



UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESPECIALIDAD BIOLOGÍA PESQUERA

LUBER NOEL CUSME BRAVO

**"EVALUACION DEL POTENCIAL PROBIOTICO PARA
EL USO EN PISCINA DE CULTIVO DE LARVAS DE
CAMARON**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO PESQUERO

DIRECTOR DE TESIS:

BLGO. JUAN NAPA ESPAÑA

MANTA

ECUADOR

2013

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuesta en esta tesis, nos corresponde exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABI.

CERTIFICACIÓN

Quien suscribe la tesis de grado del egresado: **LUBER NOEL CUSME BRAVO**, "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO PARA EL USO EN PISCINA DE CULTIVO DE LARVAS DE CAMARÓN" Certifico que el mencionado egresado ha culminado su tesis, y realizado las respectivas correcciones, por lo que puede continuar con el tramite respectivo.

Manta, Noviembre 05 del 2013



Blgo. Juan Napa España
DIRECTOR DE TESIS

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Dr. Luís Ayala Castro. Ph. D

Decano de la Facultad

Blgo. Juan Napa España

Director de Tesis

Blgo,Jaime Sanchez Moreira

Miembro del Tribunal

Blgo,Luis Bravo Delgado

Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTO

A nuestros PADRES quienes fueron los primeros en creer en nosotros.

Al BLGO. JUAN PABLO NAPA, nuestro amigo y Director de Tesis.

A la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí por darnos la implementación y los conocimientos necesarios para desarrollar nuestras metas y logros.

A NUESTROS Profesores que supieron apoyarnos en toda circunstancia.

A todos ellos GRACIAS.

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado exclusiva y eternamente, a las dos personas que me apoyaron de forma incondicional, desde mis primeros pasos y durante el transcurso de mis estudios, hasta llegar a cumplir con la meta deseada, A mis queridos padres SAMUEL CUSME Y DIOSA BRAVO.

A mi querida esposa JESSICA JIMENEZ por tener la paciencia de mis desvelos, su comprensión y apoyo y a mis queridos hijos RICHARD, NOHELIA y SAMIRA a todos ellos pilares de mi formación.

CONTENIDO

<i>DERECHOS DE AUTORIA</i>	<i>IV</i>
<i>CERTIFICACIÓN DEL TUTOR</i>	<i>V</i>
<i>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL</i>	<i>II</i>
<i>AGRADECIMIENTO</i>	<i>IV</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>III</i>
<i>INDICE DE FIGURAS</i>	<i>XI</i>
<i>INDICE DE TABLAS</i>	<i>XII</i>
<i>LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURA</i>	<i>XIV</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>XVI</i>
<i>ABSTRACTO</i>	<i>XVIII</i>
<i>CAPITULO I</i>	<i>1</i>
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
<i>1.1 UNA REVISIÓN EN EL USO DE MICROORGANISMOS COMO PROBIOTICOS.</i>	<i>2</i>
<i>1.2 LA MICROFLORA DEL SISTEMA DIGESTIVO</i>	<i>3</i>
<i>1.3 LOS ESTUDIOS DE PROBIOTICOS.</i>	<i>6</i>
<i>1.3.1. ESTUDIOS DE PROBIÓTICOS EN LOS SERES HUMANOS.</i>	<i>6</i>
<i>1.3.1.1 LACTOBACILO SPP.</i>	<i>7</i>
<i>1.3.1.2 BIFIDOBACTERIUM SPP</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2 LOS ESTUDIOS DE PROBIÓTICOS EN ANIMALES JÓVENES.</i>	<i>9</i>
<i>1.3.2.1 LOS ESTUDIOS DE LAS AVES DE CORRAL.</i>	<i>10</i>
<i>1.3.2.2 LOS CERDOS.</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2.3 LOS RUMIANTES.</i>	<i>11</i>
<i>1.4 LA BACTERIOLOGÍA DE LA FLORA BACTERIANA EN LARVAS DE CAMARON EN LAS INSTALACIONES DE CRIA.</i>	<i>12</i>
<i>1.5 PROBIOTICOS EN ACUACULTURA.</i>	<i>15</i>
<i>1.5.1 CAMARÓN.</i>	<i>16</i>
<i>1.5.2 CANGREJOS.</i>	<i>17</i>
<i>1.6 LA JUSTIFICACIÓN.</i>	<i>20</i>
<i>CAPITULO II</i>	<i>21</i>
<i>2. MATERIALES Y METODOS GENERALES</i>	<i>21</i>
<i>2.1 LA BACTERIOLOGÍA.</i>	<i>21</i>
<i>2.3 EL ANÁLISIS DE DATOS.</i>	<i>26</i>
<i>CAPITULO III</i>	<i>28</i>
<i>3. ADQUISICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE TINSIONES BACTERIANAS.</i>	<i>28</i>

3.1 LA INTRODUCCIÓN.	28
3.2 OBJETIVOS.	30
3.3 ADQUISICIÓN DE LOS MATERIALES Y LOS MÉTODOS.	30
3.3.1 TINSIONES.	30
3.3.2 PRESERVACIÓN DE TINSIONES.	32
3.3.3 LA CARACTERIZACIÓN DE LAS TINSIONES.	32
3.3.4 IDENTIFICACIÓN DE TINSIONES.	35
3.4 RESULTADOS.	36
3.4.1 SOLUCIONES DE TINSIONES.	36
3.4.2 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE TINSIONES.	37
3.4.3 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA	42
3.5 DISCUSIÓN	48
3.6 CONCLUSIONES.	50
CAPITULO IV	51
4. COMPETICION DE TINSIONES SELECCIONADAS	51
4.1 INTRODUCCIÓN.	51
4.2 OBJETIVO.	52
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.	52
4.3.1 MEDIOS DE UTILIZACION SÓLIDOS.	52
4.3.2 MEDIOS DE UTILIZACIÓN LÍQUIDOS.	53
4.3.3 TINSIONES SELECCIONADAS EN UN SISTEMA DE CRÍA DE LARVAS.	53
4.3.3.1 BACTERIOLOGÍA.	54
4.3.3.2 Proyecto experimental.	54
4.4 RESULTADOS.	54
4.4.1 MEDIOS DE UTILIZACION SÓLIDOS.	54
4.4.2 MEDIOS DE UTILIZACIÓN LÍQUIDOS.	56
4.4.2.1 CULTURAS AXÉNICAS.	56
4.4.2.2 CULTURAS MIXTAS.	56
4.4.2.3. CALIDAD DE AGUA.	59
4.4.2.4 PRIMER EXPERIMENTO	63
4.4.2.5 EXPERIMENTO SEGUNDO.	63
4.4.2.6 EXPERIMENTO TERCERO.	63
4.5 DISCUSIÓN.	68
4.5.1 COMPETICIÓN EN UN MEDIO SÓLIDO.	68
4.5.2 COMPETICIÓN EN EL MEDIO DE LÍQUIDO.	70
4.5.3 MUESTRAS DE TINSIONES SELECCIONADAS EN UN SISTEMA DE CRÍA DE LARVAS.	72
4.6 .CONCLUSIONES.	73
4.6.1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO EXTENSO.	73
CAPITULO V	74
5 .SELECCIÓN DE LA TINSION DEL PATOGENO VIBRIO SPP EN LARVAS DE PENAEUS VANNAMEI.	74
5.1 INTRODUCCIÓN	74
5.1.1 ESTUDIO DEL PATÓGENO	74
5.1.2 DESAFÍO DEL BAÑO.	74
5.1.3 DESAFÍO DE LA INCUBACIÓN ..	75

5.1.4 DESAFÍO DE INYECCIÓN.	75
5.2 OBJETIVOS	78
5.3 MATERIALES Y METODOS.	78
5.3.1 DESAFÍO DE INYECCIÓN PARA LOS CAMARONES JUVENILES .	78
5.3.1.1 PROYECTO EXPERIMENTAL.	78
5.3.1.2 PREPARACIÓN DE LA INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS.	80
5.3.2.1 BACTERIOLOGÍAS	82
5.3.2.2 PROYECTO EXPERIMENTAL	83
5.4 RESULTADOS.	85
5.4.1 DESAFÍO DE INYECCIÓN PARA LOS CAMARONES JUVENILES.	85
5.4.2 DESAFÍO DEL BAÑO CON LARVAS DE CAMARÓN.	88
5.4.2.1 EXPERIMENTO 1. TINSIÓN DEL PATÓGENO HL57.	88
5.4.2.2 EXPERIMENTO 2. EL EFECTO DE SALINIDAD EN EL PATÓGENO DE TENSIÓN HL57.	89
5.4.2.3 EXPERIMENTO 3. LARVAS ENFERMAS FATIGA EL DESAFÍO.	89
5.4.2.6 PRE-EXPERIMENTO 6. LA DESINFECCIÓN DE LARVAS CON EL FLORFENICOL.	93
5.5 DISCUSIÓN.	97
5.5.1 DESAFÍO DE INYECCIÓN.	97
5.5.2 DESAFÍO DEL BAÑO CON LARVA DEL CAMARÓN.	99
5.6 CONCLUSIONES.	100
5.6.1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO EXTENSO	100
CAPITULO VI	102
6. COMPORTAMIENTO DE LAS LARVAS INOCULADAS CON LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO.	102
6.1. INTRODUCCIÓN.	102
6.1.1 MÉTODO BACTERIANO EN EL CRIADERO.	102
6.2 OBJETIVOS.	104
6.3 MÉTODOS Y MATERIALES	104
6.3.1 INOCULACIÓN DE BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO EN LARVAS DE CAMARÓN EN EL SISTEMA DE CRÍA.	104
6.3.1.1. BACTERIOLOGÍA.	104
6.3.1.2 .PROYECTO EXPERIMENTAL.	104
6.3.2 DESARROLLO DE UN MÉTODO EXPERIMENTAL PARA PROBAR LA TINSION DEL PROBIÓTICO UTILIZANDO SPP DE ARTEMIA EN LARVAS.	106
6.3.2.1 .DESINFECCIÓN DEL QUISTE DE ARTEMIA QUE SALE DEL CASCARÓN.	106
6.3.2.2 COMPORTAMIENTO BACTERIANO Y PREPARACIÓN DE LA INOCULACIÓN	107
6.3.2.3 BIOENCAPSULACIÓN DE TINSIONES EN EL NAUPLIO DE ARTEMIA	107
6.3.2.4 PROYECTO EXPERIMENTAL	108
6.4 RESULTADOS	111
6.4.1 INOCULACIÓN DE LA LARVA DE CAMARÓN EN EL SISTEMA DE CRÍA CON LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO.	111
6.4.1.6 EXPERIMENTO 6. LA TINSIÓN C7B EN UN SISTEMA DE TANQUE.	117
6.4.2 DESARROLLO DE UN MÉTODO EXPERIMENTAL PARA PROBAR EL PROBIÓTICO EFECTUADO DE UNA TINSIÓN BACTERIANA EN EL SPP DE ARTEMIA.	122

