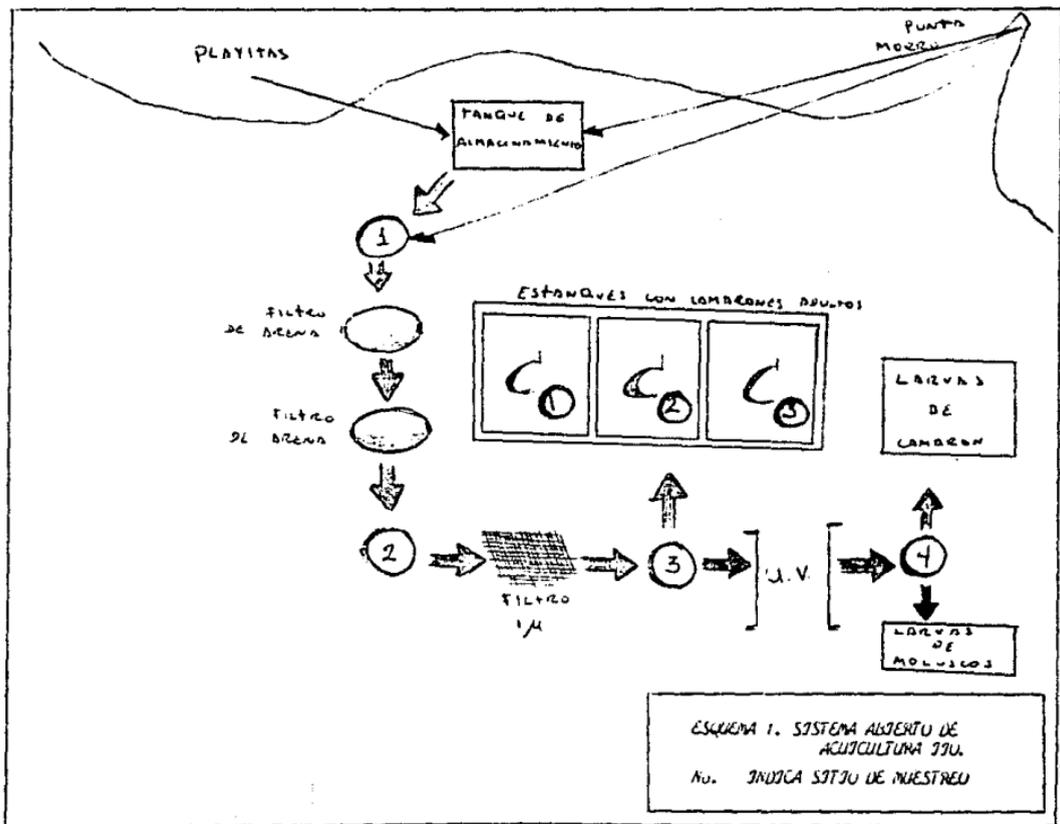
CULTIVO DE LARVAS 25 C (ZoBELL)



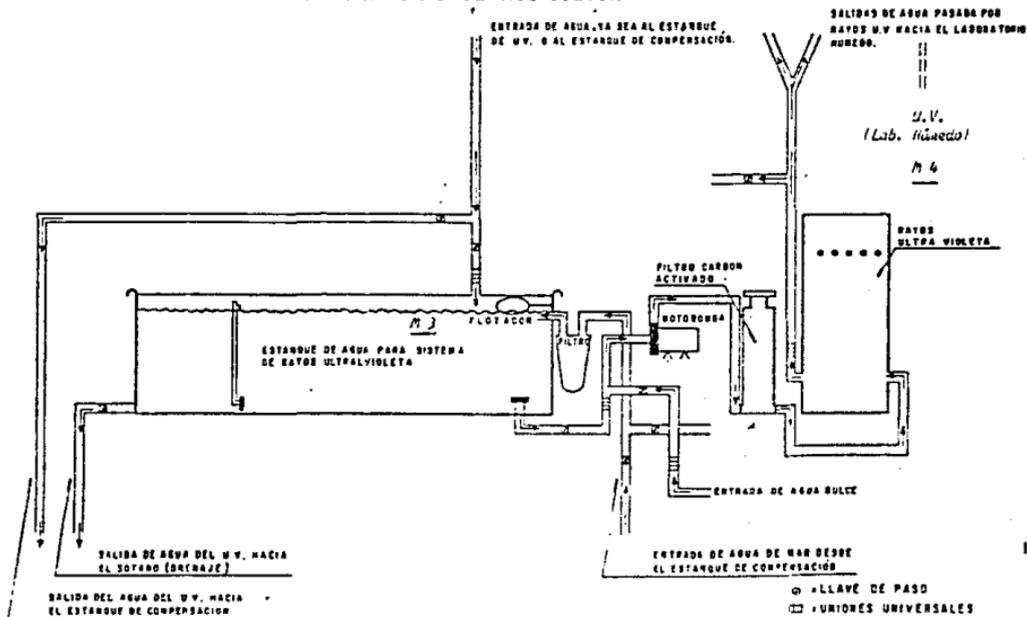
CULTIVO LARVARIO 20 C (MEDIO TCBS)



CULTIVO DE LARVAS 20 C (MEDIO ZoBELL)



