

03067
4
2er

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado
Colegio de Ciencias y Humanidades
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
Especialización, Maestría y Doctorado en Ciencias del Mar

**ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE QUISTES Y
NAUPLIOS DE LA POBLACION DE *Artemia franciscana*
Kellogg, 1906, DEL GRAN LAGO SALADO, UTAH ,
E.U.A.**

T E S I S

que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR
(OCEANOGRAFIA BIOLOGICA Y PESQUERA)**

P R E S E N T A :

Biol. Bruno Gomez Gil Rodriguez Sala

Agosto 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	
Camaronicultura	3
Patología en la camaronicultura	3
<i>Artemia franciscana</i>	6
Bacteriología de <i>A. franciscana</i>	10
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y METODOS	15
RESULTADOS	
Ultrasonido	21
Curva de crecimiento bacteriano en un ciclo de eclosión de <i>A. franciscana</i>	22
Carga bacteriana en quistes	23
Carga bacteriana en nauplios	24
Bacterias en el agua de eclosión	25
Resistencia de nauplios a diferentes soluciones desinfectantes	26
Evaluación de los diversos químicos para la desinfección de bacterias adheridas a nauplios	28
Identificación de cepas	33
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA	58
APENDICES	
I. Medios de cultivo empleados	64
II. Pruebas bioquímicas	67
III. Descapsulación de quistes de <i>A. franciscana</i>	74

RESUMEN

En este trabajo se investigan las concentraciones de bacterias heterótrofas totales y de aquellas crecidas en agar TCBS a lo largo de un ciclo de eclosión de quistes de *Artemia franciscana* de cepa Gran Lago Salado, Utah marca Frippak, en quistes descapsulados y no descapsulados; en nauplios provenientes de ambos tipos de quistes y en el agua de eclosión de nauplios. Se evalúa la resistencia de nauplios de *A. franciscana* a una inmersión en diversas soluciones desinfectantes y se cuantifica el efecto de éstas soluciones en las bacterias adheridas a los nauplios. Se valora la eficiencia del ultrasonido como herramienta para desprender bacterias adheridas a estos organismos, sin afectar el conteo total viable de bacterias; y, por último, se identifican las cepas obtenidas.

ABSTRACT

In this thesis the concentrations of total heterothrophic bacteria and those grown on TCBS agar during a 24 hour hatching process of *Artemia franciscana* Utah Friipak strain are investigated. Also bacteria are studied from decapsulated and non decapsulated cysts; from nauplii hatched from both types of cysts, and from the hatching water. The resistance of nauplii to a wash with different disinfecting solutions is evaluated, and the effect of that treatment to the bacteria attached to the nauplii. The use of ultrasound as a mean to remove bacteria from those organisms is also investigated, without causing harm to the bacteria. The strains of bacteria are identified.

INTRODUCCION

Las enfermedades que se presentan en los organismos acuáticos bajo cultivo, en especial de los camarones penéidos, cada vez son mejor comprendidas, debido al gran interés que han despertado en la comunidad relacionada a la acuicultura. Es indudable que los organismos sometidos a un cultivo son más propensos a desarrollar patologías debido a muy diversos factores, entre los que se pueden citar: altas densidades de confinamiento, estrés, alteraciones alimentarias, baja calidad del agua, etc. Todos estos factores solos o combinados pueden ocasionar que el sistema de defensa de los organismos se deteriore y presente, en consecuencia, menores defensas ante embates de microorganismos de todos tipos. Es muy difícil que en un cultivo se satisfagan todos los requerimientos óptimos de cada especie todo el tiempo.

La *Artemia* es ampliamente usada como alimento vivo principalmente para las fases larvarias de muchos organismos acuáticos debido a su alto valor nutritivo. Se emplea prácticamente en todas sus fases de desarrollo, desde nauplio hasta adulto. En el caso de la camaricultura se les suministra a los estadios larvarios y postlarvarios como nauplio recién eclosionado.

Se ha identificado que uno de los principales medios por los que se introducen agentes patógenos a los camarones en cultivo es el alimento vivo que se les suministra y en especial la *Artemia*.

Pocos estudios existen que evalúan la carga bacteriana en todo el proceso de eclosión de los quistes de *Artemia* y que intentan realizar una desinfección de los nauplios obtenidos. Se tienen datos aislados de diferentes cepas de *Artemia*, pero no de las diversas fases de crecimiento de una sola cepa de este microcrustáceo.

.ANTECEDENTES

Camaronicultura

La historia de la investigación y combate de enfermedades en cultivos marinos no tiene más de 20 años (Sindermann y Lightner, 1988). En nuestro país es todavía más joven, ya que la acuicultura en sí también lo es, al menos como una industria bien establecida. Existen reportes que ya desde tiempos prehispánicos se practicaba algunos tipos de cultivos acuáticos (Cifuentes *et al.*, 1990). El cultivo del camarón empezó en Sinaloa, México en 1972, en una fase experimental, pero es prácticamente hasta 1980 cuando se empezaron a construir estanques ya en forma (Cabrera y Calderón, 1986); por lo que se ve esta industria tiene escasos 13 años. Para el año de 1991, había 201 granjas con 9945 hectáreas de estanquería y 15 laboratorios registrados de producción larvaria en nuestro país (Gámez y de la Lanza, 1992). Si se calcula un rendimiento promedio de una tonelada por hectárea, se deduce que se produjeron cerca de diez mil toneladas de camarón. Según los datos actuales (Rosenberry, 1992), esta cifra equivale al 3-5% de total de camarón cultivado en el mundo. La investigación que se está realizando sobre patología en México actualmente es muy escasa y para 1991 sólo había cuatro proyectos, de acuerdo al Sistema de Referencia para la Investigación en Acuicultura (Gámez y de la Lanza, 1992).

Patología en la Camaronicultura

Kinne (1980) denota como "enfermedad", toda desviación negativa y demostrable del estado normal "salud" de un organismo vivo. Por "negativo" se entiende un deterioro cuantificable en términos de una reducción en su potencial ecológico; por ejemplo, sobrevivencia, crecimiento, reproducción, procuramiento de energía, competencia o resistencia. La desviación puede ser funcional, estructural o ambas y puede ser como resultado de una sola causa o de varias actuando

en conjunto. Es claro que todos los organismos tiene algún medio de defensa y, debido a esto, hay un balance entre estos dos factores. Este estado normal es sujeto de influencias externas (clima o estrés, por ejemplo) y por el grado de nutrición que presente el organismo.

De las enfermedades que se presentan en camarones bajo cultivo, las de origen bacteriano sobrepasan en incidencia a las virales, fúngicas o protozoarias. Las bacterias halofílicas, especialmente las pertenecientes al género *Vibrio*, son consideradas las fuentes del problema en cultivos de especies marinas o estuarinas (Sindermann y Lightner, 1988). Este género es muy abundante en ambientes marinos y estuarinos, por lo que prácticamente se le encuentra en cualquier agua empleada para cultivo de camarón en fase de engorda o bien en producción larvaria. Aún más, muchas de estas bacterias habitan regularmente en el sedimento (Yasuda y Kitao, 1980) y en el tracto digestivo de estos crustáceos, tanto de organismos adultos como de larvas (Dempsey *et al.*, 1985; Dempsey y Kitting, 1987; Yasuda y Kitao, *op. cit.*).

En todos los casos de enfermedades bacterianas en el camarón, la etiología es del tipo secundario. Esto quiere decir que no son estas bacterias las primeras que atacan al camarón, sino que antes debe haber algún ataque por otro agente (otro microorganismo por ejemplo), lesiones mecánicas que abran la cutícula y expongan los tejidos internos, etc. Hasta ahora, las bacterias patógenas encontradas son del tipo oportunista (Baticados, 1989), aunque parece haber nuevos síndromes en los que estas bacterias se comportan como verdaderos patógenos primarios (Lightner, 1993). Hay una enfermedad de etiología primaria bien estudiada, pero se presenta en langostas del género *Homarus*, en donde las bacterias se caracterizan por ser bacilos móviles, gram negativas, oxidasa positivas y fermentativas (Lightner, *op. cit.*). En la tabla 1 se presenta la lista de especies de bacterias que se han aislado de camarones infectados.

Las infecciones bacterianas se pueden presentar en tres formas básicas, según Lightner (1993): 1. localizadas en erosiones de la cutícula, 2. infecciones internas en el tracto digestivo o hepatopáncreas y 3. septicemias.

<i>Vibrio anguillarum</i> *	<i>Aeromonas</i>
<i>V. alginolyticus</i> *	<i>Pseudomonas</i>
<i>V. parahaemolyticus</i> *	<i>Leucothrix mucor</i>
<i>V. cholera (no O1)</i>	<i>Aleromonas</i>
<i>V. damsela</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>V. harveyi</i>	<i>Spirillum</i>
<i>V. splendidus</i>	<i>Moraxella</i>
<i>V. vulnificus</i>	<i>Pasteurella</i>

Tabla 1. Especies de bacterias marinas aisladas de camarones enfermos. (según Brock y LeaMaster, 1992).

* las más comunes.

Existen escasos antecedentes sobre la incidencia de enfermedades bacterianas en los camarones cultivados en la fase de engorda. El único trabajo en el que se reportan cifras es uno realizado en Japón; en

donde se han reportado pérdidas que ascienden a 70.2 toneladas anuales de camarón cultivado o sea 3.4%, de un total de 2037 toneladas (Sano y Fukuda, 1987). Otros autores también citan a las bacterias como importantes agentes patogénicos en la engorda de camarón (Aquacop, 1977; Nurdjana *et al.*, 1977; Baticados, 1988; Getchell, 1989; Carpenter, 1992; Lightner, 1993).

Chen *et al.* (1992), reportan hasta 18 especies distintas de vibrios aislados del hepatopáncreas de camarones moribundos de la especie *Penaeus monodon* a lo largo de tres años de estudio. Las principales especies aisladas fueron *V. harveyi* (26.9 a 43.0% del total de especies), *V. damsela* (16.6 a 22.4%), *V. nereis* (9.6 a 12.4%), *V. tubiashii* (7.0%), *V. vulnificus* (1.3 a 8.4%), *V. anguillarum* (4.0 a 5.6%) y *V. parahaemolyticus* (6.0%). Estos vibrios representaron del 73.4 al 84.6% de todas las especies de bacterias colectadas, el resto fue *Aeromonas* de 1.1 a 9.1%, *Enterobacter* de 1.7 a 4.4%, otras no fermentativas de 6.6 a 7.3%, cocos gram negativos de 0.8 a 2.9% y cocos gram positivos de 3.6 a 4.5%. Estas bacterias, se sospecha fueron responsables de mortalidades masivas durante esos años en Taiwan.

En la fase de cultivo larvario y postlarvario se tienen más datos, ya que es allí donde el ataque bacteriano es más visible. Brock y LeaMaster (1992) ofrecen una buena síntesis de cerca de 30 trabajos publicados hasta la fecha sobre las enfermedades que se presentan en esta fase del cultivo.

Las bacterias, principalmente del género *Vibrio*, pueden llegar a causar mortalidades incluso del 100% en menos de 24 horas, en los casos más extremos. Desgraciadamente en nuestro

país la disponibilidad de datos es prácticamente nula, aunque por comunicaciones personales se sabe que son el principal problema en los laboratorios de producción larvaria.

Las enfermedades representan el mayor obstáculo en el futuro del cultivo del camarón (Rosenberry, 1992) teniendo en cuenta que la tendencia actual es hacia los cultivos intensivos. Las granjas y los laboratorios en general tienen pocas defensas ante los microorganismos patógenos, que ya han causado desastres en tanto en el hemisferio occidental como en el oriental. Debido a esto, entender, prevenir y controlar las enfermedades es cada vez más un asunto de primordial importancia en la creciente industria camarónica.

Artemia

Por su alto valor nutritivo, *Artemia* es el crustáceo más empleado como alimento vivo para diferentes organismos acuáticos (Sorgeloos *et al.*, 1986; Léger *et al.*, 1987; Sorgeloos y Léger, 1992). Su composición de nutrientes ha sido ampliamente estudiada (tabla 2). Los ácidos grasos esenciales, especialmente el 20:5 omega 3, se han considerado como el principal factor que determina el valor nutricional de una cepa de esta especie (Léger *et al.*, *op. cit.*). No sólo debe *Artemia* poseer buenos nutrientes, sino que deben ser fácilmente accesibles para el consumidor potencial; en ese sentido, este alimento presenta una alta digestibilidad para la utilización neta de proteína (Léger *et al.*, *op. cit.*). Aunque existen varios tipos de alimento balanceado, los acuicultores todavía prefieren seguir usando *Artemia*. En el cultivo larvario de camarones penéidos es fundamental para los últimos estadios larvarios y para los primeros postlarvarios, a los cuales se les suministra en el estadio de nauplio.

	Nauplio	Adulto
Proteína	52.2 ± 8.8	56.4 ± 5.6
Lípidos	18.9 ± 4.5	11.8 ± 5.0
Carbohidratos	14.8 ± 4.8	12.1 ± 4.4
Cenizas	9.7 ± 4.6	17.4 ± 6.3

Tabla 2. Composición nutricional de *Artemia franciscana* (% del peso seco total)
(Según Léger et al., 1986).

De las varias cepas de *Artemia* empleadas, las que más se consumen en el hemisferio occidental presentan la siguiente clasificación taxonómica: Clase Crustacea, orden Anostraca, familia Artemiidae,

género y especie *Artemia franciscana* Kellogg, 1906. Esta especie forma parte de un grupo de cinco especies bisexuales y una partenogenética. Procede principalmente de dos fuentes, una de la bahía de San Francisco, California y la otra del Gran Lago Salado en Utah, ambas de los Estados Unidos de Norteamérica. La cepas tienen una gran variación entre si. Por ejemplo, la concentración del lípido 20:5 omega 3 es de 0.3 a 13.3% del total de lípidos en la cepa de la bahía de San Francisco, mientras que la de Utah generalmente tiene menos, de 0.3 a 3.6%.

Artemia tiene la capacidad de vivir en ambientes hipersalinos, aunque se desarrolla bien en aguas de baja salinidad. Normalmente, se encuentra en aguas entre 70 y 250 , ocurre en estas condiciones ya que es ahí donde sus depredadores naturales no pueden sobrevivir y por lo tanto esto representa su único medio de defensa. Para sobrevivir a esas concentraciones salinas, presenta quizá el mejor sistema osmoregulador del reino animal. Por otro lado, las condiciones ambientales también afectan su estrategia de reproducción: a bajas salinidades desarrolla preponderantemente una reproducción ovovivípara (produciendo nauplios), pero a partir de 150 , la reproducción tiende a ser ovípara produciendo quistes (Berthélémy-Okazaki y Hedgecock, 1987). En el último caso produce embriones enquistados parcialmente desarrollados y cubiertos por estructuras que les confieren resistencia (Fig. 1).

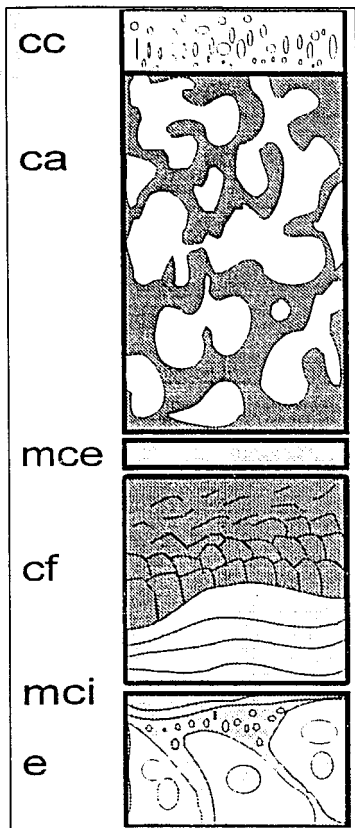


Figura 1. Capas del quistes de *Artemia franciscana*. **CC** capa cuticular; **CA** capa alveolar; **MCE** membrana cuticular externa; **CF** capa fibrosa; **MCI** membrana cuticular interna; **e** embrión. (modificado de Clegg, et al. 1984.)

El quiste está dividido en varias partes (figura 1), en general se tienen: a) *Córiorion* (capa cuticular y capa alveolar). Una estructura externa rígida, formada por quitina y hematina. Le proporciona resistencia contra abrasiones mecánicas y radiación ultravioleta. Esta capa se encuentra altamente alveolada y actúa como flotador. La hematina le da su característico color café.

b) *Membrana cuticular externa*. Proteje al embrión contra la penetración de moléculas de tamaños mayores que la del CO_2 .

c) *Membrana cuticular interna* (cutícula embrionaria). Una capa transparente y elástica. A ésta la separa del embrión una membrana cuticular interna, misma que durante la incubación se convierte en la membrana que envuelve al nauplio previo a la eclosión.

d) *Embrión*. Dentro del quiste, el desarrollo de éste permanece en la fase de gástrula, en un estado de vida latente.

El embrión enquistado permanece como gástrula indiferenciada, casi ametabólica, mientras se mantenga a una concentración de agua inferior a 0.1-0.3 g $\text{H}_2\text{O/g}$ de peso seco (Slegers, 1991).

Los quistes secos son altamente higroscópicos; por lo que, en las primeras horas de hidratación, aumentan su volumen en más de un 100%. Una vez completamente hidratados y con suficiente iluminación (Drinkwater y Clegg, 1991), el metabolismo se activa. El cambio en el pH que se presenta internamente ocasiona que el

metabolismo aeróbico del embrión transforme la trehalosa (forma en que los embriones almacenan reservas energéticas) en glicerol y glicógeno, lo que ocasiona que la presión osmótica interna se incremente sustancialmente por la naturaleza higroscópica de este compuesto y al imbibir agua provoca la ruptura del corión, para iniciar así la primera fase del proceso de eclosión. Cuando ocurre esto, el glicerol y glicógeno se liberan al medio circundante, suministrando una fuente de energía para el crecimiento y proliferación de bacterias. La trehalosa, al parecer sustituye al agua en la bicapa fosfolipídica de las membranas (Crowe *et al.*, 1987 y Slegers *op. cit.*), esto le permite al embrión resistir la condición de casi total deshidratación. El rompimiento del corión puede llevarse a cabo en ausencia de sales, y de hecho, a medida que la salinidad aumenta, mayores concentraciones de glicerol deben ser formadas para alcanzar una diferencia de presión osmótica suficientemente alta para que permita una ruptura (Sorgeloos *et al.*, 1986). Así, a mayor salinidad mayor tiempo de eclosión y menor será la energía restante en el nauplios que no se nutre más que de las reservas vitelinas.