6.4.2.1 EXPERIMENTO 1	122
6.4.2.2 EXPERIMENTO 2	122
6.4.2.3 EXPERIMENTO 3	122
6.4.2.4 EXPERIMENTO 4	123
6.4.2.5 EXPERIMENTO 5	124
6.4.2.6 EXPERIMENTO 6	124
6.5 DISCUSIÓN	127
6.5.1 INOCULACIÓN DE LAS LARVAS DE CAMARON EN SISTEMA DE CRÍA CON LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIOTICO.	128
6.6 CONCLUSIONES	133
<i>CAPITULO VII</i>	134
<i>7 DISCUSIÓN GENERAL</i>	134
7.1 SELECCIÓN DE UN ORGANISMO DE POTENCIAL PROBIÓTICO-	134
7.1.1 PASOS PARA SELECCIONAR LOS MICROORGANISMOS DEL PROBIÓTICO.	134
7.1.1.1 SEGURIDAD DEL MICROORGANISMO.	134
7.1.1.2 ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN	135
7.1.1.3 PRODUCCIÓN DE SUBSTANCIAS ANTAGÓNICAS	135
7.1.1.4 RESISTENCIA A PROCESAR	136
7.1.1.5 PROCEDIMIENTO DE LA SELECCIÓN SUGERIDO EN LA LITERATURA.	136
7.2 PROPOSICIÓN DE UN ESQUEMA DE LA SELECCIÓN PARA LAS BACTERIAS PROBIOTICAS PARA EL 136USO EN CRIA DE LARVAS DE CAMARON.	137
7.2.1 INFORMACIÓN SOBRE LOS ANTECEDENTES	137
7.2.2 ADQUISICIÓN DE BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO.	137
7.2.3 EVALUACIÓN DE HABILIDAD DE LAS BACTÉRIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO PARA COMPETIR CON LAS TINSIONES DEL PATÓGENO.	137
7.2.4 EVALUACIÓN DEL PATÓGENO EN LAS TINSIONES SELECCIONADAS.	138
7.2.5 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO SELECCIONADO CON LAS LARVAS.	138
7.2.6 EVALUACIÓN ECONÓMICA	139
7.3 RECOMENDACIONES Y CONCLUSIÓNES	139

INDICE DE FIGURAS

	Pg
Fig 2.1a, tanques para pruebas con probiótico	25
Fig 2.1b tanques para pruebas con probiótico	25
Fig 2.2a pruebas en botellas plasticas	27
Fig 2.2b pruebas en botellas plasticas	27
Fig 2.2c pruebas en botellas plasticas	27
Fig 2.2d pruebas en botellas plasticas	27
Fig 3.1a y b diagrama con datos BIOLOG	42
Fig 3.2 a y b diagrama con datos BIOLOG	43
Fig 3.3 a y b sensibilidad antibiótica	45
Fig 4.1 competición de cepas seleccionadas	55
Fig 4.2 incubación en agua esteril	57
Fig 4.3 incubación en cultivo mixto	60
Fig 4.4 conducta de tinsiones	61
Fig 4.5 simbiosis en las tinsiones empleadas	62
Fig 4.6 a y b tinsión C7 en cultivo de larvas	67
Fig 4.7 Datos de los tratamientos con HL34, C14	68
Fig 4.8 tinsiones de inhibición	69
Fig 5.1 sistemas para criar camarones	79
Fig 5.2 Patogenicidad de cepas seleccionadas	80
Fig 5.3 % de mortalidad de P. Estilirrostris	96
Fig 5.4 % de larvas que mudaron	96
Fig 5.5 Carga bacteriana en nauplios de P. Estilirrostris	97
Fig 6.1 experimento con nauplios de artemia	107
Fig 6.2 diagrama de experimentos 1 y 2	109
Fig 6.3 diagrama de experimento 3	110
Fig 6.4 diagrama de experimentos 4 y 6	110
Fig 6.5 % supervivencia de larvas	118
Fig 6.6 % de larvas al final del experimento	119
Fig 6.7 cantidad de CFU/ larvas inoculadas	120
Fig 6.8 supervivencia de larvas inoculadas	121
Fig 6.9 diferencia en supervivencia de nauplios De artemia	127
Fig 7.1 diagrama de circulación para probiótico	140

INDICE DE TABLAS

	Pg
Tabla 3.1 identificación de tinsiones	32
Tabla 3.2 identificación de tinsiones	34
Tabla 3.3 identificación de tinsiones	35
Tabla 3.4 identificación de tinsiones	37
Tabla 3.5 identificación de tinsiones	39
Tabla 3.6 identificación de tinsiones	40
Tabla 3.7 identificación de tinsiones	41
Tabla 3.8 identificación de cepas	46
Tabla 3.9 fuentes de carbono de las cepas	47
Tabla 3.10 reacciones a los antibióticos	48
Tabla 4.1 diferencia en actividad bacteriana	64
Tabla 4.2 diferencia en actividade bacteriana	65
Tabla 4.3 diferencia en actividade bacteriana	65
Tabla 4.4 diferencia en actividade bacteriana	66
Tabla 4.5 diferencia en tercer experimento	66
Tabla 5.1 inyección y retos en camarones	77
Tabla 5.2 patogenicidad de cepas seleccionadas	81
Tabla 5.3 desafio con penaeus estylirrostris	82
Tabla 5.4 pesos de camarones inyectados	86
Tabla 5.5 detalles de experimentos	86
Tabla 5.6 detalles de experimentos 1	87
Tabla 5.7 detalles de experimentos 2	89
Tabla 5.8 detalles de experimento 3	90
Tabla 5.9 detalles de experimento 4	91
Tabla 5.10 detalle de experimento 5	92
Tabla 5.11 detalle de experimento 6	93
Tabla 5.12 diferencia de tratamiento 5	94
Tabla 5.13 diferencia en densidades bacterianas	95
Tabla 6.1 experimento para larvas de camarón	105
Tabla 6.2 experimento de sobrevivencia	108
Tabla 6.3 detalles de experimento 1	112
Tabla 6.4 detalles de experimento 2	113
Tabla 6.5 detalles de experimento 3	114
Tabla 6.6 diagrama de experimento 4	115
Tabla 6.7 diagrama de experimento 5	116
Tabla 6.8 diferencia en supervivencia	116

Tabla 6.9 diferencia en supervivencia de nauplios De Artemia en el experimento 3	123
Tabla 6.10 volumen bacteriano en los nauplios De Artemia en experimento 4	124
Tabla 6.11 diferencia y supervivencia en nauplios De Artemia en experimento 5	125
Tabla 6.12 diferencia y supervivencia en nauplios De Artemia en experimento 6	126

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

CFU:	Unidad Formadora de Colonias.
LOG:	Logaritmo.
%:	Porcentaje.
API: Interfases.	Aplicación de Programas de
TCBS:	Tiusulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa.
Mg:	Miligramo.
MI:	Mililitro.
ANOVA:	Analisis de Varianza.
CELL:	Celulas.
TSA:	Tritic Say Agar.
°C:	Grados Centígrados.
PL:	post Larvas.
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacetico.
BIOLOG-GN:	Biología Genética.
NM:	Nanómetro.
UM:	Micrómetro.
ONU: Operacionales.	Unidades Taxonómicas

NCBM:	Colección Nacional de Bacterias Marina
Fig:	Figura.
V.	Vibrios.
Z:	Zoeas.
M.	Misis.
Hr:	Horas.
SPP:	Todas las especies
TSI:	Triple azúcar hierro.

RESUMEN

El uso de muchos antibióticos está prohibido en diferentes partes del mundo, sin embargo, aún se permite el uso de la oxitetraciclina en animales de consumo humano.

Las consecuencias del uso indiscriminado de los antibióticos son ampliamente conocidas, entre ellas están la disminución de la flora bacteriana, que actúa como protección natural a enfermedades, el aumento de la resistencia patógena y la acumulación de los residuos de estos medicamentos en el cuerpo humano. Los probióticos excelente solución para muchos cultivadores de camarones.

Pues bien, la adecuada aplicación de probióticos en la dieta de los camarones de cultivo evita la utilización de antibióticos para el manejo de patógenos o enfermedades que generan consecuencias negativas en la salud de la población que los consume.

Las bacterias lácticas probióticas o probióticos, son organismos vivos que se encuentran en la naturaleza y que, al ser parte de la dieta de los camarones, mejoran su capacidad inmunológica natural y su capacidad de reacción sin dejar en sus cuerpos residuos perjudiciales para la salud.

Los probióticos se encuentran en los intestinos tanto de humanos como de animales y producen sustancias llamadas bacteriocinas que son proteínas de bajo peso molecular que actúan como antibióticos directamente sobre los patógenos.

Los camarones fueron desafiados con una bacteria oportunista llamada *Pseudomonas aeruginosa* que puede ser mortal para los camarones de cultivo desde sus etapas tempranas de postlarvas, juveniles y adultos. Esta bacteria puede estar presente en el agua o en el polvo y afecta no sólo a los animales sino también a las personas.

Antes de iniciar el trabajo de campo, se realizó una prueba in Vitro, en una caja de petri que está hecha de vidrio y que es usada generalmente para separar microorganismos.

A un cultivo puro de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se le aplicó una gotita de cultivo puro activo de probióticos y se detectó un halo de inhibición muy fuerte frente a este patógeno.

El trabajo de campo comenzó separando tres grupos de camarones blancos pequeños. Para observar la capacidad de reacción frente a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que fue el patógeno utilizado en la investigación, un primer grupo de larvas entre 10 y 20 días de nacidas, fue alimentado con probióticos en su dieta diaria.

Entre los probióticos utilizados en la investigación está la Cepa 20 identificada como *Lactobacillus plantarum*, un lactobacilo extraído de una especie de camarón. Existen otras cepas que han sido aisladas de peces y que también se utilizaron en este ensayo pero no son tan relevantes.

En condiciones asépticas, un cultivo puro de probióticos fue inoculado y mezclado en cantidades calculadas en la camaronina que se fermenta entre 12 y 24 horas para que las cepas crezcan y se desarrollen con vigor; luego se colocan en una estufa de

secado a una temperatura no mayor de 35 grados centígrados pues mataría los probióticos.

El segundo grupo de postlarvas fue manejado con antibiótico para contrarrestar la acción de la bacteria y, finalmente, el último grupo no contó con ningún tratamiento.

El resultado fue contundente al comprobar, en esta población de camarones jóvenes, que los probióticos tienen un resultado tan eficiente como el de los antibióticos. Adicionalmente, se comprobó la efectividad de la adherencia de la Cepa 20 en el intestino como parte de la flora bacteriana de los camarones que fueron alimentados con este probiótico.

En los camarones, los probióticos cumplieron las funciones básicas de controlar e inhibir los patógenos y aumentar la capacidad de respuesta inmunológica. También se observó que el uso de probióticos mejora la capacidad de respuesta frente a virus como de la mancha blanca muy común en esta especie.

Esta investigación ofrece una respuesta positiva a las necesidades de los cultivadores de camarón blanco y principalmente, de los productores de postlarvas, pues en esta etapa de “bebés”, los camarones no cuentan con las defensas suficientes contra enfermedades e infecciones.

ABSTRACT

The use of many antibiotics is banned in different parts of the world, however, still allows the use of oxytetracycline in animals for human consumption.

The consequences of the indiscriminate use of antibiotics are widely known, these include the reduction of the bacterial flora, which acts as a natural protection from disease, the increased pathogen resistance and waste accumulation of these drugs in the human body. Probiotics excellent solution for many shrimp farmers

Well, the proper application of probiotics in the diet of shrimp farming avoids the use of antibiotics for the management of pathogens or diseases that generate negative consequences on the health of the population consumes.

Probiotic lactic acid bacteria or probiotics are living organisms that are found in nature and which, being part of the diet of shrimp, improve natural immune capacity and resilience in their bodies while residues harmful to health.