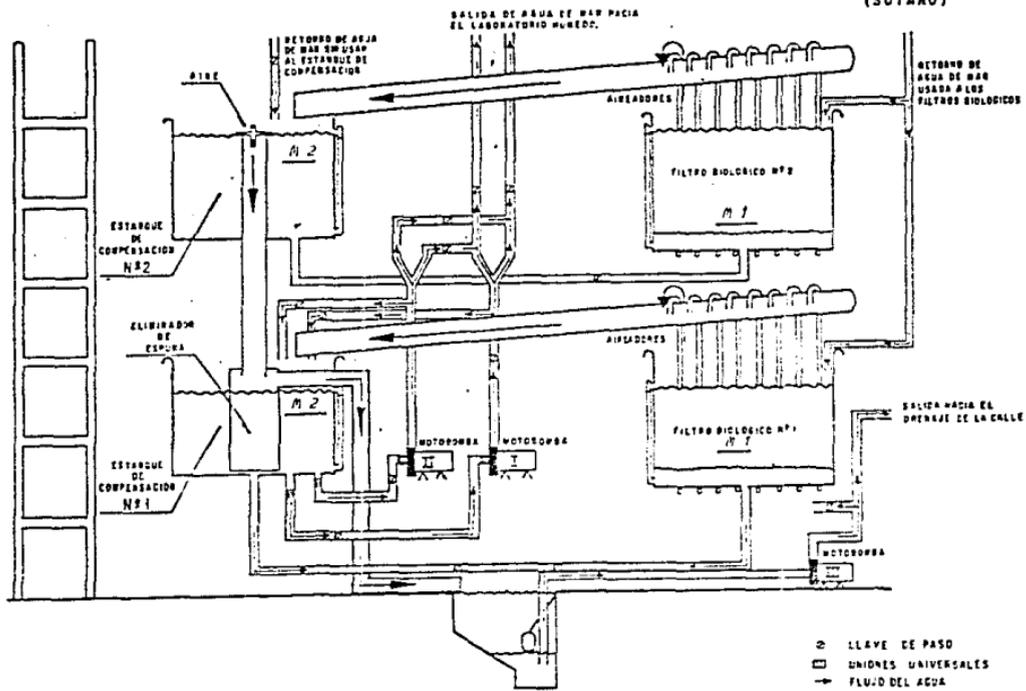
SISTEMA DE AGUA TRATADA CON RAYOS ULTRAVIOLETA EN EL LABORATORIO DE ACUICULTURA



ESQUEMA 2. SITIOS DE MUESTREO (M₃, M₄) CICESE.

TEC FRANCISCO VALENZUELA BURIEL.

SISTEMA CERRADO DE AGUA MAR EN LABORATORIO DE ACUICULTURA (SÓTANO)



ESQUEMA 2. SITIOS DE MUESTREO 1º y 2º CICESE.

TEC. FRANCISCO VALENZUELA BURIEL.

ANEXO 1. CONJUNTO DE PRUEBAS TAXONOMICAS APLICADAS.

MORFOLOGICAS

- Bastones Gram Negativos
- Morfología Colonial (forma y color en TCBS y Agar Marino)

FISIOLOGICAS

- Crecimiento a diferentes temperaturas 10, 25 y 42 °C
- Crecimiento a diferentes salinidades 0, 6, 8 y 10 ‰

BIOQUIMICAS

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| - Ornitina decarboxilasa | - Lipasa |
| - Arginina dihidrolasa | - Quitinasa |
| - Lisina decarboxilasa | - Amilasa |
| - Degradación de tiroxina | - Alginasa |
| - Citocromo oxidasa | - Bioluminiscencia |

NUTRICIONALES

- AMINOACIDOS Alanina, Asparagina, Aspartato, Glicina, Glutamato, Leucina, Ornitina, Prolina y Serina.
- AZUCARES Arabinosa, Sacarosa y Xilosa
- AZUCAR-ACIDO Glucuronato, Galacturonato
- AZUCAR-ALCOHOL Manitol
- ALCOHOLES Ethanol y Propanol
- ACIDOS DICARBOXILICOS Fumarato y Succinato
- HIDROXIACIDOS Glicerato, Glutarato y Lactato
- ACIDOS GRASOS Acetato, Propionato, Isoaminobutirato e Isoaminovalerato
- AMINAS Putresina

TOLERANCIA

- Crecimiento en el medio TCBS
- Sensibilidad al agente vibriostático O/129 (10,50,150 mg/ml).

ANEXO 2.

I. DESCRIPCION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y TECNICAS
APLICADAS EN SU ELABORACION.

- AGUA DE MAR ARTIFICIAL tipo Lyman y Fleming (1940) o Medio mineral concentrado, enriquecido con fosfatos y nitratos.

Se prepara disolviendo y por separado, una a una las sales en el orden establecido. En la preparacion de los medios se usa diluida 1:5 en agua destilada.

- MEDIO TIPO ZOBELL 2216 E (Oppenheimer-ZoBell, 1952).

Bacto peptona	5 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro Férrico (Sol. 1%)	1 ml
Agar bacteriológico	13 g
Agua de mar envejecida	750 ml
Agua destilada	250 ml
pH	7.5

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg. durante 20 minutos.

- MEDIO BASE para pruebas nutricionales:

FeCl	1 ml
Buffer Tris-HCl	10 ml
Agua de mar artificial	200 ml
Agua destilada	800 ml
pH	7.5-7.6
Agar bacteriológico	15 g

Método: El medio base se esteriliza a 121 °C durante 20 min.

I.1 PRUEBAS FISIOLÓGICAS:

- SALINIDAD:

Objetivo: Conocer los requerimientos y la tolerancia de las cepas silvestres estudiadas con respecto a la salinidad.

Método: Se utiliza medio ZoBell como base, con las siguientes concentraciones de NaCl:

0 o/oo	Medio ZoBell hecho con agua destilada
23 o/oo	" " " " " " + 23 gr/l NaCl
60 o/oo	" " " " " " + 60 gr/l "
80 o/oo	" " " " " " + 80 gr/l "
100 o/oo	" " " " " " +100 gr/l "

Se esteriliza a 121 °C durante 20 min. Se vacían en cajas de Petri, se inoculan las cepas mediante el inoculador semiautomático y se incuban a temperatura ambiente (20-25 °C).