Los quistes secos son muy resistentes a la temperatura; Sorgeloos *et al.* (1986) especifica que entre -273 y 60°C, la viabilidad no se ve afectada; más de 60°C, pero menos de 90°C y por poco tiempo de exposición, es tolerable. En quistes hidratados, los rangos son más estrechos: a más de 40°C y menos de -18°C hay muerte del embrión; entre -18 y 4°C y entre 32 y 40°C, hay una interrupción reversible del metabolismo; entre 4 y 32°C hay una completa eclosión, aunque a temperaturas menores, ésta es más lenta.

Una práctica recomendada es la descapsulación de los quistes para prevenir que residuos de la cáscara o quistes no eclosionados afecten negativamente al organismo consumidor al poder bloquear su tracto digestivo, además de que estos residuos son indigeribles (Sorgeloos *et al.*, 1977). Otra razón, comunmente aceptada, es que los quistes descapsulados prácticamente quedan estériles, ya que hay una desinfección del quiste debido al tratamiento con hipoclorito de sodio (Sorgeloss, *et al.* 1986 y 1977, Bengston *et al.*, 1991). Austin y Allen (1982) encontraron 300 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias en el interior de estos. lo cual consideran como "casi estéril" (tabla 3).

La descapsulación tiene como finalidad disolver la capa lipoproteínica que enquistada al embrión (corión Fig. 1), por medio de una oxidación. Esta disolución se puede llevar a cabo mediante blanqueador líquido (NaOCl) o bien en polvo ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Para llevar a cabo una completa descapsulación es necesario que, primero, los quistes se encuentren totalmente hidratados, segundo, sean tratados con la solución descapsuladora, tercero, lavarlos con agua limpia o de preferencia con una solución desactivadora (0.1N de HCl o 0.1% de tiosulfato de sodio). Otra razón comúnmente aceptada para descapsular los quistes es que mejora la eficiencia de eclosión, en particular de algunas cepas de *Artemia* (Sorgeloos *et al.*, 1977). Sin embargo, este punto es controversial ya que Spotte y Anderson (1989) encontraron que no hubo diferencia significativa entre el número de nauplios eclosionados a partir de quistes descapsulados y quistes sin tratamiento y que en varios de los casos incluso hubo un decremento, en los nauplios provenientes de quistes descapsulados.

Bacteriología de Artemia

Varios autores han señalado que los nauplios de *Artemia* pueden ser vectores de diferentes bacterias heterótrofas, que incluso se han llegado a detectar en los quistes enlatados al vacío (Gilmour *et al.*, 1975; Wheeler *et al.*, 1979; Sorgeloos *et al.*, 1986; Igarashi *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1991; Dehasque *et al.*, 1991; Montoya, 1992). Se cree que el corión es el sitio donde estas bacterias radican ya que es una estructura alveolar expuesta al medio, con amplias superficies ideales para ser colonizadas por bacterias. Se ha visto que al alimentar larvas de un crustáceo con nauplios de *Artemia* aumenta el número de larvas con daño en el epitelio intestinal debido a infección bacteriana (Burkhardt-Holm *et al.*, 1989)

Se ha encontrado que las especies de bacterias que colonizan los quistes pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Erwinia*, *Aeromonas* y *Vibrio* (Austin y Allen, 1982); además también se han identificado *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Streptococcus* y coryniformes (Igarashi *et al.*, 1989). Montoya (1992) únicamente señala a *Vibrio*

parahaemolyticus presente en el cultivo de *Artemia*, pero apunta que este tipo de cultivo es un vector importante de bacterias patógenas. Las especies citadas en la literatura se anotan en la tabla

4.

Especie	Gram	Autor
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	Montoya (1992)
<i>Aeromonas sp.</i>	-	Austin y Allen (1982)
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	"
<i>Vibrio sp.</i>	-	"
<i>Bacillus firmus</i>	+	"
<i>Bacillus sp.</i>	+	"
<i>Staphylococcus spp. (3)</i>	+	"
<i>Micrococcus spp. (3)</i>	+	"
<i>Erwinia herbicola</i>	+	"
<i>Vibrio sp.</i>	-	Igarashiet al. (1989)
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	"
<i>Moraxella sp.</i>	-	"
<i>Micrococcus sp.</i>	+	"
<i>Staphylococcus sp.</i>	+	"
<i>Streptococcus sp.</i>	+	"
<i>Bacillus sp.</i>	+	"
Coryneformes	+	"

Tabla 4. Especies de bacterias reportadas en quistes y nauplios de *Artemia*.

La información disponible en la literatura acerca del conteo total viable que se ha observado en quistes y nauplios en la literatura se presenta en la tabla 3.

Se ha identificado un aumento sensible en el número de bacterias en el agua de eclosión que ocurre al eclosionar los quistes, éste se estabiliza eventualmente y se mantiene constante hasta que los nauplios son suministrados como alimento a las 24-48 h. (Austin y Allen, 1982; Verdonck et al., 1991 y Dehasque et al., 1991).

Pocos son los estudios encaminados a disminuir la carga bacteriana en los quistes o en los

nauplios de *Artemia*. Algunos autores sólo reportan que lavar los nauplios con agua limpia, ya sea de mar o dulce, antes de darlos como alimento es suficiente (Austin y Allen, 1982; Rodríguez *et al.*, 1991). Dehasque, *et al* (1991) y Verdonck *et al.* (1991) señalan que este enjuague no tiene ningún efecto sobre la flora que se desarrolla en los nauplios y sólo sirve para diluir el agua circundante.

Cepa	Quistes	Q.Descap o Estéril	Nauplios	Agua de Eclosión	Autor
Sn.Fco.Bay, Calif. (EUA)	10^5	10^2	-	10^7	Austin (1982)
China	10^7	-	10^6-10^7	10^6	Igarashi (1989)
B.California (México)	-	-	-	10^6	Montoya (1992)
?	-	$<10^2-10^3$	10^6-10^7	10^6-10^8	Dehasque (1991)
Gran Lago Salado, Utah (EUA)	10^4	-	-	-	INVE (sin fecha)

Tabla 3. Número de bacterias reportadas en varias cepas de *Artemia* (por conteo total viable, UFC/g o ml).

En un trabajo de Igarashi *et al.* (1989) se emplea el ultrasonido para desprender y homogeneizar las muestras obteniendo mayores conteos de bacterias, los cuales aumentan de cinco a 11 veces más cuando se sonica a 50W durante 120 s. Velji y Albright (1986) también reportan que el empleo de ultrasonido aumenta considerablemente el conteo de bacterias en sedimento, algas y materia fecal, pero hay que hacer notar que en este trabajo hubo una fijación con formaldehído y defloculación con pirofosfato previa a la sonicación, y la cuantificación se realizó mediante microscopía de epifluorescencia (sonicaron a 100W por 30 s). Este tratamiento permitió tener un aumento de entre el doble y el quintuple en el número de bacterias.

Otro aspecto importante que es necesario tomar en cuenta, es la cepa (origen geográfico), de *Artemia* con la que se esté trabajando, ya que es probable que no todas las cepas contengan ni la misma carga bacteriana ni las mismas especies. A este aspecto, no se le ha dado la correcta importancia hasta ahora. También es probable que en la misma cepa pero cosechada y procesada por distintas empresas haya variaciones. Incluso puede haber diferencias dependiendo del área en

la que se recolecten. Por ejemplo, la parte sur del Gran Lago Salado en el estado de Utah, E.U.A. tiene grandes aporte de materia orgánica (H. Newman, comunicación personal). Aparte de esto, las compañías comercializadoras de quistes someten a diferentes procesos los quistes colectados.

El Gran Lago Salado provee el 90-95% de demanda de quistes a nivel mundial. Este lago tiene 100 millas de longitud por 45 de anchura y en él cosechan diez compañías desde 1976. La temporada de cosecha es de la segunda quincena de septiembre al 31 de marzo.

OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos:

1. Cuantificar la carga de bacterias presente de *Artemia franciscana*, de la cepa Gran Lago Salado (GSL), Utah EUA, en los quistes sin tratamiento y descapsulados
2. Cuantificar la carga de bacterias adheridas a los nauplios de *A. franciscana* cepa GSL eclosionados de quistes sin tratamiento y descapsulados.
3. Cuantificar la carga de bacterias en el agua de eclosión de nauplios de *A. franciscana* cepa GSL eclosionados de quistes sin tratamiento y descapsulados.
4. Estudiar el comportamiento de las bacterias a lo largo del proceso de eclosión de *A. franciscana*.
5. Identificar las cepas de bacterias aisladas en los experimentos anteriores.
6. Evaluar la resistencia de nauplios de *A. franciscana* a diferentes compuestos químicos.
7. Evaluar la capacidad de estos compuestos químicos para disminuir la carga de bacterias en nauplios de *A. franciscana*, sin afectar la viabilidad de éstos.
8. Evaluar la efectividad del ultrasonido, para desprender bacterias adheridas a quistes y nauplios que normalmente no son registradas.

MATERIALES Y METODOS

Ultrasonido

A lo largo de experimentos preliminares se comparó la remoción de bacterias de los nauplios mediante una agitación mecánica (Vortex) y empleando ultrasonido. Un número conocido de nauplios recién eclosionados se recolectaron en tubos para microcentrifuga de 1.5 ml de capacidad y se les añadió 1.0 ml de agua estéril. Se insertó el tubo en una celda con flujo continuo de agua, a la cual está conectada el emisor del ultrasonido (llamado cuerno); el tubo de microcentrifuga está separado un centímetro del emisor, directamente arriba de éste. Los nauplios se sometieron a dos minutos al ultrasonido (100-140W). Todas las veces que se empleó el ultrasonido para tratar nauplios o quistes se realizó la misma técnica aquí descrita. Para la agitación mecánica en vortex se tomaron nauplios de la misma forma que para el ultrasonido y se agitaron por cinco minutos. Se sembraron en medio Zobell y se cuantificó el conteo total viable. Esta comparación se suspendió cuando hubo suficientes datos que demostraron la efectividad del ultrasonido y el resto de los experimentos se realizaron únicamente con ultrasonido. Se empleó un Procesador Ultrasonico de alta intensidad (250W), marca Cole & Parmer 4710 con celda de flujo continuo integrada.

Para valorar si el ultrasonido tenía algún efecto sobre la viabilidad de las bacterias, se sometió un cultivo líquido de bacterias, de concentración conocida, a diferentes grados de potencia ultrasónica (0 como control, 50, 100, 140 y 200 W), para determinar como se afectaba el conteo total viable. Al igual que en todos los experimentos se sembró en medio Zobell tipo 2216E (según la fórmula de Oppenheimer y Zobell, 1952; ver apéndice I) y se incubó a 30°C.

Curva de crecimiento bacteriano en un ciclo de eclosión

Para este propósito, se eclosionaron quistes de *Artemia franciscana*, de la cepa Gran Lago

Salado (GSL), Utah EUA, comercializados por Frippak* sin tratamiento en condiciones estándar: estériles, hidratación por dos horas a 29°C +/-1°C, 35‰, con agitación continua (mediante un agitador de movimiento recíproco), iluminados y una densidad de 1 g/200ml. Se tomaron muestras del medio cada cuatro horas comenzando al inicio de la incubación de los quistes (hora cero), hasta que eclosionaron los nauplios (hora 24). Se hicieron diluciones seriales, 1.0 ml x 9.0 ml, o 0.1 ml x 9.9 ml en agua de mar esterilizada hasta alcanzar una concentración que permitiera contar entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC). Se sembró 0.1 ml, por duplicado, del agua en medio Zobell y en medio TCBS (específico para el género *Vibrio*, ver apéndice I), se incubaron a temperatura ambiente durante 48 h y se contaron las UFC (el medio TCBS se incubó a 37°C). Al mismo tiempo se tomaron muestras de quistes y/o nauplios para evaluar el porcentaje de eclosión.

Muestreo de quistes

Se tomaron muestras de quistes. se hidrataron en condiciones estándar. Un lote se descapsuló con hipoclorito de sodio según la fórmula de Sorgeloos *et al.*(1977 y 1986) descrita en los antecedentes. Se tomó una muestra (0.1 ml de quiste con una pipeta graduada que se adicionó a 0.9 ml de agua de mar estéril), se sonico a 140W durante 120 segundos. Al mismo tiempo se tomaron varias muestras más de 0.1 ml de la suspensión de quistes para contabilizar el número de quistes presentes en ese volumen. El análisis de los quistes se realizó por triplicado.

El número de quistes por muestra de 0.1 ml se evaluó de la siguiente manera: de los quistes hidratados y de los descapsulados se tomaron varias muestras (23 y 34 respectivamente) con la pipeta graduada, las cuales se diluyeron con 9.9 ml. Se tomaron 12 alícuotas de 0.1 ml y se contaron los quistes en microscopio estereoscópico. De las contabilizaciones se eliminaron el número mayor y el número menor para así obtener un conteo de sólo 10 submuestras. Se contaron los quistes presentes y se calculó la media y los valores máximo, mínimo y desviación estándar.

* FRIIPAK, FEEDS. SANOFI AQUACULTURE, 10 Rue Chaillot, F-75116 Paris, Francia.

Nauplios

Para todos los experimentos ambos tipos de quistes (sin tratamiento y descapsulados) se pusieron a eclosionar en condiciones estándar. A las 24 h se recolectaron los nauplios en una malla estéril de 120 μm de luz, se lavaron ligeramente con agua de mar estéril y se suspendieron en 100 ml de agua de mar estéril. Típicamente se tomaban 10 muestras de un ml, de la suspensión de nauplios. Una de éstas fue sonicada (140 W durante 120 s.) y las otras sirvieron para calcular el número de nauplios sonicados. Las muestras (0.1 ml) se sembraron con rastrillo de vidrio en medio Zobell y en TCBS.

Hubo varios experimentos previos realizados con el fin de encontrar el sistema de muestreo óptimo, se hicieron muestreos de quistes y nauplios con diversos sistemas, encontrándose los descritos arriba como los que mejor mantenían un muestreo constante en condiciones estériles.

De cada una de la muestras de un ml de agua con nauplios se tomaron alicuotas en las que se contaron los nauplios presentes con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se calculó por extrapolación el número de nauplios en la muestra original.

Agua de eclosión

También se muestreó el agua de mar estéril en la cual se eclosionaron los nauplios para ver la carga de bacterias que presentaba al final de dicha eclosión. Para esto, se sembró 0.1 ml del agua en medio Zobell y TCBS directamente o en diluciones seriales una vez que los nauplios fueron separados, se incubó y se contaron las colonias.

Resistencia de nauplios a diferentes compuestos químicos.

Se eclosionaron 2 g de quistes en condiciones estándar. A las 24 h se cosecharon los nauplios con una malla de 120 μm . Se lavaron ligeramente con agua de mar, se tomaron 50 nauplios en 10 ml y se pusieron en una caja de petri a la cual se le añadió 10 ml de una solución desinfectante de concentración conocida, preparada con agua de mar.

Cada cinco a 10 min. durante 45 a 120 min, se contaron los nauplios muertos. Se utilizó este periodo de 120 min, tiempo relativamente corto, ya que en la acuicultura normalmente se alimentan los nauplios de *Artemia* a las larvas de camarón lo más pronto posible a partir de que eclosionaron para evitar pérdidas en la calidad nutritiva. Estos experimentos se realizaron por triplicado con su respectivo control (agua de mar únicamente) en todos los casos. Se empleó material estéril para todos los experimentos. Las soluciones y las concentraciones empleadas aparecen en la tabla 5.

Compuesto químico	Concentración			Unidades
Formaldehido <i>i</i>	10.0	15.0	25.0	mg/l
Cloro (activo) <i>ii</i>	1.0	2.0	5.0	mg/l
Iodine <i>iii</i>	1.0	5.0	10.0	ml/l
Nitrofurazona <i>iv</i>	1.0	2.0	5.0	mg/l
Oxytetraciclina <i>v</i>	1.0	5.0	10.0	mg/l
Agua oxigenada <i>vi</i>	30.0	60.0	100.0	ml/l

Tabla 5. Soluciones desinfectantes y concentraciones empleadas. Presentación de los productos: *i* Formaldehido al 37% ;*ii* Hipoclorito de sodio, "Cloralax" con 6% cloro activo; *iii* Polymeric-iodine complex 10%; *iv* Furacin, Norwich Eaton, solución de 0.22g en 100 ml; *v* Terramicina, Pfizer, cápsulas de clorhidrato de oxitetraciclina, correspondiente a 500 mg de oxitetraciclina; *vi* Peróxido de hidrógeno al 51.0% .

Se eligieron estos agentes desinfectantes ya que su uso es común en la acuicultura del camarón.

Evaluación de diversos químicos para la desinfección de bacterias adheridas a nauplios.

Se eclosionaron nauplios de la misma forma que en el experimento anterior, pero en condiciones estériles. Se recolectaron en una malla y se lavaron levemente con agua de mar estéril. Posteriormente se sumergieron con la malla en la solución desinfectante de mayor concentración posible (que permitiera una sobrevivencia superior al 90%, tabla 6), por el tiempo óptimo resultante del experimento anterior.

Se lavaron bien con agua de mar estéril y se pusieron en 100 ml de agua de mar estéril. Se

tomó un mililitro de la suspensión de nauplios y se colectó en un recipiente de 1.5 ml de capacidad para someterlos a sonicación: 140W durante 120 s (al mismo tiempo se repitió la colecta en diez tubos para contabilizar los nauplios después). Se sembró 100µl del sonicado con rastrillo de vidrio en medio Zobell y en TCBS a las diluciones adecuadas. Se incubó y se contaron las UFC a las 24 y 48 h. Se realizó un control en todos los casos.

Desinfectante	Concentración	Tiempo de exposición(min)
Formaldhido	25 mg/l	5
Cloro	5 mg/l	20
Iodine	10 mg/l	30
Nitrofurazona	5 mg/l	30
Oxitetraciclina	10 mg/l	30
Agua oxigenada	60 ml/l	5

Tabla 6. Condiciones empleadas para la desinfección de nauplios.