Probiotics in the intestines of both humans and animals and substances called bacteriocins which are low molecular weight proteins that act as antibiotics directly on pathogens.

The shrimp were challenged with opportunistic bacteria called *Pseudomonas aeruginosa* that can be deadly to farmed shrimp from their early post-larvae, juveniles and adults. This bacterium can be present in the water or dust and affects not only animals but also in humans.

Before starting the field work, testing was performed in vitro, in a petri dish that is made of glass and is generally used to separate microorganisms. A pure culture of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* was applied to a droplet of pure active probiotic culture and detected a very strong inhibition halo against this pathogen.

Fieldwork began separating three groups of small white shrimp. To observe the ability to react to the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, which was the pathogen used in research, a first group of larvae between 10 and 20 days after birth, was fed with probiotics in your daily diet.

Among the probiotics used in research is the strain *Lactobacillus plantarum* 20 identified as a *Lactobacillus* extracted from a species of shrimp. There are other strains which have been isolated from fish and which were also used in this test but is less relevant.

Under aseptic conditions, a pure culture of probiotics was inoculated and mixed in amounts calculated in *Camaronina* which is fermented between 12 and 24 hours for strains grow and develop vigorously and then placed in a drying oven at a temperature not greater than 35 degrees Celsius as probiotics kill.

The second group of postlarvae was managed with antibiotic to counteract the action of the bacteria and, finally, the last group did not have any treatment

This research provides a positive response to the needs of white shrimp farmers mainly postlarvae producers, because at this stage of "babies", the shrimp do not have sufficient defenses against disease and infection.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años, muchas investigaciones se han encaminado al desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas para reducir o impedir la incidencia de enfermedades en los cultivos. Peeters y Rodríguez (1999) señalan que los problemas de enfermedades muchas veces son ocasionados por el manejo inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de ataques bacterianos.

Una estrategia de control bacteriológico, muy interesante y con resultados prometedores, se enfoca al empleo de probióticos, como alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos, bajo el principio de exclusión competitiva. Es una herramienta viable, ya que las bacterias probióticas ocupan espacios y demandan nutrientes del agua y del fondo del estanque, así como directamente del tracto digestivo de los camarones, reduciendo las posibilidades de colonización y desarrollo de otros microorganismos que sean patógenos o puedan convertirse en nocivos (Moriarty, 1999; Berger, 2000; Newman, 2000; Benetti, 2001; Chamberlain, 2001; Gullian 2001).

Varios estudios han demostrado que el uso de mezclas probióticas son más efectivas que las cepas independientes en el control de patógenos, ya que la posibilidad de establecer poblaciones probióticas a pesar de las variaciones ambientales es mayor. Además, se han observado procesos sinérgicos entre cepas, que han incrementado los resultados deseados (Douillet, 2000).

El mecanismo de exclusión competitiva es una propiedad que ha sido aprovechada por varios investigadores, para realizar pruebas de desafío con patógenos, con el fin de demostrar la capacidad probiótica de las bacterias en estudio

1.1 UNA REVISIÓN EN EL USO DE MICROORGANISMOS COMO PROBIÓTICOS.

El trabajo de Elie Metchnikoff al principio de este siglo, se podría mirar como la primera investigación conducida sobre los probióticos (más lleno, 1989a). Él los describió como "microbios ingeridos con la puntería de promover buena salud". Esta misma definición era los "organismos y las sustancias modificados que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal (Parker, 1974)", y más adelante por Fuller (1989a, 1989b) "un suplemento microbiano vivo de la alimentación que afecta beneficioso al animal del anfitrión mejorando su equilibrio microbiano intestinal". Estas definiciones fueron desarrolladas originalmente para los animales o los seres humanos del campo, puesto que los primeros estudios en el tema fueron continuados para estas especies. Los Probióticos ahora también se están utilizando en acuicultura y por lo tanto la definición puede tener que ser cambiado. En animales acuáticos no sólo la zona digestiva es importante, sino que el agua circundante también, por lo tanto, un probiótico podría ser redefinido introduciendo no solamente una mejora en el equilibrio digestivo de la zona, pero del ambiente en el cual el animal vive. Esta mejora ambiental implica un aumento de la calidad del agua por una introducción de un microorganismo. La inoculación de un microorganismo beneficioso podía actuar de varias maneras: a) colonización de la columna del agua y de sus fronteras, b) producción de compuestos extracelulares, c) modificación de la comunidad microbiana, y d) extirpación de patógeno posibles. En la práctica, cualquier resultado beneficioso resultará probablemente de una combinación de estos efectos. Probióticos no se puede clasificar como tipo de control biológico, pues la definición del control biológico es la utilización de los enemigos naturales para reducir el daño causado por los organismos nocivos a los niveles tolerables (Debach y Rosen. 1991) o más terminantemente, el control o la regulación de las poblaciones del parásito de los enemigos naturales (Smith 1919). Un microorganismo probiótico no ataca directamente a agente nocivo (patógeno) pero previene simplemente su acción en el anfitrión; en la mayoría, puede producir las sustancias que inhiben el organismo dañoso. Ni uno ni otro si el probiótico se identifica como promotores del crecimiento, puesto que su acción no se pudo asociar al crecimiento del

anfitrión sino a una mejora general en salud, el crecimiento puede ser solamente uno de los efectos.

1.2 LA MICROFLORA DEL SISTEMA DIGESTIVO

El feto humano dentro del útero es estéril, pero tan pronto como pase a través de la vagina durante el nacimiento, adquiere microorganismos vaginales y fecales (Gibson y Roberfroid, 1995). La flora de la tripa se adquiere de su ambiente inmediato, y se establece rápidamente (Jernigan et, 1985; Más lleno, 1989b; Smoragiewicz, 1993). El período inicial de la colonización bacteriana en el ser humano recién nacido ocurre normalmente en un período de dos semanas. Durante este tiempo, los infantes criados al pecho y criados con biberón abrigan especies bacterianas similares en los dos puntos. La *Escherichia coli* y el *estreptococo* spp. Son casi siempre las primeras especies a aparecer, en las densidades entre 10^8 y 10^{10} organismos/g de heces (Goldin y Gorbach, 1992). Las diferencias gruesas existen dependiendo de la alimentación del infante. Los infantes criados al pecho abrigan sobre todo spp *Bifidobacterium*, mientras que están criados con biberón unos demuestran la flora más variada que consiste, entre otros, del *lactobacilo* spp. (Atlas, 1988), *Bacteroides* spp., el *clostridium* spp. Y el *estreptococo* spp. (Neut, 80; Gibson y Roberfroid 1995). Se mantiene esta diferencia hasta que otros alimentos se incorporan en la dieta.

Después de destetar (2 años), la flora final en seres humanos se establece y puede convertirse en una colección muy compleja de aproximadamente 10^{14} microorganismos en total, consistiendo en más de 400 diversos tipos de bacterias (Moore y Holdemann, 1974). El intestino grueso puede contener hasta 10^{12} bacterias /ml¹ de contenido de la tripa (Gibson y Roberfroid, 1995). La tripa de la otra especie se ha encontrado para contener números similares de las bacterias, 10^{11} bacterias/ ml¹ en los intestinos ciegos de las aves de corral (Barow, 1992), 10^{10} bacteria/ml en la panza de rumiantes (Wallace y Newbold, 1992). La mayoría de la flora en el intestino grueso de seres humanos es terminantemente anaerobia, donde están *Bacteroides* y *Fusobacteria* los géneros predominantes; otros géneros también encontrados son *Bifidobacterium* spp., el *clostridium* spp., el *lactobacilo* spp., varias barras gram-positiva que pertenecen al eubacteria y otros cocos gram-positiva (Atlas, 1988; Gibson y

Roberfroid, 1995). El estómago y el intestino pequeño superior son poblados por un número bajo de bacterias debido a la acidez del contenido. Igual se puede decir sobre el intestino pequeño superior (ordenar, 1991; Goldin y Gorbach, 1992). 1.2.1 Las interacciones microbianas de las interacciones bacterianas representan la fuerza principal que contribuye al homeostasis de la flora bacteriana en la tripa (Raibaud, 1989). Los componentes del ecosistema de la tripa implican a) bióticos, microbios y la guarnición de la tripa; b) abióticos, alimentaciones; y c) componentes endógenos, secreciones del organismo y otras. Los problemas gastrointestinales se asocian a menudo a la desestabilización del ecosistema.

1.2.2 La colonización de la microflora de la tripa consiste en los microorganismos que colonizan permanentemente la zona así como otras que sean transitorios. Si deben sobrevivir y colonizar la tripa, tienen que soportar el movimiento peristáltico, que tiende para limpiar la tripa con un chorro de agua. Pueden superar este multiplicándose rápidamente o uniéndose a la pared de la tripa (Jernigan, 1985; Más lleno, 1989 b; Manguera y Sozzi, 1991). Esto puede implicar la asociación libre en el lumen o la colonización de superficies epiteliales, con adherencia a las estructuras en la superficie o la colonización de las secreciones que cubren las células epiteliales (Savage, 1979). La adherencia se puede considerar el primer paso de la colonización, pero después del establecimiento, el organismo debe poder multiplicarse, superando los mecanismos y las interacciones de defensa del anfitrión con la microflora circundante. El accesorio de la bacteria es el mismo dependiente del anfitrión, y las bacterias aisladas a partir de un animal pueden no poder colonizar sitios similares en otras especies de animales (Jernigan, 1985; Havenaar, 1992). La colonización es un fenómeno específico del anfitrión que se puede influenciar por las condiciones particulares del crecimiento (, 1989b).los conductos al epitelio escamoso del estómago, por ejemplo, demuestra un alto grado de la especificidad (Fox, 1988). Las bacterias deben ser también capaces de resistir la acción de la bilis y de otras sustancias potencialmente dañosas, características de la tripa, las condiciones anaerobias para poder utilizar los alimentos disponibles (Smoragiewicz, 1993). La flora microbiana dentro de la tripa fue crecida de largo para tener un efecto nocivo en el organismo del anfitrión (hipótesis de Metchnikoff), pero los investigadores tienen realizado que también

estuvo implicado en la protección del anfitrión y contribuido a su nutrición (más llena, 1989a). Un concepto importante en la teoría probiótica es que la microflora intestinal de seres humanos y de animales proporciona la protección contra infecciones de los microorganismos patógenos (Fox, 1988; Más lleno, 1989b, Hentges, 1989). Un modo de la acción de bacterias probiótica está protegiendo el anfitrión con la colonización de la tripa, este fenómeno se ha llamado "efecto de la barrera", "antagonismo bacteriano", "interferencia bacteriana", "resistencia de la colonización" y la "exclusión competitiva" (más llena, 1989 a, 1989b; Energía y Moore, 1994). Los efectos de la barrera son extremadamente eficientes en la prevención de infecciones intestinales, en parte manteniendo bacterias potencialmente patógenas en las bajas densidades. Se ha probado que la enterotoxina que produce tinsiones de E. coli puede inducir solamente diarrea a través de los conductos a la pared intestinal (Sissons, 1989). Por lo tanto si una tensión beneficiosa coloniza la guarnición de la tripa que evitará que las bacterias entéricas causen enfermedad, así actuando como barrera contra la colonización del patógeno.