Lectura: El requerimiento de salinidad para el crecimiento bacteriano y la tolerancia a este factor se refleja en los resultados que se presenten a las concentraciones probadas.

- TEMPERATURA:

Objetivo : Conocer la tolerancia y el rango de temperatura en el cual las cepas estudiadas presentan o no crecimiento.

Método: Se utiliza medio tipo ZoBell 2216 E (normal), se vierte en cajas de Petri, se inoculan y se incuban a 10, 25 y 42 °C.

I.2 PRUEBAS BIOQUIMICAS:

- ORNITINA Y LISINA DESCARBOXILASA Y ARGININA DIHIDROLASA:

Objetivo: La descarboxilación e hidrólisis de estos aminoácidos representan una prueba importante para la identificación de las diferentes especies del género *Vibrio*. Esta técnica nos muestra la presencia o ausencia de enzimas específicas.

Método: Se suspenden 10.5 gr. del medio base Moller (DIFCO) en un litro de agua destilada y/o desionizada, calentar hasta disolver completamente. Añadir 10 gr. (1 %) del aminoácido correspondiente y agitar hasta obtener una solución uniforme. Vertir de 3 a 5 ml. del medio en tubos o frascos con tapa, esterilizar por autoclave a 121 °C por 10 min.

En caso de observar cambio de color en los medios, es necesario rectificar el pH añadiendo NaOH y esterilizar nuevamente por filtración.

Se inoculan y se cubre con aceite mineral estéril.

Lectura: Se realiza entre las 25 y 96 horas de incubación a 25 °C. Resultados positivos se observan por un cambio de coloración que va de violeta a púrpura oscuro, en los casos negativos el medio se torna amarillo. Algunas reacciones débiles positivas presentan coloración gris-azulado.

- BIOLUMINISCENCIA:

Objetivo: Determinar si algunas de las cepas estudiadas producen bioluminiscencia como resultado de procesos bioquímicos específicos. Se considera característica importante de *V. parvulus*, *V. logei* y *V. fisheriei*.

Método: Se utilizó medio tipo ZoBell elaborado con agua de mar.

Lectura: Se realiza después de 12, 18 y 24 horas de haber inoculado e incubado las placas a 20-25 °C. Es conveniente examinar las placas en un cuarto completamente oscuro y después de que la visión haya sido adaptada a la oscuridad.

- OXIDASA (Kovacs, 1956):

Objetivo: Determinar si las cepas analizadas poseen la enzima citocromo-oxidasa.

Método: Se utiliza el reactivo de Kovacs (solución de NN dimetil-p-fenilendiamino, hidrocloreuro al 1 %). También puede usarse el p-aminodimethylaniline, oxalato (DIFCO).

El reactivo se prepara en el momento de hacer la prueba, se impregna un papel filtro con la solución al 1 %. Con un aplicador de madera estéril, se toma una colonia aislada de un cultivo con un máximo de 48 horas de crecimiento y frotar sobre el papel.

Lectura: Una coloración violeta-púrpura deberá aparecer dentro del primer minuto si la prueba es positiva, en caso contrario no habrá coloración.

- LIPASA (Sierra, 1957):

Objetivo: Determinar si las cepas estudiadas poseen la enzima extracelular que degrada lípidos.

Método: Esta prueba se realizó en medio tipo ZoBell preparado con agua de mar artificial y 1 % v/v de Tween 80, ajustar el pH a 7.5 +/- .1 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Lectura: Se realiza entre las 48 y 96 horas de haber inoculado e incubado las placas a 25 °C. Debe revisarse diariamente y considerarse positivas las colonias que presenten la formación de un halo, producto del precipitado de cristales blancos de oleato de calcio. En caso contrario se considera un resultado negativo. Es conveniente sembrar únicamente un número máximo de 8 cepas por caja de Petri.

- QUITINASA (Lingappa y Lockwood, 1962 modificado):

Objetivo: Determinar si las cepas estudiadas producen una enzima extracelular que ocasione la hidrólisis de la quitina.

Método: Quitina-agar fue preparado de la siguiente manera:

- La quitina en polvo cruda (SIGMA Co.) fue limpiada a través de baños alternados de NaOH 1M y HCl 1M cada 4 horas durante 36 horas.
- Lavar con ethanol (95 %) 4 veces y dejar secar a temperatura ambiente.
- Disolver la quitina en H₂ SO₄ (50 %) a una concentración final de 3.5 % w/v a temperatura ambiente con agitación constante.
- Filtrar la solución a través de filtros de fibra de vidrio para eliminar impurezas.

- Precipitar la quitina en solución, con agua desionizada, añadiendo NaOH 10 M hasta elevar el pH a 7.0 (para cada 20 gr. de quitina obtenida en el paso No. 2, utilizar 10 l. de agua desionizada a 4 °C).
- Dejar reposar la suspensión por 24 horas y deshechar al máximo el sobrenadante.
- Resuspender y lavar exhaustivamente con agua desionizada.
- Concentrar por centrifugación hasta obtener una consistencia de crema pastelera.
- Suspender la pasta coloidal de quitina en agua desionizada a una concentración final de 10 % w/v.
- Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 15 min.
- La suspensión deberá ser blanca cremosa y puede ser almacenada indefinidamente a 4 °C. Para su uso, se añade la suspensión al medio ZoBell a una concentración de 10 % para obtener una concentración final 1 % w/v.