Procesamiento de las cepas

Cada una de las colonias que presentó diferentes características macroscópicas y microscópicas se aislaron y purificaron hasta obtener cepas puras que se conservaron en refrigeración con aceite mineral estéril hasta su posterior identificación (no más de dos meses después). La purificación se realizó en medio de Agar Soya Tripticaseína (TSA) adicionado con 2.5% de NaCl (apéndice II). Sólo se identificaron cepas provenientes de nauplios sin tratamiento, nauplios de quistes descapsulados y agua de eclosi. A las cepas se les asignó como identificación una letra (N o Q) dependiendo si se aislaron de nauplios o de quistes, un número que depende del experimento del que provienen y otra letra final para distinguir las cepas.

Las cepas aisladas y purificadas en este medio se identificaron empleando el sistema *API Rapid NFT* (Analytab products) tomando en cuenta las recomendaciones de Lightner (1993). Las cepas que no dieron una identificación confiable con este sistema se les inoculó al sistema *API 20E*, teniendo así un mayor número de pruebas que pudieran ayudar en su identificación. El primer

sistema está diseñado para bacterias Gram negativas no fermentativas, de preferencia oxidasa positivas; mientras que el segundo para enterobacterias (oxidativas y oxidasa negativos).

Se realizaron pruebas independientes a los sistemas API, estas fueron: prueba de la motilidad, de la producción de catalasa, de la oxidasa, de Gram, del rojo de metilo, de Voges-Proskauer y de oxido fermentación. Estas pruebas se hicieron para apoyar la identificación de los sistemas API. Todas las pruebas se detallan en el apéndice II y se basaron en las recomendaciones de Mac Faddin (1990).

Se realizó una modificación a los sistemas de identificación empleados: el suero fisiológico en el cual se suspenden las bacterias para ser inoculadas a los pozos del sistema, se sustituyó por agua con NaCl, para aumentar la salinidad de 0.85% a 2.0%; según las recomendaciones la Dra. L. Mohney, (Reference Laboratory for Crustacean Pathogens, Univ. of Arizona; comunicación personal). De igual manera, a todas las pruebas independientes se les añadió NaCl al 2.5%.

Una vez obtenido el resultado de las pruebas bioquímicas contenidas en el sistema API y las realizadas por separado, se añadieron a una matriz de datos para determinar las correlaciones entre las cepas empleando el coeficiente de similitud de asociación simple; de acuerdo a Austin (1992). Este coeficiente mide la relación que existe entre pares de cepas, basándose en la cantidad de resultados (apareamientos) positivos y negativos que presentaron en común cada una de las parejas de cepas estudiadas y, además la cantidad de resultados diferentes. Un número de 1.00 significa total coincidencia de los resultados, mientras que cero es total diferencia. Mediante este sistema de análisis estadístico se pretendió establecer relaciones de las cepas estudiadas entre sí y con resultados de cepas conocidas obtenidos de la literatura, para obtener un valor mínimo aceptable que identifique una cepa como perteneciente a una especie.

RESULTADOS

Ultrasonido

En comparación con la separación tradicional de bacterias adheridas a objetos por medio de una agitación mecánica, el uso del ultrasonido permitió incrementar significativamente la cantidad de bacterias observables en las muestras (tabla 7).

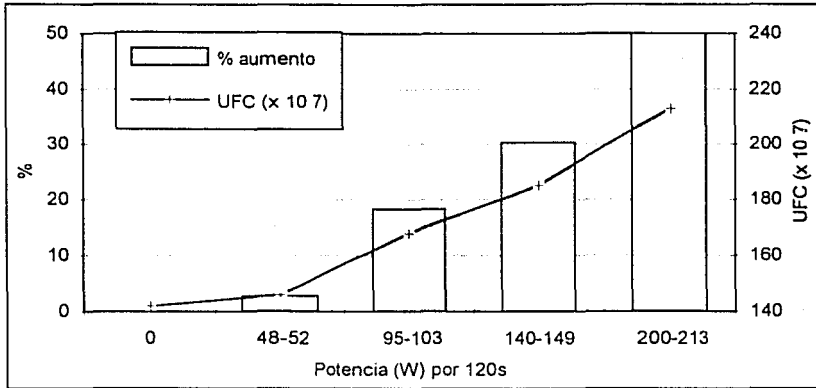
Agitación mecánica (UFC/ nauplios x 10 ⁷)	Ultrasonido (UFC/ nauplios x 10 ⁷)	Diferencia (x 10 ⁷)	Aumento
6.02	11.2	5.18	1.86
1.43	8.32	6.89	5.82
1.51	9.33	7.89	6.18
1.12	8.71	7.59	7.78
0.25	12.8	12.6	51.20

Tabla 7. Comparación del empleo del ultrasonido con una agitación mecánica para desprender bacterias de nauplios. El número de nauplios varía en cada experimento.

Los resultados demostraron un aumento en el número de bacterias detectables al emplear ultrasonido, que va de 1.86 veces a 51.52 veces el conteo total viable de bacterias. El uso del ultrasonido aumentó el valor de UFCs en 14.5 veces como promedio con respecto a una agitación vortex. Estos resultados son aún mayores que los reportados por Igarashi *et al.* (1989) que van de cinco a once veces más. También se encontró superioridad con los valores de incrementos presentados por Velji y Albright (1985), quienes reportaron incrementos de dos a cinco veces. Es necesario recordar que estos autores fijaron primero la muestra con formaldehído, luego le agregaron pirofosfato de sodio como defloculante, sonicaron y después contaron el número de bacterias por epifluorescencia. Se aprecia que aunque se empleó una técnica diferente a la usada en este trabajo, arrojó resultados similares.

Se comprobó también que el empleo de ultrasonido no afectó negativamente la viabilidad de las bacterias a alta energía (200W). El aumento de la energía ultrasónica va directamente

relacionado al aumento del conteo total viable (gráfica 1). El máximo aumento que se encontró fue de un 50% a 200 W de potencia.

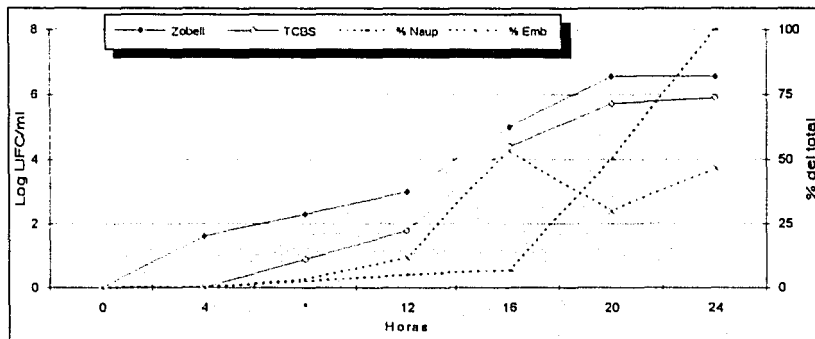


Gráfica 1. Efecto del ultrasonido en el conteo total viable de bacterias en suspensión.

Curva de crecimiento bacteriano en un ciclo de eclosión

El contenido de bacterias en el medio de eclosión de los quistes aumentó con el tiempo, para ambos tipos de medio de cultivo (Zobell y TCBS), comenzando alrededor de las cuatro horas de incubación cuando, ya se presentaba un número apreciable (gráfica 2). A partir de las 12 horas se nota un incremento pronunciado que tiende a estabilizarse después de las 20 horas en alrededor de 10^6 UFC/ml. Este incremento marcado coincide con la apertura generalizada de los quistes y la eclosión de los nauplios. La primera fase en la eclosión de los nauplios es la apertura del corión (fase E1), que se nota en la curva alrededor de la hora 12. La segunda fase, que es la eclosión del nauplio (fase E2), se presenta a partir de las 16 horas; cuando muchos de los embriones provenientes de la fase E1 se transforman a nauplios. A partir de esta hora, el número de embriones se estabiliza y el de nauplios crece, pero no hay un aumento en el número de bacterias más allá de la hora 20.

El agua en la que eclosionaron los quistes se muestreó previamente, obteniéndose cero crecimiento.



Gráfica 2. Curva de UFC en el agua de eclosión de *Artemia franciscana* de cepa Gran Lago Salado, Utah (marca Frippak). * no se tomaron datos.

Carga bacteriana en los quistes de *Artemia franciscana*.

El conteo total viable de bacterias para los quistes sin tratamiento presentó poca variación, como se puede observar en la tabla 7. En ninguno de los dos tipos de quistes, sin tratamiento y descapsulados, se obtuvo crecimiento en medio TCBS, específico para *Vibrio*.

Los quistes descapsulados, se comportaron de manera más variable (tabla 8). Como se puede apreciar, en el promedio se presenta un decremento comparados con los quistes sin tratamiento.

Quistes	UFC/g de quiste		
	Promedio	Máximo	Mínimo
Sin tratamiento	8.49×10^7	1.72×10^8	2.05×10^7
Descapsulados	1.8×10^7	3.6×10^7	7.93×10^5
UFC/quiste			
Sin tratamiento	411.12	830.71	99.01
Descapsulados	52.51	175.55	3.84

Tabla 8. Conteo total viable de bacterias en quistes de *Artemia franciscana* cepa Gran Lago Salado, Utah (marca Frippak).

El número de quistes en 0.1 ml de muestra, que fue la cantidad muestreada en cada experimento, se anota en la tabla 9.

Tipo de Quiste	Promedio	Máximo	Mínimo	Desviación Estándar	Porcentaje de error	Número de muestras
sin tratamiento	8,676	10,460	4,340	1,885.6	21.73	34
descapsulados	7,652	9,200	6,410	604.7	7.90	23

Tabla 9. Conteo de número de quistes en 0.1 ml de muestra.

El promedio se multiplicó por el número de muestras para obtener el número de quistes promedio por gramo y el número de muestras son todas las que se obtienen al hidratar un gramo de quiste.

Carga bacteriana en los Nauplios de Artemia franciscana.

Los nauplios provenientes de quistes sin tratamiento arrojaron un conteo total viable alto:

Medio	Bact./Nauplio		
	Promedio	Máximo	Mínimo
Zobell	289.69	1,258.62	10.04
TCBS (<i>Vibrio</i>)	3.70	17.12	0.10
	Bact./g de quiste		
Zobell	7.36×10^7	3.15×10^8	3.08×10^6
TCBS	8.19×10^5	4.28×10^6	1.92×10^4

Tabla 10. Estimaciones del conteo total viable de bacterias en nauplios provenientes de quistes sin tratamiento de *Artemia franciscana* cepa Gran Lago Salado, Utah (marca Frippak). Las bacterias que se obtienen al extrapolar los resultados a un gramo.

Para el caso de los nauplios provenientes de quistes descapsulados, el conteo total viable obtenido se presenta a continuación (tabla 11), en general es ligeramente inferior al de nauplios de quistes sin tratamiento.

El número de nauplios recién eclosionados presentes en 1.0 ml muestreado vario en cada experimento que se realizó. Se registró el porcentaje de eclosión (H%) de los nauplios para cada experimento con el fin de encontrar alguna relación, misma que no se obtuvo.

Medio	Bact./Nauplio		
	Promedio	Máximo	Mínimo
Zobell	157.84	389.16	9.21
TCBS (líbrico)	-	-	-
Bact./g de quiste			
Zobell	3.95×10^7	9.73×10^7	2.13×10^6
TCBS	-	-	-

Tabla 11. Estimaciones del conteo total viable de bacterias en nauplios provenientes de quistes descapsulados de *Artemia franciscana* cepa Gran Lago Salado, Utah (marca Frippak). Las bacterias que se obtienen al extrapolar los resultados a un gramo.

Carga bacteriana en el agua de eclosión de Artemia franciscana.

El medio en el que se eclosionan los quistes constituye un buen medio de cultivo para las bacterias presentes tanto en el corión del quiste como para las que se encuentran internas a éste. Los resultados de la cuantificación bacteriológica de los quistes sin tratamiento se presentan en la tabla 12. En general, se encontró una potencia más de UFC en medio Zobell con respecto al medio TCBS, salvo en quistes descapsulados en los que no se obtuvo crecimiento en TCBS.

Medio	UFC/ml		
	Promedio	Máximo	Mínimo
Zobell	2.40×10^7	4.72×10^7	4.69×10^6
TCBS	7.00×10^6	3.51×10^6	6.70×10^3

Tabla 12. Estimaciones del conteo total viable de bacterias en el agua de nauplios provenientes de quistes sin tratamiento de *Artemia franciscana* cepa Gran Lago Salado, Utah (marca Frippak).

Aún con quistes descapsulados, el agua de eclosión tiene un conteo bastante alto, como se puede apreciar en la tabla 13; en este caso el rango de variación fue superior al de agua de quistes sin tratamiento.

Medio	UFC/ml		
	Promedio	Máximo	Mínimo
Zobell	1.27×10^7	3.78×10^7	1.60×10^5
TCBS	-	-	-

Tabla 13. Estimaciones del conteo total viable de bacterias del agua de nauplios provenientes de quistes descapsulados de *Artemia franciscana* cepa Gran Lago Salado, Utah (marca Frippak)

Resistencia de nauplios a diferentes compuestos químicos.

El objetivo principal de este experimento fue el determinar la concentración y el tiempo de exposición óptimos a los cuales deben exponerse los nauplios para desinfectarlos sin dañarlos.

En las pruebas de resistencia no se observó mortalidad con isodine, nitrofurazona y oxitetraciclina, incluso 24 h después de concluido el experimento, por lo que se asumió que estos antibióticos no tenían ningún efecto perjudicial en los nauplios. Para estos fármacos, se estimó que la máxima concentración empleada durante media hora, era adecuada para intentar un lavado desinfectante sin afectar la viabilidad de los nauplios.

Para el formaldehído se determinó que una concentración de 25 mg/l por 5 min permitía una sobrevivencia del 98.00% (gráfica 3). Se apreció que los nauplios sometidos a las menores concentraciones (10 y 15 mg/l), se comportan de manera similar, disminuyendo su porcentaje de sobrevivencia lentamente. En cambio los de 25 mg/l presentan una mortalidad marcada a partir de los 40 minutos aproximadamente y sobreviviendo sólo un 30% hacia las dos horas de empezado el experimento.

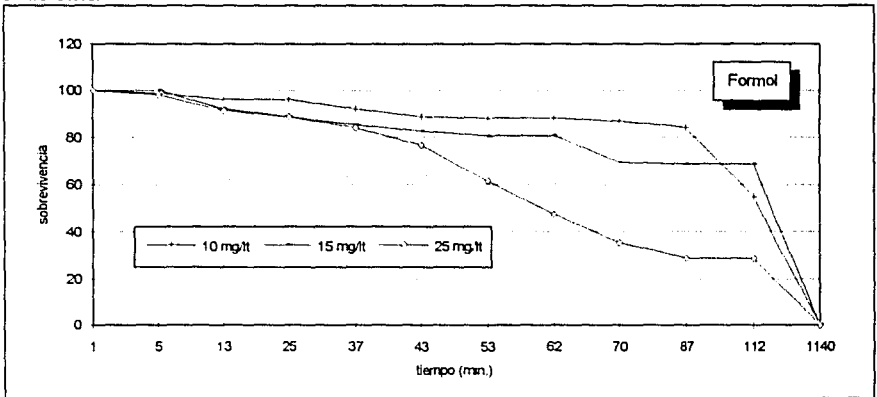
En el caso del cloro, 5 mg/l por 15 min dió una sobrevivencia de 99.33% (gráfica 4). Las tres concentraciones de cloro empleadas ocasionaron el 100% de mortalidad antes de las dos horas, pero se nota un drástico descenso en la de mayor concentración a partir de los 40 minutos hasta tener cero sobrevivencia a los 55 minutos. Las otras dos concentraciones empiezan a reducir la sobrevivencia de los nauplios a partir de los 50-60 minutos.

La gráfica del agua oxigenada permitió observar que a un 6% (60 ml/l) por 5 min se obtuvo 92.57% de sobrevivencia (gráfica 5). La concentración de 10 ml/l rápidamente ocasionó alta mortalidad, menos del 90% en los primeros cinco minutos y a los 90 minutos todos habían muerto. Las concentraciones menores permitieron una sobrevivencia sensiblemente mayor, ya que a los 100 minutos todavía se tenía una mortalidad menor al 50%.

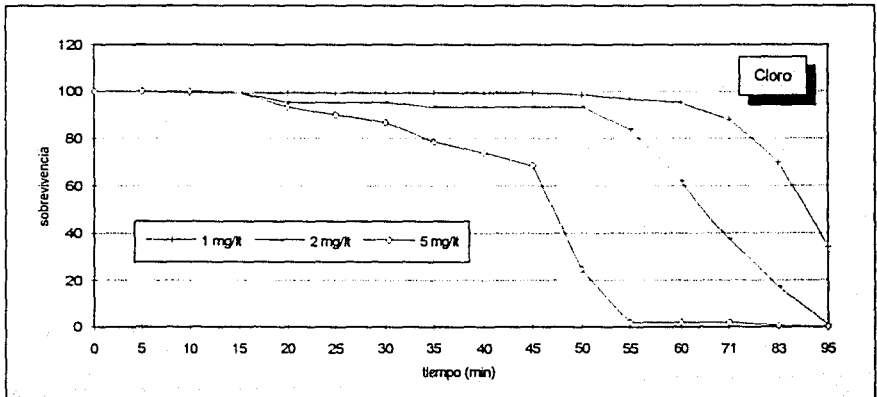
En ninguno de los lotes testigo hubo mortalidad, salvo en el de agua oxigenada que se presentó en dos de los tres controles (uno y tres nauplios muertos) en los primeros diez minutos.

del experimento: algo atribuible supuestamente al manejo inadecuado de los mismos.

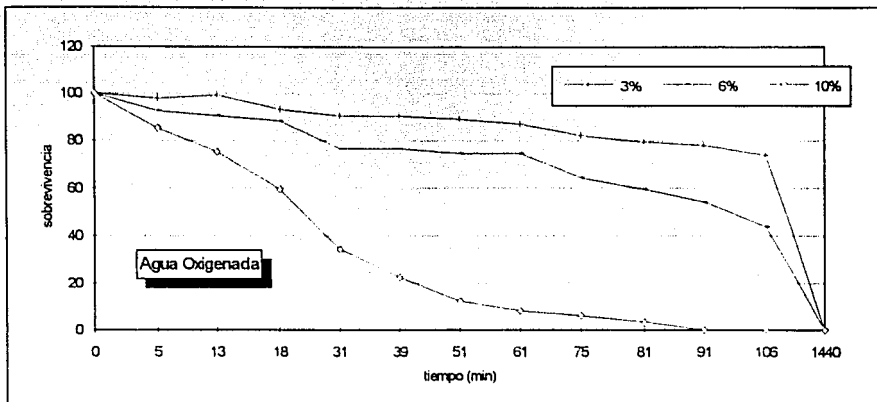
Usando las concentraciones y los tiempo de exposición encontrados aquí, se realizó el experimento que a continuación se describe para evaluar el grado de desinfección de estas soluciones.