La mejor evidencia para el efecto protector de la flora de la tripa proviene de la observación; los animales de microorganismos son libremente más susceptibles a la enfermedad que las que estan' con la flora intestinal completa. Algo del trabajo crucial que ayudó en el desarrollo de esta fue hecho por. (Bohnhoff, 1954). Demostraron que administrando los antibióticos a los ratones experimentales, los hicieron más susceptibles a la infección del typhirnurium de las salmonelas. Los resultados similares han sido obtenidos por otros trabajadores que probaban pneumoniae del E. coli, del klebsiella y aeruginosa de los pseudomonas en los ratones (Van der Waaij, 1971). Collins y Carretero (1978) demostraron que los ratones microorganismo-libres podrían ser matados con 10 células del enteriditis de las salmonelas, solamente 109 células fueron requeridos para matar a un animal con una microflora completa de la tripa.

1.2.3 La modificación de procesos metabólicos, otra manera por la cual los organismos probióticos puedan ser beneficiosos, y están modificando procesos metabólicos, según lo resumido por Rowland (1989). Estas modificaciones se podían lograr de varias maneras. a) suprimiendo las reacciones que dan lugar a la generación de

metabolitos tóxicos o carcinógenos. La degradación de nitrosaminas por los lactobacilos y las tensiones del *E. coli* (Rowland y Grasso, 1975) es un ejemplo. b) estimulando las reacciones enzimáticas implicadas en la desintoxicación de sustancias potencialmente tóxicas. Un ejemplo es la reducción de la producción de la amina en el aparato gastrointestinal (Power y Moore, 1994). c) estimulando las enzimas mamíferas implicadas en la digestión de alimentos complejos. Los Probióticos pudieron influenciar la actividad de enzimas útiles tales como B-galactosidase (Goodenough y Kleyn, 1976). d) sintetizando las vitaminas y otros alimentos esenciales no proporcionados en suficientes cantidades en la dieta.

1.2.4 El estímulo del sistema inmune puede ser alcanzado aumentando los niveles del anticuerpo y/o aumentando la actividad del macrófago (más llena, 1989b; Perdigon, 1995). La evidencia para esto incluye la observación que los animales con una flora completa de la tripa han aumentado los niveles fagocitarios y de la inmunoglobulina (IGA) comparados con los animales gnotobióticos (más llenos, 1989b). El yogurt, con su ácido láctico produciendo bacterias, es capaz de inhibir el crecimiento del carcinoma intestinal con la actividad creciente de las células de IgA, de T y de los macrófagos (Perdigon, 1995); cuáles tienen características immunoestimuladoras y antimutagénicas (Ebringer, 1995). También los extractos enteros de la célula de ciertas tensiones generadoras de ácido láctico pueden alterar la función del macrófago (Hatcher y Lambrecht, 1993). La flora microbiana normal de un animal tiene un impacto significativo en el sistema inmune del cuerpo (Fox, 1988). Específicamente, pueden mejorar inmunidad intestinal mediante la adherencia a la mucosa intestinal y a las inmunorrespuestas locales por lo tanto que estimulan (Salminen, 1995).

1.3 LOS ESTUDIOS DE PROBIÓTICOS.

1.3.1. ESTUDIOS DE PROBIÓTICOS EN LOS SERES HUMANOS.

Metchnikoff emplearon una especie del lactobacilo; el "bacilo búlgaro supuesto" aisló de las bacterias del yogur, lo más probablemente posible. *Delbreuckii bulgaricus*. Él intentó relacionar vida larga consumiendo la leche fermentada, puesto que él encontró que los

campesinos búlgaros que injirieron cantidades grandes de cortado de ordeña, vivió a una vieja edad (más llena, 1989a; Daly, 1991). Él pensó que la ingestión de bacterias tenía una influencia positiva en la flora normal del aparato gastrointestinal (Hose y Sozzi, 1991). Los productos lácteos fermentados se han divulgado para ser eficaces en el tratamiento de un número de desórdenes, incluyendo diarrea, colitis, flatulencia, acidez gástrica, gastroenteritis, el estreñimiento la neoplasia. Así pues, no está sorprendiendo que los microorganismos implicados en el proceso de fermentación se han seleccionado como probióticos potenciales. Puesto que Metchnikoff estudió, y se han utilizado varias otras especies; entre ellas están hasta 10 especies del lactobacilo, Q de Bifidobacterium, estreptococo salivarius, faecium del enterococo, lactis de Lactococcus, del leuconostoc , del pediococcus, y el bacilo levaduras , también se han examinado, por ejemplo cerevisae del saccharomyces y pintolopesii del candida: e incluso hongos como oryzae del aspergillus niger y del A. (más lleno, 1989b; Hose y Sozzi, 1991; Lloyd-Evans, 1989). Una revisión de la especie principal empleada se presenta abajo.

1.3.1.1 LACTOBACILO SPP.

La especie de las bacterias usadas por Metchnikoff (*delbreuckii* del lactobacilo) había sido empleada para la preparación del yogur, pero es encontrada para ser incapaz de colonizar la zona intestinal de los seres humanos y de los animales (Daly, 1991). Otras especies del lactobacilo también son encontradas para ser incapaces de tal adherencia de la colonización (Millar, 1993) y la colonización son factores muy importantes para un probiótico eficaz (el ordenar, 1991; Havenaar, 1992) otra especie usada eran el *L. acidophilus*, de el cual algunas tinsiones son capaces de resistir las condiciones adversas de la tripa humana (Neumann y Ferreira, 1995), pasando a través de la zona digestiva entera (Marteau, 1992; Saxelin, 1995; Meurman, 1994) y colonización (in't Veld de Huis , 1994). El reuteri, fue probado para su capacidad de colonizar y fue demostrado que podría establecer después de siete días de la administración y podría persistir por otros siete días después del extremo de la administración (lobo etal., 1995). *Plantarum* del *L.* también tenía una buena capacidad de la colonización, según resultados de Bengmark y de Jeppsson (1995). El *gassei*, el caso , *fermentum* del *L.* y *Bifidobacterium* también se han demostrado para adherir a las células intestinales (in't Veld de Huis, 1994 del *L.*; Spencer

y Chesson, 1994). *L. acidophilus* fue empleado originalmente puesto que fue pensado para ser el lactobacilo dominante en el intestino, pero un trabajo más último demostró que hay una amplia gama de la especie, tal como

Cellobiosus del *L.* y de *L. plantarum* (ordenar, 1991). La justificación para los lactobacilos que son el grupo más comúnmente usado después del nacimiento, una disminución de números de ciertas bacterias fue observada mientras que el lactobacilo aumentó (más lleno, 1989b). Este género y estreptococo son los dos géneros que aparecen lo más con frecuencia posible en las preparaciones probióticas eficaces (Porubcan, 1990; Viga, 1995). Una mezcla del lactobacilo spp, probioto de leche fermentada demuestra un efecto beneficioso en los niños afectados por la diarrea (Gonzalez et al., 1995). Los lactobacilos también se han encontrado para mejorar el intestino-alfa produciendo la capacidad del sistema inmune (Kishi et al., 1996) y específicamente del sistema inmune de la tripa (Daly, 1991; Desimone et, 1993; Salminen et al., 1995).

Otro factor en favor de las bacterias del ácido láctico, es su capacidad de inhibir las varias bacterias gram-negativa patógenas, debido a la producción bacteriocina-como de sustancias (chateau, 1993). El *L. acidophilus* produce acidolin, acidophilin y el lactacin B, todos los antimicrobianos capaces de inhibir muchas bacterias gram-positiva y gram-negativa incluyendo el estafilococo spp., las salmonelas spp., *Shigella* spp. Y las *pseudomonas* spp. (Havenaar, 1992). El lactobacilo también produce cantidades grandes de lactato de los carbohidratos simples y por lo tanto puede soportar una alta acidez que pudo inhibir otras bacterias (Jernigan, 1985). Un análisis más último demostró que los carbohidratos simples no alcanzan la parte más inferior de la tripa porque se absorben en las partes superiores. Sin embargo, el lactobacilo puede modificar metabolismo bacteriano intestinal produciendo los efectos beneficiosos (Rowland, 1989). El uso de la especie del lactobacilo puede también tener algunos efectos negativos. Los estudios han demostrado una cierta actividad potencialmente patógena del lactobacilo spp. (e.g. carie dental, enfermedad vascular reumática y septicemia). También se han identificado como patógeno que emergían en inmunocompromiso recientemente a pacientes, particularmente éstos que recibían la terapia antibiótica del amplio-espectro (ordenar, 1991; Harty, 1994). Elmer.

(1996) no encontraron ninguna evidencia que la administración de microorganismos seleccionados es beneficiosa en la prevención y el tratamiento de ciertas infecciones intestinales y vaginales. En contraste, varios autores han encontrado el uso del lactobacilo spp, como insignificantes o inofensivos a la salud humana. Saxelin. (1996) probaron que ocho tinsiones del lactobacilo aisladas durante un estudio de cuatro años de pacientes bacterémicos tenían una actividad patógena muy baja. In't Veld de Huis. (1994) hecho un análisis crítico de los datos que apoyan la patogeneidad potencial de las bacterias del ácido láctilo y concluido que hay riesgo insignificante en la consumición de esta bacterias e indicado que tienen "reconocido generalmente como estado de la caja fuerte" (GRAS).

1.3.1.2 BIFIDOBACTERIUM SPP

Según lo mencionado anterior, Bifidobacterium spp, fue encontrado para ser la flora dominante a infantes que se mamantaban con el pecho de mamá pero no era común en formula-alimentaria unos (Neut, 1980). También fue observado que los bebés criados al pecho eran más resistentes a la enfermedad. Estos resultados condujeron a la idea que esta flora bacteriana dio a infantes una cierta protección. Bifidobacteria puede también soportar las condiciones de la tripa humana (Marteau, 1992). Por lo tanto estas bacterias también se utilizan como probióticos. Las especies usadas son 6, adolescentes, animales, bifidum del B., lomgum y B. infantiles, thermophilum del B. (Daly, 1991 del B.; Power y Moore, 1994; Gibson y Roberfroid, 1995). Daly (1991), ordenar (1991) y demandas de Gibson y de Roberfoid (1995) que los efectos positivos principales de las especies de Bifidobacterium son a) niveles reducidos del amoníaco de la sangre, b) niveles bajos del colesterol de la sangre, c) supresión del crecimiento de patógeno potenciales, d) restauración de la flora intestinal normal después de la terapia antibiótica, e) síntesis de vitaminas, f) inmunomodulación, g) actividad anticarcinogénicas, h) utilización mejorada de la lactosa. No hay informes de Bifidobacterium spp, que son agentes patógenos.

1.3.2 LOS ESTUDIOS DE PROBIÓTICOS EN ANIMALES JÓVENES.

Adquieren su microflora protectora de su madre y/o del ambiente (más lleno, 1989b); por ejemplo el excremento de la gallina es la fuente principal de las bacterias intestinales del inoculador para el polluelo nuevamente tramado, o el contacto íntimo del cochinito con la puerca (Fox, 1988). Por lo tanto, bajo condiciones normales no hay necesidad de la administración del probiótico. La flora se puede afectar por el cambio en dieta, drogas anti-bacterianas y la tensión. Cuando hay una necesidad de proporcionar probióticos a los animales, se administran en polvos, gomas o tabletas directamente en la boca o se mezclan con la alimentación. Una dosis ha demostrado a menudo ser escasa, así que se aconsejan varias dosis (más lleno, 1989a). Probióticos se ha utilizado en animales del campo como promotores del crecimiento, para substituir los antibióticos y los suplementos químicos sintéticos de la alimentación, protección para las infecciones intestinales, y para reducir susceptibilidad a la tensión (Smoragiewicz, 1993; Más lleno, 1989b).