Lectura: Se realiza después de las primeras 96 horas de haber inculado e incubado las placas a 25 °C con un máximo de 14 días. Es necesario revisar diariamente y registrar los resultados positivos que se observan como zonas claras alrededor del inóculo. Es conveniente sembrar únicamente un número máximo de 8 cepas por cada caja de Petri.

DEGRADACION DE TIROXINA (West et al., 1983.)

Objetivo: Determinar si las cepas estudiadas poseen enzimas que degraden la tiroxina.

Método: Se utilizó el mismo medio base que para las pruebas nutricionales, adicionando 2 % de L-tiroxina.

Lectura: La degradación de tiroxina es detectada por la desaparición de cristales alrededor del inóculo bacteriano, después de un período de incubación de 7 a 28 días a 25 °C. Las placas deben ser mantenidas en un ambiente adecuado para evitar la desecación.

PRODUCCION DE ALGINASA (Colwell, 1984).

Objetivo : Determinar si las cepas estudiadas producen enzimas degradadoras del alginato de sodio.

Método: Se utilizó medio tipo ZoBell más 2 % de alginato de sodio. Disolver con vapor y agitación constante para evitar carbonización del medio. Esterilizar por autoclave (20 min. a 121°C). Vertir en las placas mientras este caliente (60-70 °C) ya que la viscosidad del medio se incrementa conforme la temperatura disminuye. Dejar secar bien las placas antes de inocular.

Lectura: La actividad alginolítica es detectada durante la incubación máxima de 14 días y un resultado positivo es observado por la formación de una depresión u oquedad sobre la superficie del agar alrededor del inóculo (similar a la que producen las bacterias agarolíticas). Es necesario observar diariamente a partir del cuarto día.

PRODUCCION DE AMILASA

Objetivo: Determinar si las cepas estudiadas producen la enzima amilasa que permite el desdoblamiento del almidón.

Método: Se prepara el siguiente medio:

Agar nutritivo	23.0 gr.
Almidón soluble	1.5 gr.
Agua de mar artificial	200.0 ml.
Agua destilada	800.0 ml.
pH	7.5-7.6

Se sirve en cajas de Petri, se siembran las cepas y se incuban a 25 °C durante 48 horas.

Lectura: Para realizarla se cubre la placa con lugol; la prueba es positiva cuando se forma un halo transparente alrededor de la colonia y es negativa cuando el medio se tinte de azul.

Es conveniente que al igual que las otras pruebas se hagan por duplicado o triplicado y en este caso se realiza una segunda lectura, dentro de las siguientes 48 horas.

I.3 PRUEBAS NUTRICIONALES:

Objetivo: Conocer la capacidad de utilizar compuestos simples como única fuente de carbono y/o nitrógeno para el crecimiento y obtención de energía.

Método: Los substratos se disuelven en el medio base y se esterilizan a 115 °C por 10 min.

Siempre que este en duda la estabilidad de un compuesto debido al calentamiento, es necesario estabilizar por filtración a través de una membrana de poro de .2 μ y se añaden al medio justo antes de ser vertido en las cajas de Petri. La concentración final de los substratos en el medio debe ser de 0.1 ó 0.2 % w/v.

Los substratos utilizados para estas pruebas fueron:

AMINOACIDOS	CONCENTRACION g/l o ml/l	MET. ESTERILIZACION
L-Alanina	1	Filtración
L-Asparagina	1	Autoclave
L-Aspartato	1	"
L-Glicina	1	"
L-Glutamato	1	Filtración
L-Leucina	1	Autoclave
L-Ornitina	1	Filtración
L-Prolina	1	"
L-Serina	1	Autoclave

AZUCARES	CONCENTRACION	MET. ESTERILIZACION
L-Arabinosa	2	Filtración
Sacarosa	2	"
Xilosa	2	"
AZUCAR-ACIDOS		
Glucuronato	2	"
Galacturonato	2	"

AZUCAR-ALCOHOL

Manitol	1	Filtración
---------	---	------------

ALCOHOLES

Ethanol	1	Directo
---------	---	---------

Propanol	1	"
----------	---	---

AC. DICARBOXILICOS

Fumarato	1	Autoclave *
----------	---	-------------

Succinato	1	" *
-----------	---	-----

HIDROXIACIDOS

Glicerato	1	Filtración
-----------	---	------------

α -ceto Glutarato	1	"
--------------------------	---	---

D-L Lactato	1	"
-------------	---	---

AC. GRASOS

Acetato	1	"
---------	---	---

Propionato	1	"
------------	---	---

α -Aminobutirato	1	Autoclave *
-------------------------	---	-------------

D-Aminovalerato	1	" *
-----------------	---	-----

AMINAS

Putresina	1	Filtración
-----------	---	------------

* (45 min. a 110 °C.)

Lectura: Las cepas capaces de utilizar el sustrato probado presentan crecimiento a partir del inóculo; se considera un resultado negativo cuando no hay crecimiento. Es necesario realizar un mínimo de tres lecturas antes de registrar los resultados. Se incuban a 20-25 °C durante un mínimo de 72 hrs.

I.4 TOLERANCIA AL MEDIO TCBS:

Objetivo: La alta selectividad de este medio nos permite aislar con un alto porcentaje de probabilidad, bacterias del género *Vibrio*.

Método: Suspender 89.0 gr. en un litro de agua destilada o desionizada.

- Calentar hasta el punto de ebullición para disolver completamente. No debe esterilizarse en autoclave.
- Servir en cajas de Petri estériles.
- Sembrar las cepas e incubar a 20-25 °C durante 24-48 horas.