Gráfica 3. Sobrevivencia de nauplios de *Artemia franciscana* a diferentes concentraciones de formaldehído.



Gráfica 4. Sobrevivencia de nauplios de *Artemia franciscana* a diferentes concentraciones de cloro activo.



Gráfica 5. Sobrevivencia de nauplios de *Artemia franciscana* a diferentes concentraciones de agua oxigenada.

Evaluación de diversos químicos para la desinfección de bacterias adheridas a nauplios.

Del experimento anterior se obtuvieron las concentraciones y los tiempos de exposición a los cuales someter los nauplios recién eclosionados, para intentar desinfectarlos sin causarles daños. Los resultados muestran que el cloro es el mejor químico para eliminar las bacterias que se encuentran adheridas a los nauplios (tablas 14 y 15, gráficas 6, 7 y 8), ya que se notó una reducción de 97.84% entre el control y los nauplios tratados para bacterias heterótrofas totales, y del 100% para bacterias crecidas en TCBS. En segundo lugar se puede colocar al formaldehído, que mostró también un valor muy alto (96.12%) para las de Zobell aunque menor para las de TCBS (68.19%); en tercer lugar se encuentra el agua oxigenada con 75.19% y 53.76% respectivamente. Los demás compuestos químicos lograron un porcentaje de reducción de bacterias inferior al 60%, siendo Iodine el de menor efectividad.

En las tablas que a continuación se muestran, se anota un máximo y un mínimo que corresponde a la variación que se encontró en la contabilización del número de nauplios.

Tabla 14. Reducción de bacterias empleando diferentes soluciones desinfectantes (medio Zobell).

Tratamiento		Concentración	UFC	Dil.	No. naup. n=5	Bact/Naup.	%reducción
C L O	Prom (Desv.Est.)				1,798 (228.84)	0.27	97.84
	Máx.	5 mg/l	48	10 ⁻¹	1,460	0.33	97.85
	Mín.	15 min			2,090	0.23	97.69
R O	Prom (Desv.Est.)				2,344(261.97)	12.37	-
	Máx.	0 (control)	29	10 ⁻³	2,710	14.22	-
	Mín.				2,040	10.70	-
F O R	Prom (Desv.Est.)				664 (78.69)	1.66	96.12
	Máx.	25 mg/l	110	10 ⁻¹	710	1.95	96.78
	Mín.	5 min			844	1.44	95.79
M O L	Prom (Desv.Est.)				676 (150.73)	42.75	-
	Máx.	0 (control)	289	10 ⁻²	477	60.59	-
	Mín.				844	34.24	-
F U R	Prom (Desv.Est.)				697.20 (73.67)	15.06	43.79
	Máx.	5 mg/l	105	10 ⁻²	616	17.05	49.60
	Mín.	30 min			768	13.67	37.74
A C IN	Prom (Desv.Est.)				694.20 (111.37)	26.79	-
	Máx.	0 (control)	186	10 ⁻²	550	33.82	-
	Mín.				847	21.96	-
TE RR A	Prom (Desv.Est.)				330.80 (81.71)	24.79	51.74
	Máx.	10 mg/l	82	10 ⁻²	199	41.21	55.71
	Mín.	30 min			410	20.00	37.58
MI CI NA	Prom (Desv.Est.)				790.40 (109.17)	51.37	-
	Máx.	0 (control)	406	10 ⁻²	615	66.02	-
	Mín.				899	45.16	-
I O D	Prom (Desv.Est.)				277 (43.69)	9.68	13.17
	Máx.	10 ml/l	268	10 ⁻¹	203	13.20	-0.67
	Mín.	30 min			316	8.48	15.51
I N	Prom (Desv.Est.)				718	11.14	-
	Máx.	0 (control)	80	10 ⁻²	610	13.11	-
	Mín.				790	10.04	-

Tabla 14. Reducción de bacterias empleando diferentes soluciones desinfectantes (medio Zobell).

Tratamiento		Concentración	UFC	Dil.	No. naup. n=5	Bact/Naup.	%reducción
A	Prom (Desv.Est.)				1,838 (228.63)	5.01	75.19
GUA	Máx.	60 ml/l	92	10^{-2}	1,610	5.38	77.46
	Mfn.	5 min			2,020	4.55	70.85
OXI	Prom (Desv.Est.)				1,983 (360.61)	20.17	-
GENA	Máx.	0 (control)	400	10^{-2}	1,676	23.87	-
DA	Mfn.				2,560	15.63	-

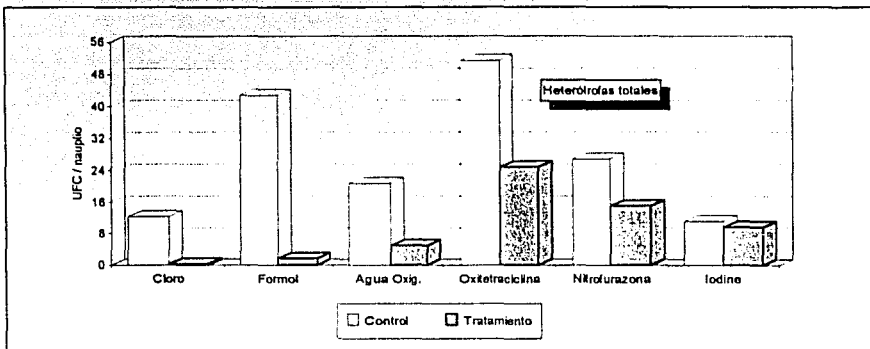
Tabla 15. Reducción de bacterias empleando diferentes soluciones desinfectantes (medio TCBS).

Tratamiento		Concentración	UFC	Dil.	No. naup. n=5	Bact/Naup.	%reducción
C	Prom (Desv.Est.)				1,798 (228.84)	0	100
L	Máx.	5 mg/l	0	10^{-1}	1,460	0	100
	Mfn.	15 min			2,090	0	100
R	Prom (Desv.Est.)				2,344(261.97)	4.10	-
O	Máx.	0 (control)	96	10^2	2,710	4.71	-
	Mfn.				2,040	3.54	-
F	Prom (Desv.Est.)				664 (78.69)	4.58	68.19
O	Máx.	25 mg/l	10	10^{-1}	710	4.65	73.52
	Mfn.	5 min			844	4.52	65.43
M	Prom (Desv.Est.)				676 (150.73)	5.07	-
O	Máx.	0 (control)	32	10^{-1}	477	5.22	-
	Mfn.				844	4.88	-
F	Prom (Desv.Est.)				697.20 (73.67)	1.41	30.80
U	Máx.	5 mg/l	98	10^{-1}	616	1.59	37.94
	Mfn.	30 min			768	1.28	23.35
A	Prom (Desv.Est.)				694.20 (111.37)	2.03	-
C	Máx.	0 (control)	141	10^{-1}	550	2.56	-
	Mfn.				847	1.66	-

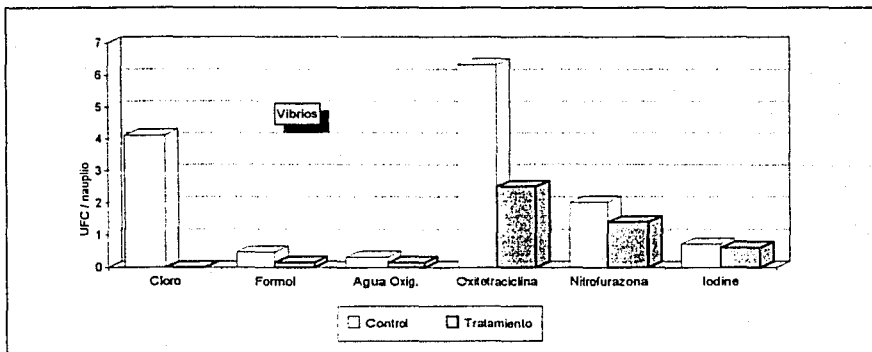
Tabla 15. Reducción de bacterias empleando diferentes soluciones desinfectantes (medio TCBS).

Tratamiento		Concentración	UFC	Dil.	No. naup. n=5	Bacu/Naup.	%reducción
TE	Prom (Desv.Est.)				330.80 (81.71)	2.51	60.34
RR	Máx.	10 mg/l	83	10 ⁻²	199	4.17	63.60
A	Mín.	30 min			410	2.02	48.70
Mi	Prom (Desv.Est.)				790.40 (109.17)	6.33	-
CI	Máx.	0 (control)	500	10 ⁻²	615	5.56	-
NA	Mín.				899	8.13	-
I	Prom (Desv.Est.)				277 (43.69)	0.61	15.26
O	Máx.	10 ml/l	17	10 ⁻¹	203	0.84	17.55
D	Mín.	30 min			316	0.65	1.76
i	Prom (Desv.Est.)				718	0.72	-
N	Máx.	0 (control)	52	10 ⁻¹	610	0.85	-
E	Mín.				790	0.65	-
A	Prom (Desv.Est.)				1,838 (228.63)	0.15	53.76
GUA	Máx.	60 ml/l	27	10 ⁻¹	1,610	0.16	57.99
	Mín.	5 min			2,020	0.13	45.69
OXI	Prom (Desv.Est.)				1,983 (360.61)	0.32	-
GENA	Máx.	0 (control)	63	10 ⁻¹	1,676	0.38	-
DA	Mín.				2,560	0.25	-

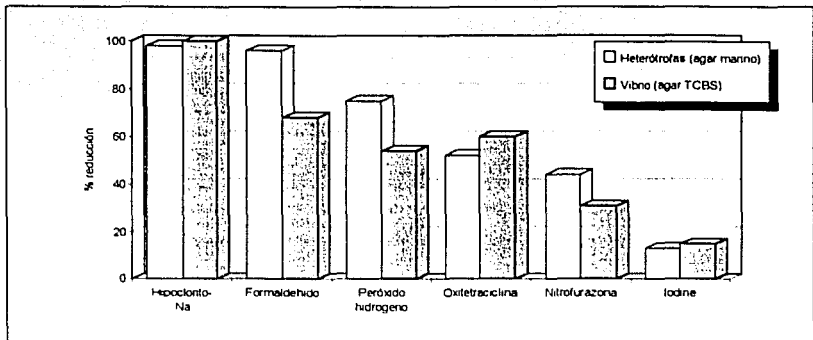
Se presentan en las gráficas 6 y 7 los promedios del conteo de UFC por nauplio obtenido en estos experimentos, donde se aprecia la variación que se dió entre experimentos. En la gráfica 8 se muestra el porcentaje de reducción de bacterias de cada una de las soluciones desinfectantes empleadas en los nauplios provenientes de quistes sin tratamiento.



Gráfica 6. Cuento de bacterias en nauplios tratados con diversas sustancias desinfectantes. Medio Zobell.



Gráfica 7. Cuento de bacterias en nauplios tratados con diversas sustancias desinfectantes. Medio TCBS.



Gráfica 8. Porcentaje de reducción de bacterias adheridas a nauplios de *Artemia franciscana* empleando diversos desinfectantes.

Identificación de las cepas

Debido a limitaciones económicas sería imposible identificar el total de las cepas de bacterias aisladas tanto de quistes como de nauplios. Se decidió trabajar exclusivamente con aquellas provenientes de nauplios eclosionados a partir de quistes sin tratamiento, de quistes descapsulados y del agua de eclosión de ambos tipos. Esta estrategia se justifica ya que es el nauplio el que se proporciona en los cultivos como alimento, y por lo tanto el vehículo central de la contaminación bacteriana, objeto del presente trabajo.

Cepas Gram negativas

En total se pudieron clasificar con los sistemas de identificación API, 15 cepas a nivel de especie y 5 a nivel de grupo, de un total de 24 (ver tabla 20). Diecinueve de las cepas aisladas son de nauplios provenientes de quistes sin tratamiento, 6 de éstas del agua de eclosión; cinco cepas se aislaron de nauplios de quistes descapsulados y de éstas, una sólo del agua de eclosión. Faltaron de identificar una cepa aislada de nauplios sin tratamiento y dos de descapsulados, todas de agua de eclosión, por ser imposible su purificación. Con esto se tendría un total de 27 cepas aisladas, de nauplios de *A.*

franciscana.

Los resultados de las pruebas a las que se sometieron las cepas aisladas, se presentan en las tablas 16 y 17, la primera tabla contiene los resultados empleando el sistema *API Rapid NPT* y la segunda del sistema *API 20E*. En estas tablas se presentan además los resultados de las pruebas que se realizaron independientemente. Las cepas que no se pudieron identificar con el primer sistema, se sometieron al segundo.

Con los datos obtenidos de las tablas 16 y 17, se calcularon índices de correlación, mediante asociación simple de las cepas obtenidas e identificadas con cada uno de los dos sistemas empleados. Estos cálculos se presentan en una matriz (tabla 18 y 19). A estas matrices se consideró oportuno añadir los perfiles de especies de bacterias de colección o referencia obtenidos en la literatura (proporcionada por el sistema *API*). Esto fue hecho con el fin de contrastar los resultados de la identificación con los resultados esperados de dichas cepas y obtener un valor mínimo de correlación que caracterice la relación entre cepas de la misma especie. Gracias a esto se pudo establecer un valor mínimo aceptable del índice de correlación de 0.74 (o 74%) para considerar que se trata de la misma especie, algo menor a lo propuesto por Austin (1992) de 0.80-0.85 (o 80-85%). Los valores obtenidos al correlacionar las cepas aisladas en este trabajo con los perfiles de especies de referencia (área sombreada en las tablas), no son equiparables a los resultados de la correlación únicamente entre cepas aisladas aquí (área no sombreada), ya que no se están correlacionando el mismo número de pruebas para ambos casos. Las cepas de este trabajo se sometieron a 30 y 31 pruebas, dependiendo del sistema de identificación, mientras que para las especie de referencia se anotaron entre 10 y 25 reacciones obtenidas de la literatura. Teniendo en cuenta esto, el valor mínimo aceptable, expresado anteriormente, para identificar una cepa como una determinada especie, sólo es válido para los valores de correlación que se encuentran en el área sombreada de las tablas 18 y 19.

Con los sistemas usados no se pudieron identificar cuatro cepas (N2A, N2AA,

N2AB y N2B). Pero si se emplea las tablas de correlación y los resultados de las pruebas, se puede sugerir la siguientes clasificación taxonómica para estas cepas:

Cepa	Clasificación probable	Índice de correlación	Sistema empleado
N2A	CDC gr. II F	0.83	API Rapid NFT
N2AA	<i>Pseudomonas</i> ?	0.67	API 20E
N2AB	<i>Pseudomonas</i>	1.00	API Rapid NFT
		0.77	API 20E
N2B	<i>P. stutzeri</i>	0.66	API rapid NFT
		(0.93 con N2P identif. como <i>P. stutzeri</i>)	

Cepas Gram positivas

Las bacterias Gram positivas no se identificaron a nivel especie, por que este tipo de bacterias no son de importancia patogénica en la acuicultura y, debido a esto, no se consideró justificable invertir en su identificación; sin embargo se anotan los siguientes datos:

De nauplios provenientes de quistes sin tratamiento, se aislaron cuatro cepas de cocos y una de bacilos enbebidos en una sustancia mucilaginoso. Todos los cocos fueron catalasa positivos, oxidasa negativos, lo que los coloca dentro de la familia Micrococcaceae. No se pudo establecer con seguridad si los bacilos eran Gram positivos. Es factible que estos bacilos sean del género *Bacillus* ya que se llegó a observar esporulación y producción de catalasa, lo que los diferenciaría de *Clostridium* y de *Corynebacterium*.

De nauplios de quistes descapsulados, se aisló una cepa de coccus y una de bacilos mucilaginosos. Lo discutido para las anteriores cepas es aplicable a estas.

TABLA 16. Resultado de pruebas realizadas a cepas bacterianas aisladas de nauplios de Artemia, mediante el sistema API Rapid NFT y otras pruebas.

CEPA	Pruebas independientes										Pruebas del sistema API Rapid NFT																					
	BAC	CBAC	COLOR	OF/F	OF/O	OXI	CAT	MOT	ROJO	VP	NO2	N2	TRP	ARG	URE	ESC	GEL	ONPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	FAC		
N2A	-	+		-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-		
N2AB	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	
N2AC	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2AD	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2AE*	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	
N2B	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	
N2C	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
N2G	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2I*	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
N2J*	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	
N2L*	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
N2M*	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	
N2O	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2P	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	
N2Q	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2S	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
N22*	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
N5F	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N5L	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
N5M	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N5O	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	
N5R*	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	
N7A	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas</i>							+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>P. peucinolens</i>		+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. vesicularis</i>		-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. aeruginosa</i>		-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. maltophilia</i>		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	
<i>P. stutzeri</i>		-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>P. luteole</i>		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	
CDC gr. II F		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Aeromonas</i>		-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium</i>		-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Vibrio</i>		+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ resultado positivo o presencia de; - resultado negativo o ausencia de; Area sombreada: datos obtenidos de la literatura.

BAC: bacilos; CBAC: cocabacilos; COLOR: amarillo, naranja o rojo; OF/F: fermentación de la glucosa; OF/O: oxidación de la glucosa; OXI: oxidas; CAT: catalasa; MOT: motilidad; ROJO: rojo de metilo; VP: Voges Proskauer; NO2: reducción de nitrato; N2: producción de nitrógeno; TRP: triptófano; ARG: arginina dihidrolasa; URE: ureasa; ESC: esculina; GEL: licuefacción de la gelatina; ONPG: beta galactosidasa; GLU: crecimiento en glucosa; ARA: crec. en arabinosa; MNE: crec. en manosa; MAN: crec. en manitol; NAG: crec. en N-acetil D-glucosamina; MAL: crec. en maltosa; GNT: crec. en D-gluconato; CAP: crec. en gluconato; ADI: crec. en adipato; MLT: crec. en malato; CIT: crec. en ácido cítrico; FAC: crec. en fenilacetato.

En CEPA, N2 y N7 son de nauplios provenientes de quistes en tratamiento y N5 de descapsulados. * cepas aisladas del agua de eclosión

TABLA 17. Resultado de las pruebas realizadas a cepas bacterianas aisladas de nauplios de Artemia, mediante el sistema API 20E y otras pruebas.