1.3.2.1 LOS ESTUDIOS DE LAS AVES DE CORRAL.

Se han realizado con las parrillas, las gallinas que ponían, los pavos, las codornices, los gansos y los patos; pero la investigación se ha centrado sobre todo en pollos. La flora bacteriana normal del pollo es casi constante a través de la longitud de la tripa y se compone principalmente de *E. coli*, *clostridium spp.*, *lactobacilo spp.* Y varios otros anaerobios (Barrow, 1992). La infección de los spp, de las salmonelas es una enfermedad seria en pollos y también riesgosa para la salud humana. (Desmidt et, 1994), pero la colonización de la tripa de *Salmonella spp.* (Ziprin y Deloach, 1993) (Fox, 1988) y otros enteropatógenos (Barrow, 1992) se pueden prevenir por la exclusión competitiva por probióticos. Como promotores del crecimiento, la suplementación probióticas de las dietas del pollo ha sido variable pero algunos papeles divulgan un efecto positivo estadístico sobre el crecimiento y la producción del huevo (Fox, 1988; Más lleno, 1989b; Koudela, 1996), la retención del nitrógeno y un colesterol más bajo (Mohan, 1996) con las parrillas de los spp, del *lactobacilo* también demostraron un aumento del peso y mejor la conversión de la alimentación cuando fueron alimentados con el *lactobacilo acidophilus* en el agua potable (Tortuero, 1973). Otros autores repasados por Jernigan et. (1985) encontraron, cuando un probiótico fue agregada a las dietas de parrillas, ningunas diferencias significativas en los resultados en la producción de huevos, o en el mejor de los casos. Las

dificultades en demostrar diferencias significativas estadísticas han sido debido a la variación microbiológica en la flora de la tripa de individuos y de diversos grupos de los animales (Barrow, 1992).

1.3.2.2 LOS CERDOS.

Una de las causas principales de mortalidades entre los cochinitos son la diarrea, hasta 41% de las muertes totales; en la mayoría de los casos éstos son causados por las enterobacterias (Fox, 1988; Jonsson y Conway, 1992) por ejemplo *E. coli* (Spencer y Chesson, 1994). Muchos estudios en probióticos se han centrado en la prevención de la infección por estas bacterias en los cerdos neonatales o jóvenes (etapa del destete); es durante este período que los cerdos son más susceptibles. Las bacterias del ácido láctico son el grupo empleado lo más comúnmente posible como probióticos en los cerdos, donde una proporción grande de la microflora de la tripa consiste en los lactobacilos spp. (Jonsson y Conway, 1992). Los han probado en todas las etapas cada vez mayor del cerdo. Varios autores (compilados por Fox, 1988) han probado la reducción del hasta 53% en mortalidad cuando los cerdos fueron alimentados con el lactobacilo spp. La reducción de las enterobacterias del *E. coli* y de la diarrea asociada a ella se ha alcanzado con la administración del lactobacilo spp. (Danek y Novak, 1992; Kovacs Zomborszky, 1994; Tortuero, 1995).

1.3.2.3 LOS RUMIANTES.

Son quizás uno de los grupos de los animales cultivados donde se han hecho menos estudios de probióticos. Durante la vida temprana de rumiantes el alimento tiende para la panza con un cambio gradual a la fermentación microbiológica en la panza después de destetar. Por lo tanto hay dos etapas de la colonización bacteriana y de dos poblaciones microbianas muy diversas (Wallace y Newbold, 1992). El trabajo de probiótico se ha centrado en animales jóvenes. El lactobacilo *acidophilus* ha sido el probiótico de la opción (Joncova et al., 1992) y ha reducido los números del coliforme (Ellinger, 1978) y diarrea así prevenida (Fox, 1988). El *saccharomyces de la levadura cerevisiae* se ha utilizado para estimular la fermentación bacteriana en la panza (Newbold et, 1996); las levaduras promueven bacterias celulíticas (Newbold, 1995), bacterias terminantes y enterobacterias anaerobias,

amylolytic, pectinolytic, xylanolytic (Jonescova, 1992). En algunos de estos experimentos no se demostró ningunas diferencias estadísticas. La levadura, sin embargo, permitió una producción de leche creciente en las vacas lecheras cerca de 1.4 litros/días, 1991 de Williams).

1.4 LA BACTERIOLOGÍA DE LA FLORA BACTERIANA EN LARVAS DE CAMARON EN LAS INSTALACIONES DE CRIA.

1.4.1. De las instalaciones los datos disponibles mirando la bacteriología de los sistemas de crías larvales del camarón es escasa y la mayor parte es en tesis o de fuentes inéditas. Hameed (1993) presentó una cuantificación de los niveles bacterianos en diversas etapas larvales en el agua, durante tres ciclos de la cría de *penaeus vannamei*. Los niveles encontrados en las diversas etapas analizadas variadas a partir de 4.3×10^3 CFU ml¹ en los huevos a 1.2×10^8 CFU ml¹ en las postlarvas. El número total de bacterias aumentó gradualmente de los huevos a las postlarvas. La flora bacteriana en el agua que se utilizaba aumentó a partir de 9.0×10^2 a 10×10^2 CFU ml¹ durante el ciclo. Una correlación altamente significativa fue encontrada entre los números de bacterias y la supervivencia de larvas y de postlarvas. Berthe. (1992) sin embargo, no encontraron cualquier correlación. Estos autores convinieron que la flora bacteriana aumentó del agua que se utilizaba como procedió el ciclo de cría, alcanzando un máximo en el día 5 y después estabilizándose hasta el extremo del ciclo en el día 13. Hameed (1993) y Montoya (1992) han encontrado que el género predominante era vibrión seguido por *Pseudomonas*, los alcaligenes, el *aeromonas*, el *flavobacterium* y otros. Soto (1992) además el vibrión como el género principal aislado en tanques que se utilizaban larvas. Sobre otro estudio, el *flavobacterium* fue divulgado como el género predominante en 32.39% de la flora bacteriana total del tanque que se utilizaba larvas en Ecuador, seguida por *Pseudomonas* en 18.30% y el vibrión en solamente 14.0% (Berthe, 1992).

1.4.2 La flora bacteriana normal de crustáceos ha sido relativamente poco en informes que describen la flora bacteriana normal del camarón cultivado sano. Los niveles bacteriano de la flora y la otra especie acuática se relaciona con el ambiente en el cual viven (Karthiayani y el Iyer, 1975) y es razonable asumir que tal relación existe en camarón.

De importancia especial es la presencia de bacterias en la hemolinfa puesto que esto se podría interpretar como septicemia. Es difícil interpretar la significación clínica del aislamiento de bacterias de la hemolinfa de camarones; pero es necesario tener información el relacionarse con los números y la especie de bacterias colonizadas en camarones sanos, en orden para interpretar resultados anormales y para asistir a diagnóstico de la enfermedad clínica. Se ha probado que las bacterias pueden ser aisladas de la hemolinfa de crustáceos al parecer sanos, tales como *clarkii* de *Procambarus* (Scott y Thune, 1986), de *Homarus americanus* (Cornick y Steward, 1966), *sapidus* de *Callinectes* (Haskell, 1975). En el *Penaeus Monodon* (Issarasak et, inéditos) encontró que 27.7% del caldo se analizaban (119) bacterias llevadas en los hepatopancreas y/o la hemolinfa. De estas tinsiones, 36.3% fueron identificados como *V. alginolyticus*, *vulnificus* de 27.3% *vibrio parahemolítico*, de 18.2% *v. cholerae*, de 9.1% *V.* y 6.1% tinsiones no identificadas; la identificación fue realizada con los sistemas del API 20NE y del API NFT y otras pruebas adicionales.

1.4.3 Las bacterias patógenas en los criaderos del camarón de las bacterias patógenas encontradas comúnmente en camarón cultivan los sistemas, *vibrión* que los spp. Se consideran el género más importante (Lightner, 1993, Wilkenfeld, 1992). Típicamente, *vibrión* spp, que puede fermentar la sacarosa (colonias amarillas en agar de TCBS) se considera menos peligroso que los fermentos de la no-sacarosa, colonias verdes (Garriques y Wyoan, 1993, Lavilla-Pitogo, 1993). Los productores empíricos del camarón creen que un predominio de colonias verdes está relacionado fuertemente con las mortalidades (Garriques y Wyban, 1993). Dos enfermedades han causado problemas serios en alzarse de las larvas del *penaeidae*, debido a las infecciones bacterianas, y a ambas causadas por la especie del *vibrión*, de bacterias luminiscentes y de la enfermedad de las "bolitas". No se ha establecido ninguna correlación entre la productividad de los tanques que se criaban larvas y el tipo y los niveles del *vibrión* spp, colonizaron el ambiente larval. Sin embargo, una correlación altamente significativa.

1.4.3.1 Las bacterias luminiscentes entre los fermentos de la no-sacarosa del interés patógeno especial son las tinsiones bioluminescentes. Se ha demandado que tales tinsiones están causando una reducción del 70% en la productividad de criaderos

(Prayitno y Latchford, 1995). En Tailandia durante un período de mortalidades totales en un criadero, los 64% de las tinsiones aislado del agua eran luminosos con las poblaciones bacterianas hasta de 10^6 CFU ml^{-1} , mientras que de las bacterias aisladas de tanques sanos, sólo los 2% eran luminiscentes. Todas las tinsiones aisladas de las larvas eran luminosas, y afligen y fueron identificadas por métodos tradicionales como *V harveyi*. (Le-Groumellec-Groumellec, inéditos). En las Filipinas que la ocurrencia de las larvas luminiscentes del camarón debido a la infección bacteriana se ha detectado desde 1987, con densidades de la célula de hasta 8.6×10^4 por mysis, todos los aislantes eran morfológico idéntico y luminiscente (Lavilla-Pitogo, 1990). Identificación de los aislantes con las pruebas bioquímicas tradicionales rendidas del *V harveyi*. Y del *V splendidus*. En Ecuador las primeras ocurrencias fueron observadas en 1988, pero aquí las tinsiones fueron identificadas con el sistema del API, en la orden de la importancia, como *vulnificus* del vibrio parahemolítico, del *V.*, *alginolyticus*. y *V damsela*. (Lightner, 1993). Los encargados del criadero observaron que estas tinsiones llegan a ser rápidamente resistentes a las drogas anti-bacterianas comúnmente usadas.

1.4.3.2 La enfermedad mas importante de Bolitas que afectaba larvas ocurrió en 1989 y desarrolló el excedente en los años siguientes para convertirse en la causa primaria de las mortalidades del criadero entre 1990 y 1992 en Ecuador (Griffith, 1995). El término "bolitas" fue acuñado debido a la tripa o las células epiteliales esféricas, redondeada-para arriba y mudada de los hepatopancreas que se consideran en la zona digestiva de larvas afectadas. Estas mortalidades era la causa de hasta 90%. En México la enfermedad se ha encontrado extensivamente al afectar de proto-zoea I i II; después las larvas dejan de alimentar y mueren al menos en 24 horas (datos inéditos). Aunque en Ecuador la incidencia principal está en la etapa de postlarvas que las mortalidades significativas también ocurren en las etapas de las larvas, las bacterias responsables se han identificado como *V harveyi*. (Zherdmant, 1996). El desarrollo de un sistema que anotaba para las densidades bacterianas demostró que el desarrollo de "bolitas" es precedido por un desequilibrio en la flora bacteriana dentro del sistema de cría, con una disminución del *V alginolyticus* y una subida del vibrio parahemolítico (Griffith, 1995).