Lectura : Únicamente deben ser consideradas como bacterias del género mencionado, tres diferentes formas coloniales: amarillas (indican fermentación de sacarosa), verdes (no fermentación de sacarosa) y verde-azul (generalmente *V. parahaemolyticus*).

SENSIBILIDAD AL O/129 (West, 1980 Modificado)

(2,4-Diamino-6,7-Diisopropyl-pteridine SIGMA Co.)

Objetivo: Determinar la concentración mínima inhibitoria para las cepas estudiadas de *Vibrio* sp.

Método: Se utilizó medio Zobell, incorporando 0/129 en concentraciones finales de 10, 50 y 150 ug/ml.

-Primeramente se preparó y esterilizó la cantidad requerida del medio ZoBell.

- Se añadió la cantidad necesario de 0/129 para obtener una concentración final de 150 ug/ml. Se vertió unicamente el número de cajas requeridas para esa concentración. El resto se diluyó con el mismo medio para obtener una concentración de 50 ug/ml. Se repitió el paso anterior y se realizó una segunda dilusión para obtener una concentración final de 10 ug/ml.

Para utilizar esta técnica es necesario emplear el derivado fosfatado del 0/129 el cual es soluble en agua.

Lectura: Se realiza entre las 24 y 48 horas después de haber inoculado e incubado las placas a 25 °C. Se utiliza una placa de crecimiento como testigo para distinguir diferentes grados de inhibición.

BIBLIOGRAFIA

- *- Adanson, M. 1763. Familles des plantes. Vol.1 Vicent Ed., Paris (Francia). 100 p.
- Anderson, I.G. y M. Shariff, 1987. Mortalities of juvenile shrimp, *Penaeus monodon* associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus and rickettsial and bacterial infections. from Malaysian brackishwater ponds. Asian fisheries science, 1:47-64.
- Aquacop, 1977. Aquaculture en milieu tropical. Observations on diseases of crustacean cultures in Polynesia. 8th. workshop of world mariculture society, Costa Rica, 10-13 janvier. En Proc. world maricult. soc., 8. 685.
- Austin, B., 1983. Bacterial microflora associated with a coastal, Marine fish rearing unit. Journal marine biology ass., 63:584-592.
- Austin, B. y D. Allen-Austin, 1985. A review Bacterial pathogens of fish. J. of applied bacteriology, 58:483-506.
- *- Austin, B. y D.A. Austin, 1987. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.
- Austin, B. y R. Colwell, 1977. Evaluation of some coefficients for use in numerical taxonomy of microorganisms. Int. J. of systematic bacteriology, vol.27, 3:204-210.
- *- Baumann, P., L. Baumann y M. Mandel, 1971. Taxonomy of marine bacteria: the Genus *Beneckeia*. J. of bacteriology, vol.107, 1:268-294.
- *- Bauman, P. y R.H.W. Schubert, 1984. Family II. Vibrionaceae Veron, 1965, p. 516-550 En: N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 516-550.
- Berg, C. Jr. 1983. ed. Culture of marine invertebrates. Selected readings, 386 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1, Krieg y Holt ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, p. 516-550.
- *- Bergman, A.M., 1909. Die rote beulenkrankheit des Aals.- Ber. K. bayer. biol. vers.- Stn 2.10-54. En Colwell, R.R. y D.J. Grimes, 1984. Vibrio diseases of marine fish population. Helgolander Meeresunters. 37, 265-287 p.

- Berland B., D. Bonin y S. Maestrini. 1970. Study of bacteria associated with marine algae in culture. Marine Biology. 5: 68-76.
- Betancourt Villa, Irma G.. 1989. Pruebas de inducción al desarrollo ovárico de *Penaeus stylirostris* (Stimpson) bajo fotoperiodo y la técnica de enucleación. Tesis profesional. Facultad de ciencias marinas. Univ. Aut. de B.C.. 42p.
- *- Bianchi, y Bianchi, 1972. La numeration des populations bactériennes du milieu marin. Tethys, vol.3, 4: 697-704.
- *- Bolinches, J., J. Ronalde y A. Toranzo. 1988. Evaluation of selective media for isolation and enumeration of *Vibrios* from estuarine waters. Journal of microbiological methods. 8:151-160.
- *- Brown, C.. 1973. The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. J. Invert. Pathol. vol.21: 215-223.
- Brown, C. 1983. Bacterial diseases in bivalve larval cultures and their control. Culture of marine invertebrates (Selected readings). Edited by Carl, J. Berg, Jr. Woods Hole, Massachusetts. 386 pp.
- *- Brown, C. y E. Losee 1978. Observation on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. J. Invert. Pathol. 31 :41-47.
- *- Brown, C. y L. Petti, 1988. Characterization of a Nonmotile *Vibrio* sp. Pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* Aquaculture, 74: 195-204.
- Brown, C. y Ronald, 1984. Characterization of exotoxin produced by shellfish pathogenic *Vibrio* sp. J. Fish Dis. 7:117-126.
- Brown, C. y D. Russo, 1979. Ultraviolet light disinfection of shellfish hatchery seawater. Aquaculture. 17:17-23.
- Cassin, J. et al. 1975. Marine microbiology: some aspects for aquaculture en: Smith, W. and N. Chauley. Culture of marine invertebrates animal.
- Chan, K-Y., Woo, M.L., L.Y. Lam y G.L. French., 1989. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong. J. of applied bacteriology. 66: 57-64.
- Cipriani, G.R., R.S. Wheeler y R.K. Sizemore, 1980. Characterization of brown spot disease of Gulf Coast shrimp. J. of invertebrate pathology, 36: 255-263.