CEPA	Pruebas independientes								Pruebas del sistema API 20E																									
	BAC	CBAC	COLOR	OF/O	ROJO	OXI	CAT	MOT	MAC	NO2	N2	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SCR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA			
N2P	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
N2A	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2AA*	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
N2AB	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
N2AD	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2C	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2G	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2J*	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2L*	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
N2M*	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2Q	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N2Z*	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N5F	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N5M	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas</i>							+	+																										
<i>P. paucimobis</i>			+				+	+	+			+																						
<i>P. maltophilia</i>							-	+	+														+											
<i>P. stutzeri</i>							+	+	+																									
CDC gr. II F							-	-															-	+										
Flavobacterium			+	+		+	+	-	-														+	-	-									
<i>Bordetella bronchiseptica</i>			-	-		+	+	+								+																		
Vibrio		+	-	-		+	+	+																+										

+ resultado positivo o presencia de, - resultado negativo o ausencia de. Area sombreada: datos obtenidos de la literatura

BAC-bacilos, CBAC-cocobacilos, COLOR: amarillo, naranja o rojo OF/O oxidación de la glucosa, ROJO tipo de hemólisis, OXI-oxidasa, CAT-catalasa, MOT-motilidad, MAC-crecim. en agar Macconkey, NO2-reduc. del nitrato, N2-gas N2, ONPG-beta galactosidasa, ADH-arginina dihidrolasa, LDC-lisina descarboxilasa, ODC-ornitina descarboxilasa, CIT-crecim. en citrato, H2S-prod H2S, URE-ureasa, TDA-Inpropano deaminasa, IND-indol, VP-woges proskauer, GEL-liquefacción de la gelatina, GLU-crecim. en glucosa, MAN-crecim. en manitol, INO-crecim. en inositol, SCR-crecim. en sorbitol, RHA-crecim. en ramosa, SAC-crecim. en sucrosa, MEL-crecim. en melibiosa, AMY-crecim. en amigdalina, ARA-crecim. en arabinosa

En CEPA, N2 son de nauplios provenientes de quistes sin descapsular y N5 de descapsulados * son del agua de eclosión.

TABLA 18. Matriz de correlación (asociación simple) de las copas aisladas de nauplios de Artemia provenientes del grupo API Rapid NFT.

CEPA	N2A	N2AB	N2AC	N2AD	N2AE*	N2B	N2C	N2D	N2F*	N2L*	N2L*	N2M*	N2O	N2P	N2Q	N2S	N2Z*	N3F	N3L	N3M	N3O	N3P*	N3A	Pseudo	P.pavici	P.vesica	P.venigi	P.multo	P.ultzer	P.levinsii	CDC gr 1	Aeromon	Flavob	Vibrio			
N2A	1.00																																				
N2AB	0.30	1.00																																			
N2AC	0.51	0.32	1.00																																		
N2AD	0.67	0.11	0.43	1.00																																	
N2AE*	-0.02	0.43	0.41	-0.03	1.00																																
N2B	-0.08	0.23	0.12	-0.12	0.49	1.00																															
N2C	0.02	0.67	0.28	-0.10	0.66	0.31	1.00																														
N2D	0.44	0.40	0.74	0.09	0.42	0.18	0.29	1.00																													
N2F*	0.57	0.18	0.69	0.55	0.22	0.03	0.08	0.44	1.00																												
N2L*	0.17	0.64	0.53	-0.07	0.38	0.14	0.61	0.44	0.24	1.00																											
N2L*	0.58	0.20	0.53	0.55	0.24	0.14	0.10	0.25	0.69	0.25	1.00																										
N2M*	0.17	0.64	0.53	-0.07	0.52	0.14	0.48	0.63	0.24	0.70	0.25	1.00																									
N2O	0.67	0.21	0.30	0.85	-0.13	-0.05	-0.10	0.15	0.47	0.00	0.47	0.00	1.00																								
N2P	-0.04	0.26	0.00	-0.07	0.52	0.93	0.33	0.06	0.05	0.02	0.18	0.18	0.04	1.00																							
N2Q	0.31	0.56	0.56	0.02	0.52	0.19	0.42	0.61	0.27	0.45	0.28	0.78	0.08	0.25	1.00																						
N2S	0.17	0.78	0.37	-0.07	0.52	0.14	0.61	0.63	0.24	0.55	0.25	0.85	0.00	0.18	0.78	1.00																					
N2Z*	0.35	0.64	0.53	0.14	0.38	0.14	0.61	0.63	0.24	0.70	0.25	0.70	0.24	0.62	0.61	0.70	1.00																				
N3F	0.37	0.48	0.64	0.29	0.30	0.10	0.36	0.67	0.35	0.53	0.35	0.53	0.39	0.63	0.51	0.53	0.71	1.00																			
N3L	0.13	0.28	0.48	0.11	0.57	0.37	0.36	0.40	0.33	0.20	0.34	0.34	0.21	0.41	0.40	0.34	0.20	0.48	1.00																		
N3M	0.54	0.52	0.65	0.42	0.17	0.28	0.21	0.61	0.34	0.35	0.35	0.35	0.52	0.17	0.48	0.35	0.55	0.78	0.52	1.00																	
N3O	-0.04	0.61	0.29	-0.01	0.38	0.47	0.50	0.28	0.27	0.56	0.27	0.58	0.10	0.50	0.38	0.56	0.41	0.49	0.47	0.38	1.00																
N3R*	0.29	0.56	0.35	0.02	0.35	0.28	0.48	0.30	0.49	0.49	0.42	0.49	0.13	0.37	0.44	0.49	0.34	0.20	0.41	0.22	0.71	1.00															
N3A	0.67	0.22	0.54	0.61	0.06	0.00	0.11	0.52	0.63	0.25	0.63	0.25	0.75	0.06	0.39	0.25	0.44	0.67	0.40	0.61	0.26	0.30	1.00														
Pseudomonas	0.47	1.00	0.75	0.49	1.00	0.78	0.75	0.75	0.75	0.75	0.47	1.00	0.49	0.75	0.75	1.00	1.00	1.00	0.75	0.75	1.00	0.71	0.75	1.00													
Pseudomonas	0.30	0.27	0.64	0.08	0.89	0.30	0.63	0.56	0.65	0.40	0.84	0.67	-0.19	0.30	0.56	0.67	0.40	0.25	0.64	0.08	0.31	0.55	0.25	1.00	1.00												
Pseudomonas	0.56	0.41	1.00	0.52	0.58	0.58	0.00	0.77	0.82	0.41	0.68	0.82	0.52	0.58	0.58	0.58	0.56	0.77	0.82	0.77	0.49	0.43	0.77	1.00	1.00												
Pseudomonas	0.13	0.40	0.28	0.38	0.28	0.63	0.25	0.00	0.50	0.13	0.38	0.13	0.38	0.83	0.00	0.13	0.00	0.29	0.63	0.48	0.75	0.58	0.29	1.00	1.00	1.00											
Pseudomonas	0.44	0.54	0.52	0.24	0.55	-0.12	0.65	0.44	0.45	0.45	0.38	0.55	0.24	-0.02	0.38	0.64	0.45	0.52	0.78	0.35	0.44	0.53	0.44	1.00	0.87	0.85	0.31	1.00									
Pseudomonas	-0.04	0.39	0.02	-0.08	0.44	0.66	0.21	0.08	0.18	0.12	0.22	0.38	0.06	0.74	0.29	0.39	0.04	0.19	0.39	0.19	0.68	0.44	0.08	1.00	0.33	0.85	0.86	0.17	1.00								
Pseudomonas	0.10	0.48	0.21	nd	0.89	0.40	0.78	0.40	0.21	0.35	0.06	0.35	nd	0.48	0.56	0.48	0.48	0.40	0.40	0.22	0.45	0.38	0.32	1.00	0.60	0.08	0.15	0.47	0.45	1.00							
CDC gr. I F	0.83	0.70	0.60	0.78	0.17	0.25	0.25	0.44	0.43	0.34	0.80	0.34	0.78	0.25	0.44	0.34	0.70	0.83	0.52	1.00	0.43	0.37	0.83	1.00	0.03	0.75	0.48	0.45	0.23	0.38	1.00						
Aeromonas	0.18	0.53	0.53	0.28	0.62	0.28	0.53	0.37	0.72	0.44	0.28	0.44	0.28	0.28	0.37	0.44	0.44	0.37	0.62	0.37	0.50	0.82	0.37	0.67	0.56	0.35	0.51	0.65	0.56	0.60	0.22	1.00					
Flavobacterium	0.22	-0.09	0.50	0.50	0.42	0.32	-0.10	0.15	0.42	-0.09	0.43	0.17	0.26	0.27	0.01	-0.04	-0.09	0.01	0.37	0.15	-0.05	0.03	0.07	0.45	0.64	0.78	0.56	nd	0.18	-0.37	0.19	0.33	1.00				
Vibrio	0.53	0.41	0.53	0.41	0.25	0.00	-0.10	0.41	0.67	0.41	0.67	0.53	0.41	0.10	0.41	0.41	0.41	0.41	0.25	0.41	0.25	0.53	0.53	nd	0.55	nd	-0.32	0.45	0.09	0.25	nd	1.00	0.18	1.00			

Número en negritas denotan misma especie o muy similar, números enmarcados indican especie identificada mediante el sistema API Rapid-NFT nd - valor no determinable. Área sombreada comprende valores de correlación no equiparables con los del área no sombreada, ya que involucra un menor número de pruebas (ver tabla 16). En CEPA, N2 y N7con de nauplios provenientes de quistes sin tratamiento y N5 de quistes descapsulados. * son del agua de eclusión.

TABLA 19. Matriz de correlación (asociación simple) de las cepas aisladas de nauplios de Artemia provenientes del grupo API 20E.

	N2P	N2A	N2AA*	N2AB	N2AD	N2C	N2G	N2J*	N2L*	N2M*	N2Q	N2Z*	N5F	N5M	Pseudo	P. pauci	P. maltop	P. stutzeri	CDC gr II	Flavobac	Bordetel	Vibrio	
N2P	1.00																						
N2A	0.21	1.00																					
N2AA*	0.16	0.05	1.00																				
N2AB	0.56	0.28	-0.14	1.00																			
N2AD	-0.10	0.63	0.08	0.13	1.00																		
N2C	0.34	0.25	0.14	0.39	0.01	1.00																	
N2G	0.21	0.35	-0.01	0.71	0.30	0.35	1.00																
N2J*	0.34	0.25	0.14	0.60	0.01	0.52	0.62	1.00															
N2L*	0.16	0.45	-0.01	0.39	0.46	0.34	0.43	0.34	1.00														
N2M*	0.54	0.25	0.14	0.60	0.01	0.28	0.62	0.76	0.34	1.00													
N2Q	0.34	0.44	-0.06	0.81	0.23	0.52	0.88	0.76	0.54	0.76	1.00												
N2Z*	0.43	0.35	-0.01	0.71	0.05	0.35	0.71	0.88	0.43	0.88	0.88	1.00											
N5F	0.37	0.43	0.11	0.44	0.31	0.60	0.48	0.38	0.62	0.38	0.60	0.48	1.00										
N5M	0.32	0.39	-0.08	0.51	0.38	0.54	0.54	0.45	0.64	0.45	0.67	0.54	1.00	1.00									
<i>Pseudomonas</i>	0.77	0.63	0.67	0.77	0.40	0.67	0.67	1.00	0.77	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00								
<i>P. pseudomobilia</i>	0.37	0.56	0.46	0.57	0.37	0.24	0.48	0.84	0.57	0.84	0.88	0.84	0.48	0.48	1.00	1.00							
<i>P. maltophila</i>	0.33	0.64	0.32	0.72	0.60	0.79	0.79	0.79	0.84	0.60	1.00	0.79	0.84	0.84	1.00	0.78	1.00						
<i>P. stutzeri</i>	0.84	0.40	0.60	0.48	0.32	0.54	0.32	0.50	0.48	0.84	0.60	0.60	0.60	0.60	1.00	0.78	0.79	1.00					
CDC gr. II F	-0.12	0.40	-0.10	0.40	1.00	0.46	0.69	-0.09	0.55	-0.07	0.55	-0.07	0.46	0.55	nd	-0.10	0.68	dn	1.00				
<i>Flavobacterium</i>	0.45	0.55	0.45	0.39	0.72	0.39	0.57	0.18	0.58	0.39	0.39	0.18	0.55	0.47	0.85	0.58	0.58	0.77	0.68	1.00			
<i>B. bronchiseptica</i>	0.53	0.46	0.33	0.33	0.41	0.28	0.28	0.41	0.53	0.70	0.51	0.51	0.70	0.70	nd	nd	0.79	1.00	nd	0.58	1.00		
<i>Vibrio</i>	0.17	0.42	0.58	0.27	0.43	0.08	0.33	0.48	0.27	0.61	0.48	0.48	0.27	0.47	0.76	0.54	0.62	0.80	nd	0.21	0.69	1.00	
CEPA	N2P	N2A	N2AA*	N2AB	N2AD	N2C	N2G	N2J*	N2L*	N2M*	N2Q	N2Z*	N5F	N5M	Pseudo	P. pauci	P. maltop	P. stutzeri	CDC gr II	Flavobac	Bordetel	Vibrio	

Números en negritas denotan misma especie o muy similar, números enmarcados indican especie identificada mediante el sistema API 20E. nd - valor no determinable.

Área sombreada comprende valores de correlación no equiparables con los del área no sombreada, ya que involucra un menor número de pruebas (ver tabla 17).

En CEPA, N2 y N7 son de nauplios provenientes de quistes sin tratamiento y N5 de quistes descapsulados. * son del agua de eclosión.

Tabla 20. Cepas identificadas mediante los sistemas API.

API Rapid NFT				API 20E			
CEPA	Taxa	Reacciones opuestas a lo observado **	Observaciones	CEPA	Taxa	Reacciones opuestas a lo observado **	Observaciones
N2A				N2A			
N2AB				N2AB			
N2AC	<i>P. vesicularis</i>	GLU 15%	(GLU débil)	N2AD	CDC gr II F	OXI 99%	
N2AD	CDC gr. II F						
N2AE*	<i>P. paucimobis</i>	MAN 4%					
N2B				N2C			
N2C	<i>P. luteola</i>	MNE 99%, NAG 8%		N2G	<i>P. maltophilia</i>	CIT 93.3%	
N2G							
N2I*	<i>Pseudomonas vesicularis</i>			N2J*	<i>P. paucimobis</i>	VP 31%, OF/O 95%	
N2J*				N2L*	<i>P. maltophilia</i>	AMY 1.1%	
N2M*				N2M*	<i>Agrobacterium radiobacter</i>		
N2O	CDC gr. II F	Color amarillo pálido	Color blanco	N2P	<i>P. stutzeri</i>	MEL 5.6%, ARA 1.9%	
N2P	<i>P. stutzeri</i>	ADI 2% CIT 84%		N2Q	<i>P. maltophilia</i>	CIT 93.3%	
N2Q							
N2S	CDC gr. II K	ARA 88% MNE 75%	= <i>P. paucimobis</i>	N2Z*	<i>P. paucimobis</i>	OF/O 95.5%	
N2Z*				N5F	<i>Bordetella bronchiseptica</i>		
N5F							
N5L	<i>P. maltophilia</i>	OXI 4%		N5M	<i>P. maltophilia</i>		o CDC gr. II F si MOT es Neg.
N5M	CDC gr. II F						
N5O	<i>P. aeruginosa</i>	MAL 2% CAP 96%	Esculina débil				
N5R*	<i>Aeromonas salmonicida</i>						
N7A	CDC gr. II F	Color amarillo pálido	Bianca	N2AA*			

En CEPA, N2 son de nauplios provenientes de quistes sin descapsular y N5 de descapsulados * son del agua de eclosión

CDC gr II F, es un grupo cercano a *Flavobacterium* aún no bien estudiado

** Son reacciones contrarias a lo que se observó en las cepas identificadas y el porcentaje de que ocurran. Contrastar con las tablas 16 y 17.

DISCUSION

Ultrasonido

El primer problema práctico a resolver en esta investigación fue la metodología a emplear para la cuantificación de las bacterias adheridas a las superficies de quistes y de nauplios de *Artemia*. La técnica tradicional de agitación intensa usada por Austin y Allen (1982) es probablemente ineficiente para la separación de estas bacterias y la dificultad de remover éstas aún con repetidos enjuages ha sido mencionado como la razón de que los nauplios de *Artemia* actúan como vector de enfermedades patógenas a cultivos (Gilmour *et al.*, 1975; Wheeler *et al.*, 1979; Sorgeloos *et al.*, 1986; Igarashi *et al.*, 1989; Rodriguez *et al.*, 1991; Dehasque *et al.*, 1991; Montoya, 1992). Atendiendo a esta problemática, y tomando en cuenta que las bacterias pueden encontrarse agregadas o fuertemente adheridas a superficies, se resolvió ensayar con ultrasonido para tratar de desprenderlas. Si esto era posible, como lo fue, el segundo problema era evaluar si dicho tratamiento no causaba daños a las bacterias, a los nauplios o a los quistes. Claro que si se maceraban los nauplios o quistes esto permitiría "liberar" bacterias internas, lo cual sería benéfico. Estos dos temas se discuten a continuación.

El empleo de ultrasonido como un medio de remoción de las bacterias adheridas a quistes y nauplios provó ser de bastante utilidad ya que permitió elevar el conteo total viable en un 10% como promedio, algo muy similar e incluso superior a lo que se presenta en la literatura. A la potencia que se sonicó, los quistes descapsulados y los nauplios se maceraron casi totalmente liberando de esta forma las bacterias que pudieran encontrarse "atrapadas" en el interior de los quistes o bien colonizando las superficie tanto de quistes como de nauplios. En el caso de los quistes sin descapsular la potencia y el tiempo que se emplearon no lograron macerarlos, pero aún así se notó también un aumento en el conteo. Es posible que se obtuvieran resultados superiores a los reportados debido a que se empleó mayor potencia ultrasónica (140 a 200 W).

Una inquietud que se estudió, fue el efecto que podría tener el empleo de este

aparato en la viabilidad de las bacterias presentes. El experimento que se realizó permitió constatar que a la potencia empleada no sólo no afectó negativamente dicha viabilidad sino que incluso se observó un aumento en el conteo total viable. La relación entre potencia ultrasónica y conteo de bacterias es, claramente, directa.