1.5 PROBIÓTICOS EN ACUACULTURA.

El uso de antibióticos es práctica común en todos los criaderos del camarón en América latina, donde no hay restricciones en su uso, o donde no se hace cumplir ningunas restricciones legales. Ni uno ni otro está allí para cualquier procedimiento establecido para la aprobación de los; antibacteriales en acuicultura (Weston, 1996). Un peligro de su abuso es el desarrollo de tinsiones resistentes de las bacterias que pueden transmitir rápidamente esta característica a otras tinsiones o aún a la otra especie vía plasmidias. Hay un interés en aumento dentro de la industria en controlar el uso de antibióticos o, si es posible, evitar su uso. La noción de criar larvas en un ambiente "estéril" era popular, pero ahora la mayoría de la gente apunta promover una ecología microbiana sana dentro de los tanques que crían larvas. Un sistema equilibrado integrado por la especie múltiple de microorganismos pudo ser el mejor ambiente en el cual las larvas podrían convertirse; pero los problemas podrían presentarse cuando ocurre un desequilibrio y algunas floraciones patógenas potenciales de la tinsión. Un cambio asociado en los parámetros ambientales podía accionar virulencia en patógeno potenciales y en la misma tensión del tiempo las larvas que hacían más susceptibles a la infección. Una forma para mantener un ambiente equilibrado puede ser logrado con el uso o las tinsiones probióticas; empleando bacterias beneficiosas para controlar patógenos potenciales, un acercamiento que está ganando la aceptación dentro de la industria. Se documenta bien que la comunidad microbiana dentro de la tripa de algún animal confiere una cierta resistencia del grado contra una enfermedad (véase la sección 1.2.2). En poblaciones naturales la microflora de la tripa origina en gran parte del ambiente acuático, pero en culturas larvales casi axenicas masivas, el equilibrio ha sido cambiado por el uso del agua, de microalgas, del nauplio de artemia, y de antibióticos desinfectados, debido a estos factores, las larvas no tienen probablemente una comunidad microbiana protectora dentro de ellos ni en el ambiente. Los postlarvas se criaron en el ambiente relativamente estéril y tienen una supervivencia pobre cuando se exponen a las poblaciones microbianas complejas. Son particularmente susceptibles a la enfermedad cuando están expuestos a las condiciones de la tinsión ambiental y de bacterias potencialmente patógenas. Varias bacterias se han utilizado en los cultivos larvales de los organismos

acuáticos, entran directamente en el agua o mediante un portador vivo tal como rotíferos o nauplio de artemia.

1.5.1 CAMARÓN.

No hay información científica sobre el uso de bacterias como probióticas en los sistemas de larvicultura del camarón. Los experimentos tempranos empezaron cuando los gerentes de la producción a los criaderos quisieron mejorar los niveles de vibrios "bueno, a saber el fermento de sacarosa (Garriques y Wyban, 1993). En algunos criaderos se agregó el azúcar comercial para reforzar el crecimiento del spp de *Vibrio* sacarosa-fermentado. Después tales bacterias eran cultas en la misma manera como la microalga y agregó a los tanques larvales (Garriques y Wyban, 1993,; Daniels, 1993). Griffith (1995) informó que desde el uso de probióticos en Ecuador en 1992 a bajo-tiempo del criadero estaba anualmente reducido de 7 días es decir un mes a 21 días y los volúmenes de la producción aumentaron por 35% y el uso de antibiótico global disminuidos por 94%.

En Asia se han usado varias especies de bacterias en larvicultura de *P. monodon*. Y *P. penicillatus*. Con los resultados prometedores (Anónimo, 1991), pero el informe es casi con ningún datos. Es importante mencionar que ninguna explicación se dé en el criterio empleado para la selección de cierto probiótico. Maeda (1988 y 1992a) probó la suma de "extracto de la tierra estéril el blum de diatomeas y dar a los tanques con larvas de *P. monodon*; se logró la supervivencia aparentemente alta con este tratamiento comparado al tratamiento dónde sólo las diatomeas fueron agregados, pero esto sólo duró durante los primeros cuatro días del experimento. Al final, ambos tratamientos produjeron los resultados similares. Las diferencias son difíciles identificar sólo hay datos muy limitados subsecuentemente se presentó. Al parecer se pensaba que el extracto de la tierra permitía el crecimiento de otros microorganismos que podrían tener un efecto beneficioso en la actividad larval. Desgraciadamente la naturaleza de estos artículos no permite evaluar la información críticamente.

Garriques y Arevalo (1995) probó una tinsión de *Vibrio alginolyticus* aislada del agua de mar al lado de su criadero. Ninguna mortalidad se observó en un patógeno de desafío de baño se probó, considerando que 100% mortalidad se obtuvo con un *V. parahaemolyticus*. Después

de 96 horas. Las densidades de bacterias agregadas para desafiar las larvas eran 2×10^3 ml de las células. En un período de pruebas 3 veces en las fechas diferentes, después de introducir el probiótico a los tanques criando larvas, la media supervivencia era 90.1% y el peso mojado 7.8 mg; los tanques que se trataron con los antibióticos produjeron 83.8% de supervivencia y 6.0 mg, los mandos promediaron 74.5% y 7.1 mg. las cuentas Bacterianas no mostraron ninguna colonia verde en los tanques con probiótico y algunos aparecían en el mando con tratamientos antibióticos. Ningún análisis estadístico fue hecho, pero analizando los datos presentados en el artículo, aunque un pseudoreplicador fue realizado a tiempo, ninguna diferencia estadística en la supervivencia y el peso mojado fue observado (una manera ANOVA, $p = 0.204$ y $p = 0.101$ respectivamente). Garriques y Wyban (1993) obtuvo los resultados similares pero ellos observaron esas larvas crecidas con el probióticos eran más grandes y más activos y ninguna bacteria luminosa fue observada.

1.5.2 CANGREJOS.

Nogami y Maeda (1992) y Maeda (1992a) aisló las bacterias del agua de mar y las inoculó al cangrejo el trituberculatus de Portunus en los tanques larvales a las densidades de 10^6 ml⁻¹ de las células. Ellos obtuvieron una supervivencia de 27.2% con la tinsión agregada comparada a 6.8% del mando dónde ninguna bacteria fue inoculada. Ellos también notaron que esta tinsión, PM-4 nombrado, pudiera inhibir el crecimiento de un "supuestamente patógeno" el anguillarum de Vibrio en el vitro experimenta, y supuestamente la presencia de otro spp de Vibrio. Y bacterias pigmentarias en los tanques larvales. A pesar de la inoculación repetida, el nivel bacteriano no excedió 10^6 mF de las células. Los autores atribuyeron este efecto al comportamiento cubierto de protozoarios. Ellos identificaron la tinsión como un posibles spp de Pseudomonas. O spp de Deleya., pero con alguna prueba. La selección de esta tinsión particular era debida a su habilidad de reprimir el crecimiento de bacterias patógeno.

La selección de esta tinsión era debido a su capacidad de reprimir el crecimiento de bacterias patógenas. Maeda (1994) divulga otra vez los mismos resultados que en el artículo anterior, pero algunos comentarios adicionales vale la consideración. Él indica que la población máxima de

bacterias que un ecosistema de acuicultura puede mantener en más de 106 cell/ml. Si esto es verdad, él sugiere que eso la adición de una tinsión bacteriana a un sistema que se utilizaba y mantener a la población en ese nivel pudieran disminuir o perjudicar otras bacterias. Él considera eso que controla a la población bacteriana puede no ser muy difícil, aunque el efecto de las bacterias agregadas puede no durar de largo. Otros experimentos se han realizado con diversos alimentos microbianos para los niveles de las bacterias que controlaban (Maeda, 1992) y mejorar la supervivencia de las larvas del trituberculatus de Portunus. Los resultados no están claros y la supervivencia divulgada comparada con el control es variable dependiendo de la composición de la flora microbiana, mejora a veces que el control (75 contra el 45%) pero otra no mide el tiempo más bajo (11 %). de ninguna variación se divulga para cada tratamiento, así que poco puede ser concluida. El trabajo divulgado con respecto a larvas del trituberculatus de Portunus carece la descripción clara de diseños experimentales, allí no era ningún dato referente a la variabilidad dentro de los tratamientos presentados con la ausencia obvia del análisis estadístico que pudo permitir conclusiones válidas. Dos réplicas en un experimento que trata de las larvas crustáceas son excesivamente bajas y casi nada se puede deducir. Poco se puede concluir de estos experimentos aunque algunos asuntos discutidos son interesantes.

1.5.3 Las bacterias y especialmente el vibrión spp, de las ostras son patógeno importantes en las larvas cultivadas de la ostra (Eistcn, 1981) y los probióticos se han utilizado en una tentativa de controlarlas. Una bacteria identificada como CA2, un *Alteromonas* spp. (Douillet y Langdon, 1993 y 1994) fue utilizada posiblemente en larvicultura de las gigas del crassostrea de la ostra. El alimento de las larvas de la ostra son las algas y estas bacterias demostró que una supervivencia realzada (21-22%) y el crecimiento (16-21%) comparado con ésos alimentaron con algas solamente. La evidencia experimental de los autores sugiere que las bacterias pudieron haber proporcionado los alimentos esenciales no presentes en las algas, o haber mejorado la digestión larval proveniente las enzimas digestivas (Douillet y Langdon, 1994). Pero puesto que encontraron adverso, las tinsiones neutrales y beneficiosas de bacterias concluyeron que "ninguna generalización sobre los efectos beneficiosos de tinsiones bacterianas específicas no puede ser hecha."

1.5.4 Los pescados se ha demostrado que las platijas del adulto, rodaballo (*maximus* de *Scophthalmus*) y las bacterias marinas del puerto del lenguado (*Limanda Limanda*) capaces de suprimir el crecimiento del *Vibrio anguillarum* (Olsson, 1992), y que pudo actuar como probióticos contra tales patógeno. La flora de la tripa también desempeña un papel importante en la determinación de la supervivencia de la larva del rodaballo, aunque no se observó ninguna correlación entre el número de bacterias en la tripa y las tarifas larvales de la supervivencia (Munro, 1994). Recientemente, Austin. (1995) divulgaron que una tinsión del *Vibrio alginolyticus* era eficaz en la reducción de la enfermedad causada por el salmonicida de *Aeromonas*, y 2 el vibrión patógeno spp, en los salmones atlánticos *Salmo salar*. Tarifas mejores de la supervivencia fueron alcanzadas con el probiótico que se uso, a veces como una mejora del 82%. Es importante observar que la tinsión fue aislada de un criadero del camarón en Ecuador y probada contra tinsiones de las aguas temperadas (Escocia, Inglaterra y Noruega) y una de Tasmania. Los rotíferos son principalmente un alimento vivo al utilizarse las larvas de los pescados, así una cierta investigación se ha dirigido a una mejora de su calidad microbiana. Gatesoupe (1989) demostró que las bacterias asociadas a los rotíferos podrían ser perjudiciales a las larvas del rodaballo, solamente inoculación de las bacterias probióticas (*bacilo toyoi*) a los rotíferos desinfectados, realzó el índice de crecimiento del rodaballo. El *Vibrio alginolyticus* fue detectado donde quiera que los rotíferos y el rodaballo sanos fueran levantados y ocurrió el *aeromonas* spp, era dominante en tanques con altas mortalidades (Gatesoupe, 1990). *Lactobadillus plantarum* y *helveticus* del L. también fue utilizado como añadidos de la alimentación para los rotíferos. La adición del L. *plantarum* aumentó la densidad demográfica de rotíferos, redujo las cargas bacterianas aerobias y aumenta el valor dietético de los rotíferos; Con una inhibición del patógeno salmonicida del *aeromonas* (Gatesoupe, 1991a). La selección de una especie del lactobacilo no estaba clara. Las esporas de los spp, de *bacilo* inhibieron el crecimiento del vibrión spp. En el cultivo de rotíferos con una mejora del peso del rodaballo (Gatesoupe, 1991b). Bogaert. (1993) aplicaron el *faecium* de *Enterococcus* al cultivo de rotíferos, refiriéndoles como probiótico. En este caso, solamente su papel como alimento fue examinado, pero no se proporcionó ningun datos para determinarse si las bacterias actuaban de una cierta manera

como probióticos, puesto que hay una diferencia entre un probiótico y un alimento.