- *- Colwell, R., 1970. Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*. Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y related *Vibrio* species. Journal of Bacteriology, vol. 104, 1: 410 - 433.
- Colwell, R.R., 1984. Microbial ecology of biofouling. Bio-technology in the marine sciences. Sinskey T.A.
- *- Colwell, R.R., 1984. *Vibrios in the Environment*. J. Wiley and sons (ed). Interscience, New York, N.Y. 634p.
- Colwell, R. y Stevenson, 1973. The use of numerical taxonomy in estuarine microbial ecology.
- *- Colwell, R.R. y W.J. Wiebe, 1970. "Core" characteristics for use in classifying aerobic, heterotrophic bacteria by numerical taxonomy. Bull. Georgia Acad. sci. 28: 165-185.
- *- Crosa, J.H., L.L. Hodges y M.H. Schiewe, 1981. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infect. Immun. 27: 897-902.
- *- Crosa, J.H., M.A. Walter y S.A. Potter, 1983. The genetics of plasmid-mediated virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. En: Bacterial and viral diseases of fish, molecular studies. Ed. by J.H. Crosa. Univ. of Washington, Seattle, 21-30.
- Cross, V. 1987. Efficacy of ultraviolet water treatment at the greenlake, Marine National fish hatchery. The progressive fish-culturist, 49: 233-235.
- *- Delabre, M., A. Bianchi y M. Veron, 1973. Etude critique de methodes de taxonomie numerique. Application a une classification de bacteries aquicoles. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 124 A: 489-506.
- Disalvo, L.H., J. Bleoka y R.T. Zebal, 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California Coastal shellfish hatchery. Applied and environmental microbiology, vol. 35, 1: 219221.
- Elston, R. 1983. Histopathology of oxygen intoxication in the juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. Journal of Fish Diseases, 6: 101-110.
- Elston, R. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. J. World maricul. Soc. 15: 284-300.

- Elston, R.L., E.L. Elliot y R.R. Colwell, 1982. Conchiolin infection and surface coating *Vibrio*: Shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. Journal of Fish Diseases, 5: 265-284.

*- Elston, R. y L. Leibovitz, 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval american oysters, *Crassostrea virginica*. Can. j. fish. aqua. sci., vol.37, 6: 964-978.

- Elston, R., L.Leibovitz, D.Relyea y J.Zatila, 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic tools and management features, Aquaculture, 24: 53-62.

*- Elston, R. y Lockwood, 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. J. of Fish Diseases, 6: 111-128.

*- Evelyn, T.P.T., 1971. First records of vibriosis in Pacific salmon cultured in Canada, and taxonomic status of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*, J. Fish. Res. Can. 28: 517-525.

- Fryer, J. y J.Rohovec, 1984. Principal bacterial diseases of cultured marine fish. Helgoländer Meeresunters. 37: 533-545.

- Grizel, H., E.Bachere, E.Mialhe y G.Tige, 1987. Solving parasite related problems in cultured molluscs. Int. J. for parasitology, vol.17, 2:301-308.

- Guillard, R.L., 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. Biological Bulletin, 117: 258-266.

- Izquierdo-Vicuña, F.B., 1985. Caracterización de bacterias hidrocarbonoclasticas de las plataformas de explotación petrolera de la sonda de Campeche. Tesis de maestría, I.C.M. y L. UNAM, 150 p.

*- Johnson, S. K., 1989. Handbook of shrimp diseases. Texas A&M University. 25 p.

*- Kaneko, T. y R.R. Colwell, 1978. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. Microb. Ecol. 4: 135-155.

- Kanno, T., T.Nakai y K.Muroga, 1989. Mode of transmission of vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. J. of aquatic animal health, 1: 2-6.

*- Kaper, J.B., A.L. Mills y R.R. Colwell. 1978. Evaluation of the accuracy and precision of enumerating aerobic heterotrophs in water samples by the spread method. Appl. Environ. Microbiol. vol. 35, 4 : 756-761.

- Kaysner, CH. y et. al., 1987. Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries of the United States West Coast. Applied and environmental microbiology, vol. 53, 6: 1344-1348.

*- Kent, M.L., 1982. Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API- 20E (Analytab products) multitube test strips. Canada Fish. Aquat. Sci. 39: 1725-1729.

- Kimiaki, Y. y T. Kitao. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawn, *Penaeus japonicus* hata. Aquaculture, 19: 229-234.

*- Kobayashi, T., S. Enomoto, R. Sakazaki y S. Kuwahara. 1963. A new selective isolation medium for the *Vibrio* group. Jpn. J. Bacteriol. 18: 387-392.

*- Lee, J. T. Donovan y A. Furniss. 1978. Characterization, taxonomy and emended description of *Vibrio metschnikovii*. Int. J. of systematic bacteriology, vol. 28, 1: 99-111.

*- Lee, J., P. Shread, A. Furniss y T. Bryant. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. (Synonym group F vibrios, group EF6). J. of applied bacteriology, 50: 73-94.

*- Lewis, D.H., 1973. Predominant aerobic bacteria of fish and shellfish. Texas A&M University. Sea Grant Publ. 401, 102 p.

*- Lewis, D.H. y A.L. Lawrence. 1985. Immunoprophylaxis to *Vibrio* sp. in pond reared Penaeid shrimp. Proceedings symposium on warm water crustacean aquaculture. Brinham Young Univ. Laie, HI. In press.

*- Lightner, D.V., 1975. Some potentially serious disease problems in the culture of Penaeid Shrimp in North America. Proc. U.S. Japan Natural Resources Program, Symposium of Aquaculture Disease, Tokyo, p. 75-97. Spec. Publ. Fish. Agency, Jpn. Govt. and Jpn. Sea Res. Fish. Res. Lab., Niigata.