Este resultado se atribuye a que el ultrasonido permite una disgregación de aquellas bacterias que se pudieran encontrar adheridas a superficies o aglomeradas entre sí de cierta forma. Velji y Albright (1985) sugieren que las bacterias se distribuyen en el agua de mar de una forma no aleatoria, ya que pueden estar asociadas a partículas, libres pero agregadas o libres pero sin una distribución al azar. El uso del ultrasonido tiene la ventaja adicional de homogenizar la distribución bacteriana en la muestra.

En el aparato empleado no se puede llegar más allá de 200-220 W, por lo que no se sabe hasta qué potencia se empezaría a afectar la viabilidad de las bacterias. Es muy probable también que el tiempo de exposición afecte, pero en este trabajo se decidió emplear un tiempo ya anteriormente reportado como apropiado (Igarashi *et al.*, 1989) y que fue suficiente para macerar completamente los nauplios.

Un inconveniente que se encontró en este aparato es que presenta una variación en la potencia que suministra, alrededor de 4 a 13 W. A mayor potencia aplicada mayor es la variación; esto puede explicar en parte la variación que se observó.

Debido a lo anteriormente expuesto se recomienda el uso del ultrasonido para evaluar mejor la carga bacteriana en partículas, organismos, etc. Quizá convenga emplear un aparato que permita una mayor precisión de la energía suministrada.

Carga bacteriana en el agua de eclosión de Artemia franciscana.

Como se puede apreciar en los resultados la carga bacteriana exclusivamente del agua en la cual se eclosionan los nauplios bajo condiciones similares a las utilizadas en cultivos comerciales, es bastante alta (2.4×10^7 UFC/ml), incluyendo los vibrios (7.0×10^6). Estos datos corresponden plenamente a los hallados en la literatura consultada que varía

de 10^6 a 10^8 (tabla 3), para nauplios provenientes de quistes sin descapsular.

Para el caso de los nauplios de quistes descapsulados, el agua después de 24 h también tiene un carga bacteriana sumamente alta (1.27×10^7), apenas menor que la de quistes sin tratamiento. Aunque no hubo crecimiento en medio TCBS.

Como se demuestra en este trabajo y en los realizados por otros autores, esta carga bacteriana es bastante alta, pero puede ser eliminada si se colectan los nauplios en una malla fina y se tira el agua de eclosión. Si se lavan perfectamente los nauplios y se elimina el agua que aún les quede adherida se puede reducir la carga bacteriana. Aún así, no se están eliminando todas las bacterias, sino que una buena cantidad queda firmemente pegada a éstos, como se señala anteriormente. Mediante este simple procedimiento se elimina una gran fuente de contaminación.

Carga bacteriana en los quistes de Artemia franciscana.

El número de bacterias encontradas en los quistes de la cepa de *A. franciscana* analizada, mostraron valores más altos que los reportados en la literatura especializada. Austin y Allen (1982) encontraron 2.3×10^5 UFC/g de quiste; dos potencias menos al promedio encontrado aquí. Según sus resultados reportan un densidad de población bacteriana menor a una bacteria por quiste, aquí se encontró 411 UFC/quiste. Por otro lado Dehasque *et al.* (1991) reportan entre 1.0×10^2 y 1.0×10^3 UFC/g, lo que son hasta cinco potencias menos. Hay que hacer notar que en ninguno de estos trabajos se empleo ultrasonido y la remoción de bacterias del quiste se realizó únicamente mediante agitación mecánica, quizá en esto estriba la diferencia encontrada.

En cuanto a los quistes descapsulados, Austin y Allen (*op. cit.*) reportan sólo 300 UFC/g, lo que ellos denominan como bastante estériles internamente, esto es alrededor de 100,000 veces menos que lo que se encontró en este trabajo para quistes que, por estos valores, ya no se podrían considerar como estériles. La diferencia encontrada nuevamente pueda ser debido al empleo del ultrasonido.

Es de notar que en ninguno de los casos experimentados se obtuvo crecimiento en medio TCBS, por lo que podría pensarse que no se encuentran bacterias del género *Vibrio* en los quistes de *A. franciscana*; aún enriqueciendo el agua sobrenadante de los quistes sonicados en agua peptonada alcalina, no se obtuvo crecimiento.

En el laboratorio en el que se trabajaron estos experimentos, se han aislado una gran variedad de vibrios de otras fuentes, empleando la misma metodología, por lo que la ausencia de éstos no es atribuible a la metodología usada.

Carga bacteriana en los Nauplios de Artemia franciscana.

En los nauplios se encontraron valores máximos de bacterias, hasta 3.15×10^8 UFC/g de quiste o 1258.6 UFC/nauplio, estos datos son superiores a los reportados en la literatura (hasta 10^7 UFC/g). Pero si se contrasta sólo el promedio de los datos obtenidos en esta tesis, los valores son equiparables (7.36×10^7 UFC/g). Esto es para nauplios provenientes de quistes no descapsulados y bacterias heterótrofas totales. En el caso de bacterias de TCBS, presumiblemente vibrios, los valores también son muy altos, alrededor de dos potencias menos (10^4 a 10^6); sin embargo, son un poco superiores a los encontrados pero no sensiblemente como sería de esperarse por el empleo del ultrasonido. Esto se puede explicar si se considera que en el trabajo de Igarashi (1989) también empleó ultrasonido.

En cuanto a los nauplios provenientes de quistes descapsulados, la reducción bacteriana no fue como se esperaba (hasta 9.73×10^7 UFC/g), ya que se realiza un tratamiento fuertemente desinfectante, la descapsulación con cloro. Esto implica que existen bacterias internas al corión, que al momento de eclosionar el nauplio son liberadas al medio circundante y se reproducen libremente. No se había reportado en la literatura este hecho, aunque si la presencia de bacterias en quistes descapsulados (Dehasque, 1991). En todos los casos se realizaron controles para asegurar la esterilidad de los procedimientos, por lo que no hay motivo para creer en una posible contaminación.

A pesar de reportes en los que se sugiere que el descapsular los quistes de *Artemia* con cloro se logra su desinfección (Sorgeloos *et al.*, 1977), en este trabajo se demuestra que aún después de la descapsulación, los niveles de bacterias son considerablemente altos (10⁷). Otra ventaja reportada de la descapsulación es que se mejora el porcentaje de eclosión (Sorgeloos *et al.*, 1986), pero de acuerdo a lo publicado por Spotte y Anderson (1989), esto no siempre se cumple. Tomando en cuenta estos dos puntos, al parecer, la descapsulación es un proceso poco práctico y, que por el contrario, puede acarrear mayores problemas (p.ej. daño a los embriones, menor eclosión, cloro que hay que deshechar, dificultad para separar quistes de nauplios, presencia de la membrana embrionica, etc.). Debido a las características del experimento, condiciones estériles en las cuales la única fuente de contaminación bacteriana eran los quistes, se puede concluir que las bacterias registradas en los nauplios de quistes descapsulados provinieron ya sea del corión o internas a éste, del embrión o alguna membrana interna; o de ambos. Estas bacterias están firmemente adheridas a la superficie del nauplio, ya que es muy difícil eliminarlas con sólo un enjuague (Dehasque, *et al.* 1991 y Verdonck *et al.*, 1991).

Es necesario indicar que en los quistes, nauplios y agua (ver más adelante), de descapsulados no se obtuvo crecimiento en medio TCBS, lo cual podría hacer pensar que las bacterias del género *Vibrio* se encuentran solamente presentes en el corión del quiste, que es la estructura que se elimina con el cloro. Es conveniente recalcar, una vez más, que la técnica para obtener vibrios ha sido comprobada, dando buenos resultados.

Curva de crecimiento bacteriano en un ciclo de eclosión

La curva del incremento de bacterias a lo largo de un periodo de eclosión de quistes de *A. franciscana* resultó muy semejante a los valores reportados en la literatura, aunque en ninguno de ellos se presenta un análisis tan detallado. Se menciona por diversos autores que el aumento en la carga bacteriana está relacionado con la eclosión (Austin y Allen, 1981; Verdonck *et al.*, 1991 y Dehasque *et al.*, 1991). En el trabajo de Dehasque

(1991) se muestrea a las 0, 7, 20 y 24 horas de incubación y se anota un incremento de 10^4 a 10^7 entre la hora 7 y la 20 en agar marino; esto coincide con el tiempo en el cual se presenta la eclosión. Sus resultados son muy similares a los reportados en este trabajo, y la gráfica 2 presenta un aumento considerable a partir de la hora 12 de muestro, pero es probable que este se haya iniciado un poco antes, ya que no se tienen datos para la hora 8.

Las curvas de bacterias crecidas en Zobell y en TCBS son muy semejantes, aunque al principio se notan un mayor número en las de Zobell (hora 4) y es hasta la hora 12 cuando se emparejan con un poco más de media potencia de diferencia, a favor de las heterótrofas totales. Esto indica que el número de bacterias crecidas en TCBS ocupa un gran porcentaje del total de bacterias.

Durante este estudio se contabilizó también a los embriones ya que, si las bacterias se encontraban en el interior del quiste, como lo sugiere los datos de los quistes y nauplios descapsulados, se iba a notar un aumento en el número de UFC cuando se rompiera el quiste y saliera el embrión* y no sólo hasta que emergiera el nauplio. En la gráfica esto se nota a partir de la hora 12 en la que el porcentaje de embriones empieza a ser alto, más que el de nauplios y a partir de ese momento se presenta un incremento considerable en el número de bacterias. A la hora 16 el número de embriones crece considerablemente y el de nauplios se mantiene más o menos constante; pero las UFC siguen aumentando dramáticamente. No es sino hasta la hora 20 en que el porcentaje de nauplios eclosionados supera al de embriones, en parte por que muchos de estos últimos se han convertido ya en nauplios; en esa hora la curva de UFC se estabiliza, concordando con lo reportado por los autores antes mencionados. Estos datos sugieren que los quistes al reventar y expulsar al embrión también están liberando una carga de bacterias que se encuentran en su interior; pero hay que recordar que también se libera glicerol, una fuente

* Por embrión se entiende la etapa desde que el quiste se rompe y el embrión empieza a emerger con todo y membrana cuticular externa, lo que se conoce como etapa E-1 o *breaking*. También se incluye la etapa E-2 que comprende cuando el embrión, envuelto en su membrana, sale completamente del quiste. Cuando el nauplio rompe la membrana es cuando ya se considera que ha eclosionado.

de carbono útil para algunas bacterias y quizá este producto esté favoreciendo el crecimiento de bacterias. Se nota en la gráfica, que la eclosión de los nauplios (fase E2) no influye en el aporte de bacterias a agua circundante, sino que es la ruptura del quiste y la liberación del embrión (fase E1) los responsables.

Estudiando los datos obtenidos en el conteo de quistes, de nauplios y los de la curva de eclosión, se puede sugerir que el primer inóculo de bacterias al medio de eclosión es por las que se encuentran en el exterior del quiste y una vez que este se rompe hay un segundo inóculo de bacterias y nutrientes que hace aumentar marcadamente el número de UFCs.

Hay que destacar que el número de bacterias ya no aumenta después de la hora 20, que se ha llegado a un máximo alrededor de 10^6 y ahí se mantiene, aunque sigan eclosionando quistes. Esto se puede deber a que las bacterias hayan llegado a su fase de crecimiento estacionario porque los nutrientes se estén terminando o se acumulen productos inhibitorios.

Resistencia de nauplios a diferentes compuestos químicos.

Las diferentes sustancias que se emplearon para desinfectar los nauplios de *A. franciscana* arrojaron resultados diversos tanto en la eliminación de bacterias, como en la sobrevivencia de nauplios expuestos a ellas. Como era de esperarse los antibióticos, nitrofurazona y oxitetraciclina, al igual que el yodo, tuvieron un efecto nulo en la mortalidad de nauplios, aún después de 24 h. Esto implica que pueden lavarse los nauplios por un tiempo razonable y la única limitante sería el crecimiento de los mismos nauplios que no es deseado ya que empiezan a perder valor nutritivo al consumir sus reservas de vitelo. Los compuestos químicos formalina, cloro y agua oxigenada tuvieron un resultado muy distinto, como se aprecia en las gráficas 3, 4 y 5 respectivamente.

Se decidió emplear la nitrofurazona (Furacin, Norwich Eaton) ya que es un

fármaco ampliamente usado en el tratamiento de enfermedades bacterianas en la acuicultura (Williams y Lightner, 1988; Colorni y Paperna, 1983; Lightner, 1993), es bactericida, de amplio espectro y su toxicidad es baja (Colorni y Paperna, *op. cit.*), actúa por medio de la inhibición de la síntesis de proteínas. Además, los autores anteriormente señalados, observaron que este compuesto no es absorbido por el cuerpo de peces, ya que no lo detectaron ni en sangre ni en músculo. El medicamento del mismo nombre fabricado por laboratorios Columbia contiene nitrofurazol (0.2g en 100ml de excipiente c.b.p.).

La oxitetraciclina (terramicina, *pfizer*) es también bastante usada en la acuicultura, además que los vibrios son bastante sensitivos a este medicamento (Aquacop, 1977; Lightner, 1993; Chien, 1991). Algunos autores recomiendan usarlo en el alimento, ya que es más efectivo que disuelto en el agua de mar (Williams y Lightner, 1988). Este compuesto ya está aprobado para su uso en el cultivo de langosta, salmón y bagre por la *Food and Drug Administration*(FDA) de los Estados Unidos, como un tratamiento antibacteriano en animales acuáticos aptos para el consumo humano. Este antibiótico se acumula en músculo de camarones y es necesario esperar al menos 10 días para que se elimine completamente (Corliss, 1979). Incluso se ha reportado por Corliss *et al.* (1977) que el alimentar camarones jóvenes con oxitetraciclina a bajas concentraciones estimula o permite un mejor crecimiento y a altas suministra una defensa ante el ataque de *Vibrio*. Este antibiótico es bacteriostático, inhibe la síntesis de proteínas, en especial de la subunidad 30S ribosomal (Joklik *et al.*, 1980).

El yodo que se empleó fue suministrado por un laboratorio de producción larvaria que lo utiliza regularmente en una concentración de 1 ml/l (polymeric-iodine complex al 10%, pH 6.5-7.0) durante tres minutos. En este experimento se emplearon concentraciones mayores y por más tiempo, sin mostrar efectos negativos en la sobrevivencia de los nauplios.

El yodo es ampliamente utilizado para desinfectar la piel humana y en este campo es quizá el mejor agente, pero al hidrolizarse el I_2 y formar el ión I^- en una solución acuosa pierde su acción bactericida y el ión I_3^- , también presente en las soluciones acuosas, tiene una actividad mínima (Joklik *et al.*, 1980).

El cloro es un desinfectante tradicional para agua. El hipoclorito reacciona con el agua para formar ácido hipocloroso que es un poderoso agente oxidante en pH neutro o ácido.

Los nauplios a los 20 minutos de estar expuestos a una concentración de 5 mg/l tenían una sobrevivencia del 93.33%, misma que es aceptable. Se recomienda que una concentración de 0.6 a 1.0 mg/l de cloro libre por 30 segundos es suficiente para esterilizar (Joklik *et al., op. cit.*). Debido a esto, para evaluar su efectividad como desinfectante, se optó por someter a los nauplios a 15 minutos en la máxima concentración, ya que la sobrevivencia era de 99.33%. Se trató de tener la mínima mortalidad y la mayor concentración por el mayor tiempo.

El formaldehído es uno de los pocos químicos autorizados por la FDA para el tratamiento de infecciones (Williams y Lightner, 1988) y su uso en la acuicultura es muy extenso. El formaldehído, que es el compuesto activo de la formalina o formol (37% de formaldehído en agua), actúa sobre las proteínas alquilizándolas (Joklik *et al.*, 1980). Las concentraciones empleadas para esterilizar de manera efectiva son de 3 a 8%.

Castille y Lawrence (1986) emplearon formalina a 2.7 y 27 mg/l (37% solución acuosa) en nauplios de *Penaeus stylirostris* y encontraron mortalidad del 100% en la máxima concentración, pero cero en la más baja. En este experimento se empleó como concentración más baja 10 mg/l de formalina (o 27.03 mg/l de formaldehído) y la más alta de 25 mg/l (67.57 mg/l de formaldehído). Se empezó a tener mortalidades al primer registro, cinco minutos; así que se decidió emplear para la presente evaluación

microbiológica, la concentración más alta por cinco minutos ya que daba 98.0% de sobrevivencia de nauplios.

El agua oxigenada (H_2O_2) también se ha empleado como desinfectante de heridas y material quirúrgico, en lo que ha probado ser bastante efectivo, usado en una solución al 3%. En la acuicultura no se encontraron reportes de su uso, pero algunos laboratorios de producción larvaria han llegado a emplearla para tratar de desinfectar nauplios de *A. franciscana*, aunque de una manera errática. El peróxido de hidrógeno actúa de dos maneras; una es su actividad oxidativa y la otra, quizá la más efectiva es la formación de radicales libres de hidroxilo a partir del peróxido (Joklik *et al., op. cit.*).

En este experimento, una concentración de 6%, el doble de la recomendada, dió 92.57% de sobrevivencia, por 5 min.

Evaluación de diversos químicos para la desinfección de bacterias adheridas a nauplios.

La efectividad del proceso de desinfección varió mucho entre los tratamientos. Como se anota en la gráfica 8, el tratamiento que mejor resultado dió fue cloro (5 mg/l por 15 min) con el que se logró 90% de reducción de UFC; seguido muy de cerca por formaldehído. Los antibióticos empleados fueron de los compuestos que menos reducción reportaron, entre 35 y 60%. La oxitetraciclina a pesar de ser agente bacteriostático presentó un mejor resultados que la nitrofurazona que es bactericida de amplio espectro. Es probable que la diferencia estribe en las concentraciones usadas o en el tiempo de acción, que no sea el ideal para cada uno. El iodine definitivamente no es recomendable, ya que apenas eliminó un 17% de la carga bacteriana. Este compuesto se empleó en una concentración mucho superior a la comunmente usada en el laboratorio de producción larvaria.

La oxitetraciclina y la furazolidona, recientemente se emplearon para disminuir la

carga bacteriana en rotíferos (Minkoff *et al.*, 1993), se obtuvieron reducciones de hasta cuatro órdenes de magnitud de UFC/ml y además se cambió la población bacteriana, de vibrios predominantemente a *Pseudomonas*.