1.6 LA JUSTIFICACIÓN.

La selección de las bacterias probióticas potenciales para la larvicultura del camarón casi se ha hecho sin base científica. La razón principal que los encargados del criadero tienen que seleccionar el vibrión spp, de la fermentación de la sucrosa es la asunción que las buenas producciones de las larvas están asociadas al nombre de este tipo de bacterias. Aunque una asunción válida, hay muy pocos informes científicos que apoyan esta idea. En el estudio siguiente, se presenta una metodología que se puede emplear para seleccionar bacterias probióticas. Los elementos considerados como importante seleccionar las bacterias probióticas para utilizar larvas de camarón eran la adquisición de las tinsiones y de los métodos del candidato para su caracterización e identificación (capítulo 3). Era importante evaluar la capacidad de estas tinsiones hacia fuera de competir las tinsiones similares y los potencialmente patógenos, en medio sólido y también en un similar medio líquido al ambiente que se utilizaban larvas (capítulo 4). Las características potencialmente patógenas de las tinsiones tuvieron que ser evaluadas para rechazar esas tinsiones que pudieron presentar un riesgo a las larvas y también a los camarones juveniles (capítulo 5). Una vez que sea potencial las tinsiones probióticas fueran seleccionadas; tuvieron que ser probadas en las condiciones que se alzaban reales y el sistema observado para las mejoras en el funcionamiento de las larvas (capítulo 6). Puesto que los sistemas que se utilizaban larvas en ambientes complejos donde están implicadas muchas variables, un sistema modelo simple fue puesto en ejecución para observar el funcionamiento o las bacterias potencialmente probióticas. Porque este estudio se ordena para solucionar problemas en la industria, también una investigación fue conducida para desarrollar un medio económico para que crezcan las bacterias potencialmente probióticas convenientes para las condiciones de un criadero

CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS GENERALES

2.1 LA BACTERIOLOGÍA.

Este capítulo presenta el material y los métodos generales usados en más de un capítulo de esta tesis. Los materiales y los métodos, que fueron utilizados solamente en un capítulo, se presentan en el capítulo apropiado, con cualquier modificación a los métodos generales.

2.1.1 Las tinsiones para los cultivos que fueron crecidas en el agar tryptic de la soja (TSA) o el caldo tryptic de la soja (TSB, Difco, Michigan los E.E.U.U. o Bioxon, México), a el cual 2.0 % de NaCl fueron agregados para obtener una concentración final de 2.5 %. El cultivo fue incubado en 30°C para 20-24 hora o 48 horas para algunos cultivos. Donde indicadas de otra manera, los cultivos tryptic de la soja (TSA o TSB) fueron preparadas siempre con la adición de 2.0% NaCl. Toda la solución salina empleada fue hecha con agua destilada y 2.5% NaCl. Esterilizado por Autoclave en 121°C por 20 minutos.

2.1.2 La preservación de las tinsiones fue preservada en -70°C en un congelador mecánico de baja velocidad (Revco, los E.E.U.U.) según la técnica propuesta por Gherna (1994); Los granos de cristal fueron lavados y sumergidos en una solución de el 2% HCl por 4 horas, lavado a fondo con agua destilada y secado en un horno en 150°C. Cryovials (1.5 ml, Nalgene, los E.E.U.U.) fueron llenados de los granos de 20-25 cristales y esterilizados en 121°C por 20 minutos. Las tinsiones puras fueron preservadas en las cuevas de TSA cubiertas con aceite mineral como método de la preservación. No más que un mes más adelante, las tinsiones fueron recuperadas de las cuevas y plateadas en los platos de petri con TSA; después del crecimiento, suspendieron a las colonias en TSB del + glicerol 15% como cryoprotectant hasta que una turbiedad similar a un 0.5 estándar de MacFarland ' fue obtenida (aproximadamente 1.0×10^8 células ml⁻¹). Fue llenado de la suspensión bacteriana, y después de que algunos minutos el líquido quitara con una pipeta estéril de Pasteur.fue etiquetado y almacenado en el congelador de Ultralow en -70°C en menos de 15 minutos después de la inoculación.

2.1.2.1. Recuperación de la tinsión. Para recuperar tinsiones de la preservacion, un grano fue obtenido y colocado en un tubo de prueba con TSB en 25-30°C e incubado durante la noche en 30°C con la agitación constante. Entonces, una muestra fue obtenida y rayada en TSA e incubada en 30°C para 20-24 horas.

2.1.3 Las suspensiones bacterianas para todos los experimentos donde estaba necesaria una suspensión bacteriana de células bacterianas puras, el procedimiento siguiente fueron empleadas: Las tinsiones fueron recuperadas del congelador del ultralow e inoculado en TSB, el caldo fue incubado en 30°C para 20-24 horas. Diez ml del caldo fueron centrifugados en 5.000 RPM por 10 minutos en 10°C (Beckman, los E.E.U.U.), después de lo cual el fue desechado y la pelotilla fue suspendida en la solución salina estéril. Este proceso fue repetido otra vez y la concentración de la célula fue ajustada a una densidad óptica de 1.00 en 610 nm en un espectrofotómetro (HACH DR-2000). Esta suspensión era igual a un 0.5 CFU ml¹ del estándar de MacFarland (aproximadamente 1.0 x 10⁸). Para estimar la densidad bacteriana alcanzada, la suspensión fue diluida en serie en salino estéril y la extensión plateada en TSA o el agar marina (Difco Michigan los E.E.U.U.).

2.1.4 El análisis bacteriológico del agua, las larvas y las muestras de agua de los postlarvas fueron recogidos, diluido en serie en salino estéril y 0.1 ml fue separado, plateó con una barra de cristal en los platos de petri (diámetro de 10 milímetros) con TSA, TCBS o agar marina como necesario. Las larvas o las postlarvas fueron recogidos en condiciones estériles, lavado a fondo dos veces con salino estéril y macerado en un homogenizador de cristal del tejido fino. A veces 5-10 larvas fueron maceradas juntas con un homogenizador de 5.0 ml, y las larvas a veces fueron maceradas en un homogenizador de 0.1 ml. Las diluciones en series fueron preparadas a 0.1 ml fue separado y plateado en TSA, TCBS o agar marina. Todas las muestras fueron incubadas en 30°C para 24-48 horas y la colonia que formaba las unidades (CFU) contadas con un contador de colonia de Quebec. Si el agar de TCBS fue utilizado, entonces el color de la colonia fue registrado.

2.2 2.2.1 La cría de larvas de camarón, *penaeus vannamei* y a veces los *penaeus stylirostris*., fueron cultivados en un criadero en la

parte costera de Manta en ECUADOR. Los huevos de varios animales fueron obtenidos por la inseminación natural o artificial, recogidos y colocados en un tanque común. Después de 24 horas el nauplio (n) eclosionó y una muestra fue embalada y llevada a las instalaciones del laboratorio Alfa y Omega en Manta. Las etapas 2-3 del nauplio fueron recogidas generalmente, pero a veces, fases más posteriores fueron obtenidas. El nauplio aclimatado lentamente a 28°C en un índice de 1°C por 15 minutos (McVey y Fox, 1983) e izquierdo durante la noche en 20 envases de 20 lt. La mañana próxima, el nauplio fue contado individualmente, y la densidad deseada para cada experimento fue almacenada, generalmente 120.nauplios. Cuando solamente la etapa 4-5 de Nauplio era la protozoa 1 disponible (Z1) fueron almacenadas al día siguiente. Las larvas fueron alimentadas con (el 30%) de las microalgas Isochrysis (Treece y Yates, 1990) y Chaetoceros o el SP de Chaetoceros (el 70%) para las primeras etapas protozoa, sp. de Tetraselmis fue utilizado para alimentar las últimas protozoas y las primeras etapas de mysis (m) (cuadro 2.1 a). Cuando mudaron a mysis, Artemia congelada, fue provisto en una densidad del nauplio. ml⁻¹ de la artemia 1-3 dependiendo de la etapa de mysis. Las microalgas fueron mantenidas en un mínimo de 75.000 células ml⁻¹. No se emprendió ningunos recambios del agua durante los ensayos, que duraron a partir 7 a 12 días que terminaban cuando las primeras postlarvas (PL) fueron observadas. Excepto en los experimentos con 400 L en tanques donde las estimaciones de la población fueron hechas la mayoría de los días.

2.2.2 Los sistemas que se utilizaban en larvas eran tres sistemas que fueron empleados para cultivar larvas penaeidae según lo descrito abajo (fig 2.1^a). El agua para todos los sistemas fue filtrada a 10 μ m y con el carbón activado y UV esterilizados. Ácido, etilendiaminotetraacetic el de los metales pesados (EDTA) en una concentración de 10gr que el magnesio /ML¹ fue agregado (el weeney de Wyban y de S, 1991) para matar a las esporas de los hongos, trifluralin (Treflan, Elanco) en 0.1 ml⁻¹ fue agregado (Williams, 1986). Al sistema del tanque.

2.2.2.:1 Este sistema contuvo 12 tanques plásticos circulares con una capacidad de 400 L cada uno (fig. 2.1b). Los tanques fueron

llenados de 100-150 L del agua de mar filtrada (10 μ m solamente) antes de que las larvas fueran agregadas, después cada uno o dos días 50 más se agregaron. Cada tanque fue calentado individualmente por medio de un calentador de inmersión de 150 W con el termóstato. Las larvas fueron cosechadas a través del tubo del descarte, que conectó los tanques en el fondo. Para prevenir el agua que fluía entre los tanques, un tubo vertical fue colocado sobre el enchufe en el centro de cada tanque.

2.2.2.2 El sistema experimental consistió en 2 botellas plásticas de 1 (fig. 2.2a), cada botella fue aireado individualmente mantuvo en la sala de mando de la temperatura (fig. 2.2b). Normalmente 120 larvas de Protozoa 1 fueron almacenadas en cada botella, que contuvo un litro de agua de mar. No se hizo ningunos intercambios del agua durante los ensayos, que duraron a partir 7 a 9 días que terminaban cuando las primeras postlarvas fueron observadas. Había seis réplicas de cada tratamiento, y todos fueron sujetos a las mismas fluctuaciones fisicoquímicas externas.