*- Lightner, D.V., 1977. Shrimp diseases. En: Disease diagnosis and control in north american marine aquaculture, vol. 16. Sinderman, C.J., Ed., Elsevier New York, 10.

*- Lightner, D.V., 1988. *Vibrio* disease of Penaeid shrimp. En: Disease diagnosis and control in north american marine aquaculture, vol. 16. Sinderman, C.J., Ed., Elsevier New York, 10.

*- Lightner, D.V. y D.H. Lewis. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of Penaeid shrimp, diseases of crustaceans, Mar. Fish. Rev., 37: 25-28.

- Lightner, D.V., R.M. Redman, D.A. Donald, R.R. Williams y L.A. Pérez. 1984. Major diseases encountered in controlled environment culture of penaeid shrimp at Puerto Peñasco, Sonora, México. En: C.J. Sinderman (ed). Proceedings of the ninth and tenth U.S.-Japan meetings on aquaculture, p.25-33.

- Lightner, D.V., R.P. Hedrick, et al., 1987. A survey of cultured shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. Fish pathology, 22: 127-140, vol.3.

*- Lizarraga-Partida, M.L., 1979. Pseudomonades du milieu marin. Taxonomie polyphasique et ecologie. Tesis Doctorado de Estado. Universidad de Provence - Aix, Marsella, Francia. 117 p.

- Lizarraga-Partida, S.Arreola y R.Hinojosa, 1987. Estudios bacteriológicos en Centros de Acuicultura. VII Congreso Nacional de Oceanografía. Ensenada, B.C. México.

- Lockhart, W and J.Liston, editors, 1970. Methods for numerical taxonomy American society for microbiology.

- Lodeiros, C., J.Bolinches y et al., 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. Aquaculture, 65: 15-29.

*- Lyman, J. y K.H. Fleming. 1940. Composition of sea water. J. of Mar. Res. 3:134-146.

*- Massad, G. y J.D. Oliver, 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. Applied and environmental microbiology, vol. 53, 9: 2262-2264.

*- Maugeri, T.L., E.Crisafi, L.Genovese y M.Scoglio, 1983. Identification of *Vibrio anguillarum* with the API - 20E system. Microbiologica 1, 73-79.

*- Moller, V., 1955. Simplified test for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta pathologica et microbiologica scandinavica, 36: 158-172.

- Moller, H., 1987. Pollution and parasitism in the aquatic environment. Int. J. for parasitology, vol.17, 2: 353-361.

*- Montoya, L. y Lizarraga-P., 1990. Calidad bacteriológica en diferentes etapas del cultivo de *Panesus stylirostris*. IV Congreso nacional de acuicultura. AMAC. '90, celebrado en el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, del 3 al 6 de abril de 1990.

*- Montoya, L., M. Lizarraga-P., J. Romero, 1990. Caracterización e identificación de bacterias del género *Vibrio* en sistemas de acuicultura en Ensenada, B.C. mediante el establecimiento de un conjunto mínimo de pruebas taxonómicas. Resultados preliminares. Tercer Encuentro Académico de Estudiantes de Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. Diciembre 1990.

- Murchelano, R. y C Brown. Bacterial flora of some algal foods used for rearing bivalve larval. J. Fish. Res. Bd. Canada 26: 2760-2764.

*- Munn, C.B., 1978. Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*. - FEMS microbiol. Lett. 3, 265-268.

*- Munn, C.B., 1980. Production and properties of a haemolytic toxin by *Vibrio anguillarum*. En: Ahne, W. (ed.), fish diseases, third COPRAQ-Session. Berlin, Springer - Verlag, p. 69-74.

*- Nybelin, O., 1935. Citado por: Sinderman, C.J., 1984. Disease in marine aquaculture. Helgolander Meeresunters. 37, 505-532 (1984).

- O'Brien, M. y R. Colwell, 1987. Characterization test for numerical taxonomy studies. Methods in Microbiology, Vol. 19.

*- O'Brien y Sizemore, 1979. Citado en: Krieg, N.R. y J.G. Holt (ed.) 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 526.

- Oliver, J., 1982. Instruments and methods. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. Deep-sea Research, vol. 29, 6A: 795-798.

*- Oppenheimer, C.H. y C.E. Zobell, 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. Journal of marine research, 11: 10-18.

*- Oppenheimer, C.H., W. Ghinkel y G. Gassmann, 1977. Microorganisms and hydrocarbons in the North Sea during July - August, 1975. En: American Petroleum Institute (Ed.), Proceedings 1977 Oil Spill Conference, Washington, D.C. 593-609.

- Pacha, R. and D. Kiehn, 1969. Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish : physiology, serology and epidemiology. J. of bacteriology, vol. 100, 1242-1247p.
- Pass, D., R. Dybdahl y M. Mannion, 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. Aquaculture, 65:149-169, 1987.
- Paynter, J.L., D.V. Lightner y R.J.G. Lester. Prawn virus from juvenile *Penaeus esculentus*. Dept. of parasitology, university of Queensland, Sta. Lucia, Australia. 61-64.
- Paperna, I., 1987. Solving parasite-related problems in cultured marine fish. Int. J. for parasitology, vol. 17, 2: 327-336.
- Pennec, M. y D. Prieur., 1977. Les antibiotiques dans les élevages de larves de bivalves marins. Aquaculture, 12:15-30.
- Prieur, D., 1976. Etude de bactéries associées aux élevages de larves de bivalves marins. Aquaculture, 8: 225-240.
- Reichert, J. y P. Baumann, 1973. Taxonomy of the marine luminous bacteria. Arch. Microbiol. 94: 283-330.
- *- Roberts, N.C. y R.J. Seidler, 1984. Methods for monitoring vibrios in the environmental. p. 269-275. En: R.R. Colwell (ed). *Vibrios in the environments*. John Wiley & sons, Inc. N.Y.
- *- Rosemark, R. y W.S. Fisher, 1988. *Vibriosis of lobsters*. En: Sinderman, C. y D. Lightner, 1988. *Developments in aquaculture and fisheries science*, vol. 17. Disease diagnosis and control in North America marine aquaculture. Ed. Elsevier, New York, 431 p.
- *- Ruby y Nealson, 1976. Citado en: Krieg, N.R. y J.G. Holt (ed.) 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 526.
- *- Ruby y Nealson, 1978. Citado en: Krieg, N.R. y J.G. Holt (ed.) 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 526.
- *- Ruby, E.G., Greenberg, E.P. y J.W. Hastings, 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column. Appl. environ. microbiol. 39, 302-306.