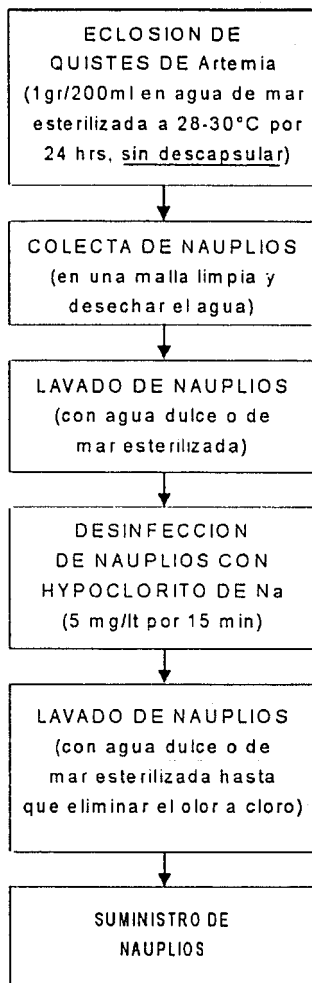
Un aspecto importante, que no se analizó en este trabajo, es la cantidad de desinfectante residual que queda en los nauplios tratados, ya que este puede afectar a las larvas de camarón o de alguna otra especie. Si se lavan los nauplios después de tratarlos, es necesario que sea con agua muy limpia, ya sea dulce o marina y de preferencia esterilizada.

Analizando los resultados que se obtuvieron en este trabajo, se propone el siguiente esquema de tratamiento de nauplios de *Artemia* para ser suministrados a larvas de camarones u otras especies de organismos.

Identificación de cepas

Como se puede apreciar en los resultados, no se obtuvo un gran número de cepas, 27 en total para los nauplios provenientes de ambos tipos de quistes y en el agua de eclosión. Era de esperar una mayor cantidad en nauplios de quistes sin tratamiento ya que, aparte de las que se encuentran en el interior del quistes, se suman todas las que están colonizando la superficie del quiste y los espacios alveolares. Este supuesto también es aplicable al agua de eclosión. Los nauplios de quistes descapsulados, al perder el corión, sólo aportaron cinco cepas, casi una cuarta parte de las del otro tipo de nauplios. Este número de cepas es muy inferior al reportado por Austin y Allen (1981) de 65. Se puso mucho énfasis en las observaciones de colonias macro y microscópicamente para tratar de eliminar las cepas repetidas.

Las cepas identificadas pertenecen en su gran mayoría al género *Pseudomonas* o grupos muy cercanos como el grupo CDC II F y *Aeromonas*, sólo dos son lejanas,



Agrobacterium radiobacter y *Bordetella branchioseptica*. De *Pseudomonas* se identificaron seis especies, una de *Aeromonas* y dos quedaron a nivel de género. Quizá lo más sobresaliente del trabajo de identificación de bacterias es que no se pudo identificar ningún *Vibrio*, a pesar de que ha sido uno de los géneros más reportados en este tipo de organismos (Verdonck, et al, 1991). Aunque *Pseudomonas* también ha sido abundantemente aislado (Igarashi, et al, 1989). En ninguno de los casos reportados en la literatura se ha identificado a nivel de especie alguna pseudomona y esto se puede generalizar a la mayoría de los géneros estudiados (ver tabla 4). El no encontrar cepas de *Vibrio* no necesariamente se contrapone a los resultados obtenidos en conteo en placa de TCBS, medio que favorece el crecimiento de este género, ya que algunos géneros pueden crecer en este medio aunque pobremente, según las anotaciones del productor (Difco Manual 10 Edic., Detroit Michigan). En este trabajo todas las colonias que crecieron en este medio tuvieron un desarrollo muy escaso y de color amarillo.

Si bien es conveniente que no haya vibrios en el alimento de organismos acuáticos, ya que estos actúan como patógenos potenciales, también se ha reportado que las pseudomonas causan infecciones (Lightner, 1993) de tipo secundario, es decir una vez que se presenta un debilitamiento del huésped, éstas pueden tornarse infecciosas.

La identificación se facilitó mucho al emplear los sistemas API, a pesar de que no están diseñados para bacterias marinas o ambientales, sino más bien para clínicas. Al agregar sal al medio (ver materiales y métodos), se permitió que crecieran adecuadamente las bacterias aisladas en este estudio. Pero fue necesario añadir más pruebas para poder asegurar los resultados y suplir las deficiencias en el diseño de los sistemas. Estos sistemas han sido muy empleados para identificar bacterias marinas (Verdonck, et al, 1991; Lightner, 1991, MacDonnel, 1982). Se notó que las cepas requerían más tiempo para lograr un crecimiento aceptable en estos sistemas que lo especificado por el productor. En general se requirieron 24 horas más de lo aconsejado, algo particularmente notable para el API 20E. Un problema que se empezó a detectar con una incubación tan prolongada fue el

crecimiento de hongos en algunos de los medios, por lo que la inoculación se debe realizar de manera muy aséptica. esto se resolvió teniendo mejor manejo de las cepas al inocular el sistema y registrando resultados tentativos antes. Los hongos generalmente aparecen después de 72 horas.

Muchas de las cepas identificadas tuvieron resultados en algunas de las pruebas poco comunes, pero esto se atribuye a que la mayoría de las cepas empleadas para realizar la base de datos de API son clínicas generalmente y al someter cepas provenientes de otros ambientes algunas de las reacciones bioquímicas son distintas. Las pruebas del sistema API son el resultado de reacciones obtenidas de un gran número de cepas pertenecientes a una misma especie, por lo que comúnmente hay variación en sus resultados. Así tenemos que existe un porcentaje de que esa prueba reaccione de cierta forma, en pocos casos todas las cepas presentan un 100% de concordancia. En este trabajo en ninguno de los casos analizados se encontró un resultado para una prueba 100% diferente con respecto al patrón, pero si algunos casos en los que había un 90% de probabilidad de que esa prueba reaccionara diferente; lo que quiere decir que hay un 10% de probabilidad de que cepas reaccionen como se encontró. La cepa que más reacciones poco probables presentó, sólo tuvo tres, la mayoría mostró dos o una, y cinco cepas se ajustaron totalmente a los límites establecidos por el sistema de identificación. Estos resultados muestran un grado de confiabilidad bastante alto, si se considera que las bacterias pueden tener cambios en sus rutas metabólicas con suma facilidad. Aunado a esto se contrastó los resultados con patrones para cepas de referencia en las tablas de correlación presentadas (matrices de correlación simple) y se vió que todas las cepas identificadas obtenían un porcentaje de correlación superior al 75% y en algunos casos del 100%, estos valores están muy cercanos al sugerido por Austin (1992) de 80-85%, por lo que para este análisis se puede considerar confiable. Incluso, gracias a esta correlación las cuatro cepas que no dieron una identificación con el API, se les pudo asignar una clasificación taxonómica coherente.

CONCLUSIONES

- El ultrasonido permitió un aumento en el conteo total viable de bacterias de 1.8 a 51.5 veces el conteo obtenido por agitación mecánica.
- El empleo del ultrasonido no afectó la viabilidad de las bacterias. En una suspensión bacteriana de concentración conocida, el aumento en la potencia ultrasónica permitió un mayor conteo de bacterias en forma directamente proporcional.
- En la curva de eclosión de *A. franciscana*, el primer inóculo de bacterias al medio de eclosión probablemente proviene del exterior del quiste; durante la ruptura del corión (fase E2) hay un segundo inóculo de bacterias y nutrientes que aumenta el conteo de bacterias sensiblemente. Eventualmente el número de bacterias se estabiliza independientemente de si siguen eclosionando nauplios.
- La carga de bacterias en los quistes analizados se puede considerar alta, 8.5×10^7 para quistes sin tratamiento y 1.8×10^7 para descapsulados. Estas cifras son mayores que las reportada hasta ahora. Esto se atribuye al empleo eficazmente del ultrasonido para remover bacterias adheridas a estos organismos.
- La carga bacteriana en nauplios es semejante a la encontrada en la literatura, aunque ligeramente superior; 7.36×10^7 para nauplios provenientes de quistes sin tratamiento y 3.95×10^7 para los de quistes descapsulados, ambos de medio Zobell. Para los que se obtuvieron en medio TCBS, sólo hubo crecimiento en nauplios de quistes sin tratamiento y dió 8.19×10^5 .
- Se supone, gracias a los resultados de nauplios y quistes descapsulados, que hay bacterias internas al corión y que, además no son eliminadas con la descapsulación.
- La descapsulación sirvió para eliminar bacterias que crecen en medio TCBS; ya que ni en quistes ni en nauplios, ambos provenientes de quistes descapsulados se obtuvo crecimiento en este medio.
- El agua en la cual se eclosionan los nauplios, al cabo de 24 horas, tiene una carga

bacteriana alta, tanto en medio Zobell como en TCBS, 2.40×10^7 y 7.0×10^6 respectivamente para nauplios provenientes de quistes sin tratamiento y 1.27×10^7 para nauplios de quistes descapsulados en medio Zobell; no se encontró crecimiento en medio TCBS para este último tipo de quistes.

- Los nauplios son resistentes a oxitetraciclina, nitrofurazona y yodine en las concentraciones de empleadas, pero no así al cloro, formaldehído y peróxido de hidrógeno, en donde se muestra una mortalidad directamente proporcional a la concentración y al tiempo de exposición.
- El cloro demostró ser el mejor agente desinfectante de nauplios recién eclosionados expuestos a 5 mg/l de cloro activo por 15 minutos, ya que redujo en un 97% las bacterias heterótrofas y en un 100% las sembradas en medio TCBS.
- Las cepas aisladas Gram negativas corresponden en su mayoría al género *Pseudomonas* o a grupos muy cercanos, todas no fermentativas. Se logró identificar 15 cepas a nivel de especie y 5 a nivel de grupo de un total de 24. Diecinueve cepas provinieron de nauplios sin tratamiento, 6 de éstas del agua de eclosión; 5 de nauplios de quistes descapsulados y de éstas, una sola del agua de eclosión. Se encontró dos tipos de Gram positivas, cocos y bacilos; aunque no se identificaron.
- No se identificaron cepas de *Vibrio*, aunque hubo crecimiento en medio TCBS, pero estas colonias eran de desarrollo pobre.
- Se demostró que los sistemas API 20E y API Rapid NFT son herramientas útiles para identificar bacterias halófilas, tomando en cuenta algunas modificaciones y añadiendo más pruebas.
- Como última conclusión, se puede mencionar que este trabajo mostró que los quistes y nauplios de *Artemia franciscana* poseen una gran cantidad de bacterias, que no fácilmente se eliminan y que pueden llegar a contaminar sistemas de cultivo muy sensibles a agentes patógenos. Se recomienda que los nauplios sean desinfectados con

cloro o formol inmediatamente después de eclosionados y no descapsular los quistes ya que, como se ha comentado, la descapsulación presenta varios inconvenientes.

LITERATURA CITADA

- Austin, B. y D.A. Allen, 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquacul.*26:369-383.
- Austin, B. y F. Priest, 1992. **Taxonomía Bacteriana Moderna**. Limusa, México D.F., 165 pp.
- Bengston, D.A., P. Léger y P. Sorgeloos, 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. En: Browne, R.A., P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman (eds.), **Artemia Biology**. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp.255-285.
- Berthélémy-Okazaki, N.J. y D. Hedgecock, 1987. Effect of enviromental factors on cyst formation in the brine shrimp *Artemia*. En: W. Declair, L. Moens, H. Slegers, E. Jaspers y P. Sorgeloos (eds.) **Artemia Research and Applications**. Vol. 3. Universa Press, Wetteren, Bélgica. pp.165-182.
- Brock, J.A. y B. LeaMaster. 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. En: J. Wyban (ed.) **Proceedings of the special session on shrimp farming**. World Aquacul. Soc., Baton Rouge, LA. pp.212-226.
- Burkhardt-Holm, P., R. Eckmann y V. Storch, 1989. Schädigung des Darmepithels von Coregonenlarven (*Coregonus fera*) durch *Artemia*-Fütterung: eine bakterielle Infektion. *J.Appl.Ichtyol.*1:2-11.
- Cabrera, J.A. J.y J.L.G. Calderón, 1986. Estado de la acuicultura en México al término de 1982. En: Bardach, J.E., J.H. Ryther y W.O. Mclearney, **Acuicultura, Crianza y Cultivo de Organismos Marinos y de Agua Dulce**. AGT Editor, México. (separata) pp.719-741
- Carpenter, N. 1992. Disease diagnosis and managment: an industry report. En: Wyban, J. (ed.) **Proceedings of the special session on shrimp farming** World Aquacul.Soc., Baton Rouge. 261-269.
- Castille, F.L. y A.L. Lawrence, 1988. The toxicity of erythromicin, minocycline, malachite green, and formalin to nauplii of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *J.World Aquacul.Soc.*17(1-4):13-18.

- Chen, S.N., S.L. Huang y G.H. Kou, 1992. Studies of the epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon*, in Taiwan. En: Fulks, W y Main, K.L. (eds.) **Proceedings of the workshop Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States**. The Oceanic Inst.:195-208.
- Chien, Y., 1991. La evolución de los laboratorios productores de camarón asiático *Penaeus monodon* en Taiwan. Memorias del Simposium Internacional sobre Laboratorios de Producción de Postlarvas de Camarón, Secretaría de Pesca, Mazatlán, Sin. México. 5-7 Dic., 1991. pp 10-21.
- Cifuentes, J.L., P. Torres-García y M.M. Frias, 1990. **El Océano y sus Recursos**. Fondo de Cultura Económica, México D F. 171 pp.
- Clegg, J.S., 1984. Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia* cysts. XI. Density measurements. *Cell.Biophys.*6:153.
- Colorní, A. y I. Paperna, 1983. Evaluation of nitrofurazone baths in the treatment of bacterial infections of *Sparus aurata* and *Oreochromis mossambicus*. *Aquacul.*35:181-186.
- Corliss, J.P., D.V. Lightner y Z.P. Zein-Eldin, 1977. Some effects of oral doses of oxitetracycline on growth, survival and disease in *Penaeus aztecus*. *Aquacul.*11:355-362.
- Corliss, J.P., 1979. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquacul.*16:1-6.
- Crowe, J.H., L.M. Crowe, L. Drinkwater y W.B. Busa, 1987. Intracellular pH and anhydrobiosis in *Artemia* cysts. En: W. Decler, L. Moens, H. Slegers, E. Jaspers y P. Sorgeloos (eds.) **Artemia Research and Applications**. Vol. 2. Universa Press, Wetteren, Bélgica. pp.19-40.
- Dehasque, M., L. Verdonck, P. Sorgeloos, J. Swings, P. Lèger y K. Kersters, 1991. En: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (eds.) **Larvi '91- fish & crustacean larviculture symposium**. European Aquacul.Soc., Spl.Publ.15, Ghent, Bélgica. pp.399-401.
- Dempsey, A.C., C.L. Kitting y R.A. Rosson, 1985. Bacterial variability among individual penaeid

- shrimp digestive tracts.
- Dempsey, A.C. y C.L. Kitting, 1987. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana* **52**(1):90-94.
- Drinkwater, L.E. y J.S. Clegg, 1991. Experimental biology of cyst diapause. En: Browne, R.A., P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman (eds.), *Artemia Biology*. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp.94-117.
- Getchell, R.G., 1989. Bacterial shell disease in crustaceans: a review. *J.Shellfish Res.* **8**(1):1-6.
- Gilmour, A., M.F. McCallum y M.C. Allan, 1975. Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from the canned eggs of the California Brine Shrimp (*Artemia salina*). *Aquacul.* **6**:221-231.
- Gámez, S.E. y G.E. de la Lanza, 1992. **Análisis del Estado de la Camaronicultura en México hasta el Año 1991.**
- Hugh, R. y E. Leifson, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J.Bacteriol.* **66**:24.
- Igarashi, M.A., H. Segugita y Y. Deguchi, 1989. Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**(11):2045.
- INVE, (sin fecha). Panfleto promocional de *artemia systems*, cepa Utah.
- Joklik, W.K., H.P. Willet y D.B. Amos, 1980. *Zinsser Microbiology*. Appleton-Century-Crofts, 17 edic., New York. 1539 pp.
- Kinne, O. 1980. **Diseases of Marine animals**. J.Wiley & Sons, New York. 466 pp.
- Kobayashi, T., S. Enomoto, R. Sakazaki y R. Kuwabara, 1963. A new selective isolation medium for the vibrio group (modified Nakanishi medium-TCBS agar). *Jap.J.Bacteriol.* **18**:387-392.
- Léger, P., D.A. Bengtson, K.L. Simpson y P. Sorgeloos, 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. En: Barnes, M. (ed.) *Oceanography and Marine Biology*. Ann.Rev. Vol. 24. Aberdeen Univ. Press, Escocia. pp.521-623.
- Léger, P., D.A. Bengtson, P. Sorgeloos, K.L. Simpson y A.D. Beck, 1987. The nutritional value of *Artemia* : a review. En: W. Declair, L. Moens, H. Slegers, E. Jaspers y P. Sorgeloos

- (eds.) **Artemia Research and Applications**. Vol. 3. Universa Press, Wetteren, Bélgica. pp.356-372.
- Lightner, D.V., 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. En: J.P. McVey (ed.) **Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture**. 2ª Edic. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp.289-320.
- MacCormack, W.M., W.E. Dewitt, P.E. Beiley, G.K. Morris, P. Sorharjono y E.J. Gangarosa, 1974. Evaluation of thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose agar, a selective medium for the isolation of *Vibrio cholera* and other pathogenic vibrios. *J.Infect.Dis.* 129:497-500.
- MacDonnel, M.T., F.L. Singleton y M.A. Hood. 1982. Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 44(2):423-427.
- Mac Faddin, J.F., 1990. **Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica**. Ed. Panamericana, México. 301 pp.
- MacLeod, R.A., 1965. The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriol.Rev.* 29(1):9-23.
- MacLeod, R.A. y E. Onofrey, 1956. Nutrition and metabolism of marine bacteria. II. Observations on the relation of sea water to the growth of marine bacteria. *J.Bacteriol.* 71:661-667.
- Minkoff, G., A.R. Blanch, M. Alsina y J.T. Jofre. 1993. Control of microflora associated with rotifers, *Brachionus plicatilis*. Abstract *Japanese-Israeli simposyum on aquaculture*. The Israeli J. Aquacul.-Bemidgheh 44(4):123-152.
- Montoya, L.R., 1992. **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 taxonómica**. Tesis de maestría, Inst.Cienc.del Mar y Limnol., UNAM. 89 pp.
- Oppenheimer, C.H. y C.E. Zobell, 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hidrostatic pressure. *J.Mar.Res.* 11:10-18.
- Patrick, F.M., 1978. The use of membrane filtration and marine agar 2216E to enumerate marine

- heterotrophic bacteria. *Aquacul.* **13**:369-372.
- Rodriguez, J.L., M. Planas y J.J. Otero, 1991. Microflora and antibacterial treatments of rotifers and *Artemia*. En: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (eds.) **Larvi '91- fish & crustacean larviculture symposium**. European Aquacul.Soc., Spl.Publ.15, Ghent, Bélgica. pp.403-405.
- Rohde, P.A., 1974. **Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos**. BBL, Becton, Dickinson de México, México 213 pp.
- Rosenberry, B., (ed.) 1992. **World Shrimp Farming, 1992**. *Aquacul.Digest*, San Diego, Cal. 45pp.
- Sano, T. y H. Fukuda, 1987. Principal microbial diseases of mariculture in Japan. *Aquacul.* **67**:59-69.
- Sakazaki, R. y A. Balows, 1981. The genera *Vibrio*, *Plesiomonas* y *Aeromonas*. En: Starr, M.P., H. Stolp, H.G Trüper, A. Balows y H.G. Schlegel (eds.). **The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria**. Springer Verlag, New York. Vol.I., pp. 1272-1301.
- Sindermann, C.J. y D.V. Lightner, 1988. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier, New York, NY. 431 pp.
- Slegers, H., 1991. Enzyme activities through development: a synthesis of the activities and control of the various enzymes as the embryo matures. En: Browne, R.A., P. Sorgeloos y C.N.A. Trotman (eds.), **Artemia Biology**. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 37-73.
- Sorgeloos, P., E. Bossuyt, E. Laviña, M. Baeza-Meza y G. Persoone, 1977. Decapsulation of *Artemia* cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquacul.* **12**:311-315.
- Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Léger, W. Tackaert y D. Versichele, 1986. **Manual for the Culture and Use of Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture**. State Univ. Ghent, Bélgica. 319 pp.
- Sorgeloos, P. y P. Léger, 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. *J.World Aquacul.Soc.* **23**(4):251-264.