- Sakata, T. y M. Hattori, 1988. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased tilapia. Fish pathology, vol. 23, 1:33-40.
- *- Schiewe, M.H., T.J. Trust y J.H. Crosa, 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of vibriosis of fish. curr. microbiol., 6, 343-348.
- *- Schiewe, M.H., Novotny, J. A. y W.L. Harrell, 1988. Vibriosis of salmonids. En: Sinderman, C. y D. Lightner, 1988. Developments in Aquaculture and fisheries science, Vol.17. Disease diagnosis and control in North America Marine Aquaculture. Ed. Elsevier, New York, p. 323-327.
- Simidu, U. y E. Kaneko, 1973. A numerical taxonomy of *Vibrio* and *Aeromonas* from normal and diseased marine fish. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries, vol.39, 6: 689-703.
- *- Sinderman, C.J., 1970. Principal diseases of marine fish and shellfish. Academic Press, New York, N.Y. 369 p.
- *- Sinderman, C.J., 1984. Disease in marine aquaculture. Helgol. Meeresunters. 37: 505-532.
- *- Sinderman, C.J., 1988. Molluscan diseases. En: Sinderman, C. y D. Lightner, 1988. Developments in Aquaculture and fisheries science, Vol.17. Disease diagnosis and control in North America Marine Aquaculture. Ed. Elsevier, New York, p. 266-276.
- *- Sinderman, C.J., 1989. The shell disease syndrome in marine crustaceans. NOAA Technical memorandum NMFS- F/NEC 64. Woods Hole Massachusetts.
- *- Sinderman, C. y D. Lightner, 1988. Developments in Aquaculture and fisheries science, Vol.17. Disease diagnosis and control in North America Marine Aquaculture. Ed. Elsevier, New York, 431 p.
- *- Sneath, P.H.A., 1957. Some thoughts on bacterial classification. J. Gen. Microbiol. 17: 185-200.
- *- Smetzko, S.F., 1978. Bacterial diseases of fishes and their control. Marine fisheries review, vol.40, 10: 2-3.
- *- Stanier, R.Y., H.J. Palleroni y M. Doudoroff, 1966. The aerobic *Pseudomonads*. A taxonomical study. J. Gen. Microbiol. 43: 159-271.

- *- Tebo et al., 1979. Citado en: Krieg, N.R. y J.G. Holt (ed.) 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 526.
- *- Thirabault, P., M.Piechaud y M. Veron, 1963. Matériel et méthodes utilisées en bactériologie. Citado por: Izquierdo V., F. 1985. Caracterización de Bacterias Hidrocarbonoclasticas de las Plataformas de Explotación Petrolera en la Sonda de Campeche. 131 p.
- Tubiash, H., 1974. Single and continuous exposure of the adult american oyster *Crassostrea virginica*, to marine vibrios. Can. J. Microbiol. 20: 515-517.
- Tubiash, H., P.Chanley y E. Leipson, 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusc. J. Etiology and epidemiology. J. Bacteriol. 90: 1036-1044.
- *- Tubiash, H.S., R.R.Colwell y R.Sakazaki, 1970. Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve molluscs. J. Bacteriol. 103: 272-273.
- *- Tubiash, H.S., 1975. Bacterial pathogens associated with cultured bivalve mollusk larvae. En: Culture of marine invertebrate animals. Ed. by W.L. Smith y M.H. Chauley Plenum Press. New York. 61-71.
- *- Vanderzant, C., C. Nickelson y J.C. Parker, 1970. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Gulf Coast shrimp. J. Food Milk Technol. 33: 161-162.
- *- Veron, M., 1969. Taxonomie numérique et classification des bactéries. Bull. Inst. Pasteur. vol.67, 2:2739-2766.
- *- Watt, R.R., L. Jeffries y S.A. Price, 1966. An automatic multipoint inoculation for petri dishes. p. 297-304. En: E.M. Gigg y F. Skinner (Eds.) Methods for the identification of bacteria. Part A. Academic Press London and New York.
- *- Wedemeyer, G.A., Meyer, F.P. y L. Smith, 1976. Environmental stress and fish diseases. T.F.M. Publ. Neptune, NJ. 200 p.
- West, P.A., P.Bryant, T.Bryant y R. Colwell, 1986. Numerical taxonomy of Vibrios isolated from aquatic environments. International Journal of systematic bacteriology, vol.36, 4: 531-543.
- *- West, P.A. y R.R. Colwell, 1984. Identification and classification of vibriónaceae.- An overview En: Colwell, R.R., 1984. Vibrios in the environment, p. 285-363.

- West, P., J. Lee y T. Bryant, 1983. A numerical taxonomic study of species of *Vibrio* isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England. Journal of applied bacteriology, 55: 263-282.

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

* LITERATURA CITADA