- Spotte, S. y G. Anderson, 1989. Chemical decapsulation of *Artemia franciscana* resting cysts does not necessarily produce more nauplii. *J. World Aquacul. Soc.* **20**(3):127-133.
- Velji, M.I. y L.J. Albright, 1986. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. *Can. J. Microbiol.* **32**:121-126.
- Verdonck, L., M. Dehasque, J. Swings, P. Sorgeloos y P. Lèger, 1991. The microbial environment of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* production systems. En: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (eds.) **Larvi '91- fish & crustacean larviculture symposium**. European Aquacul. Soc., Spl. Publ. 15. Ghent, Bélgica. pp.398.
- Wheeler, R., A.I. Yudin y W.H. Clark Jr., 1979. Hatching events in the cysts of *Artemia salina*. *Aquacul.* **18**:59-67.
- Williams, R.R. y D.V. Lightner, 1988. Regulatory status of therapeutants for the penaeid shrimp culture in the United States. *J. World Aquacul. Soc.* **19**(4):188-196.
- Yasuda, K. y T. Kitao. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquacul.* **19**:229-234.
- Zobell, C.E., 1941. Studies on marine bacteria: I. The cultural requirements of heterotrophic species. *J. Mar. Res.*, **4**:42-75.

APENDICE I

Medios de cultivo empleados.

Agar Zobell o Marino tipo 2216E

Este tipo de agar, originalmente formulado por Zobell (1941) y posteriormente modificado por Oppenheimer y Zobell (1952) es el medio estándar de cultivo para bacterias heterótrofas marinas más usado en el mundo entero (Patrick, 1978). No se recomienda para identificar cepas.

Agar bacteriológico	15 g
Agua de mar añejada	750 ml
Agua destilada	250 ml
Bactopeptona o Polipeptona	5.0 g
Cloruro férrico (1.2g/l)	1.0 ml
Extracto de Levadura	1.0 g

Se debe ajustar el pH a 7.5 ± 0.1 antes de añadir el agar; esto se puede realizar usando NaOH o HCl. Se esteriliza a 121°C o 1 kg/cm^2 por 15 min.

Otras variaciones empleadas utilizan diferentes concentraciones de agua de mar (800 ml y 200 ml de agua destilada, se obtiene un salinidad de 28‰, también se pueden usar 800 ml de medio mineral que tiene una salinidad de 24.5‰ y 200 ml de agua destilada, para dar una salinidad final de 19.6‰), suponiendo que el agua de mar sea de 35‰. La salinidad que se debe emplear va a depender de la salinidad que tenga la muestra a analizar. De preferencia se usa agua de mar "natural", ya que se ha probado que el tipo artificial no resulta tan bueno como el natural (Zobell, 1942 y MacLeod y Onofrey, 1956).

El agua de mar añejada es agua de mar (35‰), filtrada a $0.45 \mu\text{m}$ y añejada en un garrafón negro durante dos a tres meses.

Este medio se puede comprar ya preparado: *Difco Marine Agar 2216*, o bien en caldo (sin agar).

Medio TCBS

Originalmente formulado por los laboratorios Eiken y modificado por Kobayashi *et al.* (1963). Este medio es altamente selectivo para las bacterias del género *Vibrio*, inhibe fuertemente la mayoría de las bacterias entéricas, *Pseudomonas* y otras Gram-negativas (Sakazaki y Balows, 1981). No se recomienda para identificar cepas bioquímicamente.

Agar	14.0 g
Agua destilada	1000 ml
Azul de bromotimol	0.04 g
Azul de timol	0.04 g
Bilis de buey	5.0 g
Citrato de hierro	1.0 g
Citrato de sodio	10.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Colato de sodio	3.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Polipeptona	10.0 g
Sacarosa o sucrosa	20.0 g
Tiosulfato de sodio	10.0 g

Se suspenden 86.0 g en un litro de agua destilada y se ajusta el pH a 8.6 ± 0.2 . Se deja remojar durante 10-15 min. y se calienta con agitación continua hasta que hierva. No se esteriliza en autoclave ya que este medio es altamente inhibitorio para bacterias aéreas. Se debe incubar la muestra a 35-37°C, pero se ha visto que crecen bien a 30°C.

Se puede conseguir en las siguientes marcas, Difco, bioxon y BBL. Aunque se ha visto que hay variación en los resultados cuando se utilizan diferentes marcas e incluso lotes (MacCormack, *et al.*, 1974); en este trabajo se empleó de la marca Difco.

Agar Soya Trypticaseína

El agar TSA es de uso general, para crecimiento de una gran variedad de bacterias, tanto de importancia clínica como ambiental. Para el caso de las bacterias marina o halofílicas es importante adicionarle 2.5% de NaCl. Se recomienda emplearlo para purificar e identificar cepas.

Peptona de caseína	15 g
Peptona de soya	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g

Se suspenden 40.0 g en un litro de agua destilada, debe dar un pH final de 7.3 ± 0.2 . Se le agregan 25 g de NaCl por litro. No es recomendable prepararlo con agua de mar, ya que los minerales presentes en ésta pueden interferir con las reacciones bioquímicas de identificación. Se esteriliza en autoclave a no más de 121°C por 15 minutos.

Se puede conseguir en las siguientes marcas, Difco, bioxon y BBL, en este estudio se empleó el Bioxon.

APENDICE II

Pruebas bioquímicas.

A las cepas puras, crecidas en agar TSA+2.5% NaCl, se les realizaron las siguientes pruebas:

Tinción de Gram.

Se hizo un frotis de la colonia deseada (de menos de 24 hrs) con suero salino (0.85%), se dejó secar y se fijó con metanol absoluto por 2 min. se enjuagó con agua destilada, luego se tiñó con cristal violeta por 45 segundos, se enjuagó y se le aplicó la solución de iodo por el mismo tiempo. La decolorización se realizó con acetona no más de 10 segundos y se enjuagó, por último se tiñó con safranina por 40 segundos y se volvió a lavar, se dejó secar y se observó al microscopio. Se emplearon como controles *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (gram neg.) y *Bacillus subtilis* (gram pos.); todos los enjuagues fueron con agua destilada.

Fórmulas de las soluciones empleadas (según Rohde, 1974):

Cristal violeta

Solución A:

Cristal violeta al 85%	20 g
Alcohol etílico al 95%	200 ml

Solución B:

Oxalato de amonio	8 g
Agua destilada	800 ml

Mezclar las soluciones A y B, y filtrarlas.

Solución de Iodo

Iodo resublimado	20 g
Sol. NaOH 1N (4g/100ml agua Dest.)	100 ml
Agua destilada	900 ml

Disolver el iodo en NaOH y luego agregar el agua.

Contratinte de Safranina

Agua destilada 90 ml

Solución A:

Safranina 3.4 g

Alcohol etílico 95% 100 ml

Agregar 10 ml de la solución A, al agua destilada.

Esta prueba es requerida que se haga antes identificar cualquier cepa. Se empleó el producto ya preparado por *Sigma* No. 541.

Prueba de la Oxidasa

La prueba de la oxidasa está basada en la producción de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. El sistema citocromo sólo se encuentra en los organismos aeróbicos o anaeróbicos facultativos (Mac Faddin, 1990).

Se empleó el sistema *Bactident Oxidase* de Diagnóstica MERCK 13 300, que es papel impregnado con N,N,-dimetil-1.4-fenilén diamonio dicloro 0.1 μmol ; 1-naftol 1.0 μmol .

Se aplica una asada de la colonia deseada sobre la zona de la tira que tiene el papel filtro, si se torna púrpura o ligeramente violáceo es una reacción positiva, si permanece amarillento es una reacción negativa. La colonia se creció en medio TSA adicionado con 2.5% de NaCl.

Esta prueba es requerida que se haga previo a la identificación. Se emplearon como controles *Escherichia coli* ATCC 25922 (oxidasa neg.) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (oxidasa pos.).

Prueba de la catalasa

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo; esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este compuesto acumulado es letal para las bacterias por lo que esta enzima es esencial (Mac Faddin, 1990).

Se empleó H_2O_2 al 30% (superoxal) de la siguiente manera; se tomó una asada de la cepa deseada joven y se embarró en un portaobjetos, se le agregó una gota del peróxido y se presentó efervescencia (burbujas) es una reacción positiva.

Prueba de motilidad

En un portaobjetos se colocó un gota de agua salina (0.85%), se tomó una asada de la colonia bacteriana y se suspendió en el agua, se le puso un cubreobjetos y se observó en microscopio con objetivo de inmersión (100X).

Prueba de Oxido-Fermentación

La utilización que una bacteria hace de los hidratos de carbono tiene lugar por alguno de dos procesos, de fermentación o de oxidación. Algunas bacterias son capaces de metabolizar un hidrato de carbono (manifestado por la producción de ácido) sólo en condiciones aeróbicas, mientras que otras producen ácido tanto aeróbica como anaeróbicamente. La fermentación es un proceso anaeróbico y la oxidación, naturalmente aeróbico. Muchas bacterias pueden crecer con ambos tipos de metabolismo, y son las llamadas anaeróbicas facultativas.

El medio empleado es el recomendado por Hugh y Leifson (1953):

Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
K_2HPO_4	0.3 g
Azul de bromotimol	0.05 g
Agar	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

Glucosa (dextrosa)	10 g
Agua destilada	100 ml

Se realizaron dos modificaciones, el cloruro de sodio se aumentó a 25 g y se empleó polipeptona en lugar de peptona. Se calentó el medio básico hasta su disolución, se dejó enfriar un poco y se le agregó la solución de glucosa; se dispensó 10 ml en tubos con tapa de rosca y se esterilizó a 118°C por 10 min.

Se tomó un cultivo joven (18-24 hrs) de la cepa deseada y mediante una aguja de inoculación se realizó una punción en el tubo hasta el fondo. Se incubó de 2 a 4 días a 37°C y se registró el cambio de coloración: vire de azul-verdoso a amarillo sólo en la superficie o cuando mucho en la mitad superior del tubo, indica un oxidación. Color amarillo en todo el medio, fermentación. También es posible que el medio permanezca sin cambio, por lo que se considerará como inerte (no utilización de la glucosa).

Mediante esta prueba se puede observar también si hay motilidad, ya que se puede notar que el crecimiento bacteriano se aleja del área de punción.

Prueba del Rojo de Metilo

Esta prueba pretende comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Se emplea un indicador de pH (rojo de metilo) que determina la concentración de iones hidrógeno presentes cuando un organismo fermenta la glucosa.

Medio básico

Polipeptona	7.0 g
Glucosa (dextrosa)	5.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
NaCl	25 g
Agua destilada	1000 ml

Indicador Rojo de Metilo

Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico 95°	300 ml
Agua destilada	200 ml (primero se mezcla el rojo y el alcohol)

El medio básico se prepara, se ajusta a pH 6.9 y se dispensa 5 ml en tubos con tapa de rosca, se esteriliza a 121°C por 15 min. Se le añadió NaCl para facilitar el crecimiento de las cepas. Se inocula una asada y se incuba a 35°C por dos días lo menos. Después de ese lapso se toma una alícuota de 2.5 ml y se le añaden 5 gotas del indicador. El resto del inóculo se guarda para utilizarlo en la prueba de Voges-Proskauer.

Una prueba positiva se presenta cuando se mantiene un color rojo en la superficie, indicativo de que el caldo de cultivo está lo suficientemente ácido para permitir que el indicador no vire y se mantenga en pH 4.4. La prueba será negativa si se nota un color amarillo en el medio (pH 6).

Prueba de Voges-Proskauer

En esta prueba se quiere demostrar si algunas bacterias tienen la capacidad de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol o acetoina, a partir de la fermentación de la glucosa.

Se emplea el mismo medio básico que en la prueba del rojo de metilo.

Reactivos

<i>a.</i> alfa-naftol	5.0 g
Alcohol etílico	100 ml
<i>b.</i> KOH	40.0 g
Agua destilada	100 ml

A la alícuota sobrante de la prueba del rojo de metilo se le añaden 6 gotas del reactivo *a* y luego dos del *b*. Se agita el tubo suavemente y se esperan 10 a 15 minutos.

La reacción es positiva si se observa una coloración roja-rosada en la superficie por la presencia de acetoina; y negativa si el color es amarillo o cobrizo.

Pruebas del sistema API Rapid-NFT

Para bacterias gram negativas, oxidasa positivas (de preferencia), no entéricas.

Pruebas bioquímicas (enzimáticas)

Reducción de NO₃ nitrato a NO₂ nitrito.
Indol, TRP triptofanasa.
Fermentación de la glucosa.
Arginina dihidrolasa.
Ureasa
Hidrólisis de la esculina.
Gelatinasa
ONPG beta-galactosidasa
Adipato
Oxidasa (previa)
Gram (previa)
Motilidad (previa)

Pruebas de asimilación (crecimiento)

D-glucosa
L-arabinosa
D-manosa
D-manitol
N-acetil-D-glucosamina
Maltosa
D-gluconato
Caprato
L-malato
Citrato
Fenilacetato

Pruebas del sistema API 20E

Para bacterias gram negativas, oxidasa negativas (de preferencia).

Pruebas bioquímicas (enzimáticas)

Hidrolisis de ONPG
Arginina dihidrolasa
Lisina descarboxilasa
Ornitina descarboxilasa
Ureasa
Triptofano deaminasa
Indol, triptofano
Acetoina, piruvato de sodio
Licuefacción de la gelatina
Reducción de NO₃ nitrato a NO₂ nitrito

Oxidasa (previa)
Gram (previa)
Motilidad (previa)
Oxido-Fermentación (OF)

Pruebas de asimilación (crecimiento)

Citrato
Glucosa
Manitol
Inositol
Sorbitol
Ramnosa
Sucrosa
Melibiosa
Amigdalina
Arabinosa

Para ambos tipos de sistemas de identificación se requiere de los siguientes

reactivos:

Reactivo de Kovacs

Cloruro férrico (10%)

Alfa-naftol

Hidróxido de potasio (40%)

Acido sulfanilico (0.8%)

N,N-dimetil-alfa-naftilamina (0.5%)

Aceite mineral

Polvo de zinc

APENDICE III

Descapsulación de quistes de *Artemia*

La descapsulación tiene como finalidad disolver la capa lipoproteínica que envuelve al embrión, el corión, por medio de una oxidación. Esta disolución se puede llevar a cabo mediante blanquador líquido (NaOCl) o bien en polvo ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), es necesario tener en cuenta la actividad de estos productos que debe ser de 2.12%. Se usa 0.5 g de producto activo por gramo de quiste y 14 ml de solución descapsuladora por gramo de quiste. Esta solución se prepara usando 7.14 ml de NaOCl, 0.33 ml de NaOH al 40% y 6.53 ml de agua de mar. El hidróxido de potasio se emplea para elevar el pH a más de 10. La actividad del cloro se puede determinar sencillamente usando un refractómetro y realizando una conversión basándose en la siguiente tabla.

Actividad (%)	Índice de Refracción	Salinidad (ppt)
3.21	1.3450	(66)
5.25	1.3518	(104)
6.56	1.3518	(129)
7.81	1.3604	(152)
9.19	1.3650	(175)

Actividad del NaOCl determinada por refractometría. Para convertir el índice de refracción a concentración en g/l de producto activo emplear la siguiente fórmula $g/l = 3000(\text{índice refrac.}) - 4003$. Según Sorgeloos et al., 1986.

Los pasos a seguir para descapsular un gramo de quiste son los siguientes (Bengston, et al., 1991):

1. Hidratar los quistes, aerándolos en agua de mar o dulce (2 hrs a 25°C).

2. Colectarlos en una malla de 125 μ , lavarlos.
3. Descapsularlos en la solución de hipoclorito (10-15 min), hasta que se realice un vire de color, del café a naranja o hasta que al examinarlos al microscopio estereoscópico se note una completa disolución del corión. Mantener una temperatura de 15-20°C adicionando hielo. Nunca sobrepasar los 40°C.
4. Lavarlos con agua limpia.
5. Desactivar con ácido clorhídrico o tiosulfato de sodio durante no más de un minuto.
6. Lavarlos con agua limpia.