Fig2.1a.tanques para pruebas sin probiótico

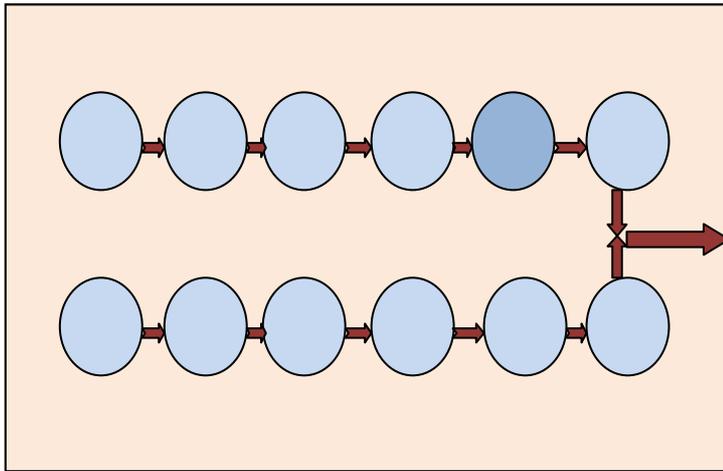
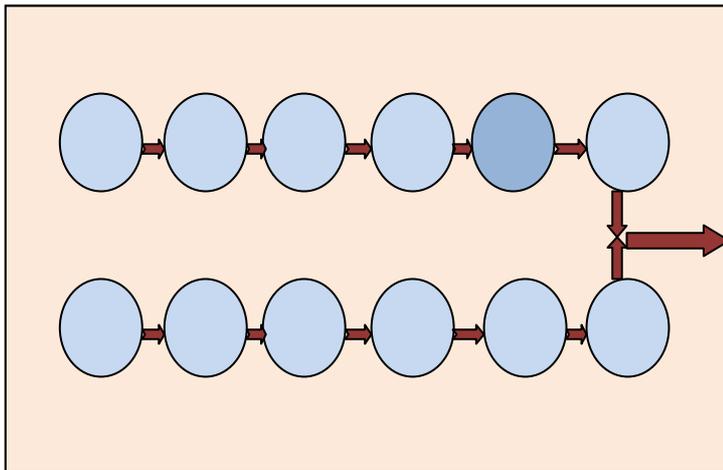


Fig 2.1b.tanques para pruebas con probióticos



2.2.2.3 El sistema de los frasco el segundo sistema era una mejora en, vez de las botellas plásticas, los frascos de cristal utilizados son redondos de 500 ml era (fig. 2.2a) permitir el empleo a partir de 25-36 elementos experimentales (fig. 2.2d). Los frascos fueron sumergidos parcialmente en el agua dulce, que fue calentada y controlada con un termóstato en $28 \pm ^\circ\text{C}$ (fig. 2.2c). El agua de mar que se utilizaba fue tratada según lo descrito pero no se agregó ningún producto químico, también fueron esterilizados en una autoclave en 121°C por 60 minutos (16-20 l a la vez). Los tubos fluorescentes con un fotoperiodo de 12 horas, iluminaron los frascos. Cada frasco fue aireado individualmente y el aire fue filtrado a través de un 0.45 filtro de um todos los frascos y los accesorios que estaban en contacto con las larvas o el agua de mar fueron esterilizados en un horno a 180°C por lo menos 2 horas o esterilizados en 121°C por 30 minutos.

2.3 EI ANÁLISIS DE DATOS.

Todos los datos fueron probado para la normalidad usando la prueba de Kolmogorov- Smirnov (con la corrección de Lilliefors) (homogeneidad de variaciones, de la prueba mediana de Levene). Las diferencias entre tratamientos de paramétricos fueron hechas con una t-prueba para dos sistemas de datos o de una forma del análisis de la variación (ANOVA) para 3 o más datos No-paramétricos fueron procesados con una prueba de Mann-Mann-Whitney (H-prueba) para dos sistemas de datos o con una prueba de Kruskal- Wallis para 3 o más (Zar, 1996). Para determinar diferencias entre los tratamientos, el método múltiple de una comparación del Estudiante-Neuman-Keuls (SNK) fue utilizado. Para una correlación paramétrica, la correlación del momento del producto de Pearson fue utilizada.

Pruebas con larvas en botellas plásticas

Fig 2.2a



Fig 2.2b



Fig 2.2c



Fig2.2d



CAPITULO III

3. ADQUISICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE TINSIONES BACTERIANAS.

3.1 LA INTRODUCCIÓN.

Muchos encargados de criadero en Ecuador han aislado tinsiones potencialmente probióticas del agua de mar delante de sus criaderos (Daniels, 1993; Garriques y Wyban, 1993; Garriques y Arevalo, 1995; y comunicación personal con varios encargados) o de los tanques que se utilizaban en larvas fueron acertados (Daniels, 1993; Zherdmant et al., 1997). Plantearon muestras directamente en agar de TCBS y aislaron a colonias amarillas grandes. Muchos de éstos han sido identificados como *Vibrión alginolyticus* por el API 20NE, API NFT o el sistema más recientemente posible introducido del API 20NE y un sustituto al sistema del API NFT (BioMerieux, Lyon, Francia). La identificación de bacterias acuáticas se ha realizado con los sistemas diseñados para las muestras clínicas y los resultados han sido no fiables. Los 30% de tinsiones bacterianas aisladas de las muestras del agua dulce recogidas en ambientes de superficies profundos fueron identificados con el sistema del API NFT (amy et, 1992). Las tinsiones aisladas del agua de río fueron identificadas con el análisis del éster metílico del ácido graso (FAMA) y con el API NFT; el último solamente 6% identificado de las tinsiones con un alto grado de confianza y el 44% no se podrían identificar en todos (Brown y Leff, 1996). El nuevo API 20NE se ha empleado para los aislantes acuáticos no fermentantes, proporcionando la identificación a 78.3% de los aislantes al nivel de género y a 32.6% a las especies llano (Chungkin y Kou, 1994). Este sistema también se ha empleado con los aislantes del camarón enfermo (al. de la e de Mohny, 1994). Se han obtenido los resultados variables cuando el sistema del API 20E fue aplicado a las bacterias acuáticas. De bacterias patógenas de los pescados calientes del agua, 65.8% fueron identificados con este sistema, aunque los resultados cuestionables fueron observados en algunas pruebas (sastre, 1995). Los aislantes del infante de marina demostraron inconsistencias en los resultados dependiendo del medio en el cual las bacterias fueron suspendidas, y en las pruebas donde el aceite mineral fue empleado para crear condiciones anaerobias, una reducción escasa en el nivel de la onza fue

alcanzada (Hansen y Sorheim, 1991). Toranzo et al. (1986) propusieron que las tinsiones del aeromonas podrían ser identificadas solamente si el índice del perfil usado para identificar con los sistemas del API no fue empleado como criterio y si algunas pruebas de reserva adicionales fueron utilizados. Identificaciones erróneas también encontradas de Kent (1982) de las especies de Pasteurella y del vibrión por índice del perfil de API-20E, aunque la mayoría de reacciones era exacta. Los resultados similares fueron obtenidos para las cepas (Biosca del vulnificus del V. 1993).

El sistema de BIOLOG-GN (Biolog, Hayward, California) se basa en la capacidad de un microorganismo de oxidar 95, diversas fuentes del carbón, que se arreglan en una placa 96-microaceite, incluyendo un control (agua). Se diseña para identificar tinsiones ambientales y veterinarias. El sistema se basa en el intercambio de los electrones generados durante la respiración que conduce a un cambio tetrazolium-basado subsecuente del color (Molinero y Rhoden, 1991). Identificó con éxito el 98% de tipo tinsiones (ATCC) al nivel género y el 59% a las especies. Solamente 44% de aislantes subsuperficies del agua fueron identificados a un índice de la semejanza sobre el 0.5 recomendado (amy et al., 1992), mientras que son los 93% de aislantes de un sistema de la filtración del agua potable se identificaron con este sistema (Klingler et al., 1992) y 57.1% fueron alcanzados para algunos enterobacterias (Molinero y Rhoden, 1991). El sistema de Biolog también se ha utilizado para identificar tinsiones del agua salada. De tinsiones no fermentantes acuáticas, 76.6% fueron identificados al género y 23.4% a las especies llano, donde las pseudomonas fueron identificados con más éxito posible (Chungkin y Kou, 1994). La flora bacteriana de la artemia fue identificada con un alto grado de confianza aunque las tinsiones fueron aisladas de un ambiente altosalino (Straub y Dixon, 1993). También ha permitido las identificaciones específicas de el 72% de tinsiones del vibrión aisladas de hepatopancreas, hemolinfa y zona digestiva de los camarones juveniles sanos del penaeidae (Gomez-Gil et al., los inpress). Las tinsiones que vienen del cultivo baja pelada (Nedoluha y Westhoff, 1997), producción del rotífero (Verdonck, 1997) también se han identificado con este sistema. La identificación de bacterias marina diseñó métodos para la medicina se ha descrito como no fiable (Austin, 1982; Hansen y Sorheim, 1991), aunque los datos recogidos

con unos o más sistemas se pueden utilizar para el análisis numérico de la taxonomía. Nicolas et al. (1996) emplearon los datos del sistema de Biolog para realizar análisis numérico con buenos resultados. La taxonomía numérica ha sido el método de opción para clasificar bacterias, y se puede definir como clasificación por grupos numéricos de unidades taxonómicas en base de sus características (Sneath y Sokal, 1973). Una discusión dominante en taxonomía numérica es que todos los caracteres tienen peso igual en la construcción de clasificaciones (Priest y Austin, 1993), en comparación con la taxonomía clásica donde algunos caracteres tienen más importancia que otras. Recientemente, un nuevo acercamiento a la taxonomía bacteriana se ha introducido, la taxonomía polyphasic, que tiene como objetivo la integración de diversas clases de datos y de información (genotípico y filogenética) sobre microorganismos (Vandamme et al., 1996). Aunque, debido a la complejidad de analizar todos los datos disponibles o potencialmente disponibles sobre una tinsión o tinsiones bacteriana, el acercamiento más directo es primero colocar un aislante en el marco genético y después para determinar sus relaciones más finas por medio de un acercamiento polibásico. La clasificación de aislantes nuevos o inusuales requerirá a menudo este sistema del análisis, que no está todavía fácilmente disponible para la industria de la acuicultura, y será probablemente en laboratorios de investigación.

3.2 OBJETIVOS.

Obtener las tinsiones patógenas potenciales en los ensayos e identificar el mejor probiótico para darle el uso necesario en acuicultura.

3.3 ADQUISICIÓN DE LOS MATERIALES Y LOS MÉTODOS.

3.3.1 TINSIONES.

3.3.1.1 dos muestras del agua de mar fueron obtenidos de un sitio al parecer no contaminado en aguas costeras de Manta. No más de 15 minutos más adelante, 0.1 ml de cada muestra fue separado directamente en agar de TCBS e incubado para 24-48 hora en 30°C. Seleccionaron según su morfología colonial y fueron purificadas a las

colonias en agar de TCBS y TSA con 2.0% NaCl. Todas las tinsiones aisladas del agua de mar limpia fueron cifradas con una "C" y un número (tabla 3.1).

3.3.1.2 Los aislantes de camarones enfermos y sanos de *Penaeus Vannamei* de los camarones fueron recogidos de las granjas camaroneras en Pedernales Manabí. Las muestras siguientes fueron observadas en el camarón enfermo: La anorexia, movimiento letárgico, músculo abdominal opaco, hepatopancreas atrofiado, coagulación lenta de la hemolinfa, y melanización de puntos en el exoesqueleto. Los camarones vivos fueron desinfectados con etanol del 96% y la hemolinfa recogida con una jeringuilla de 0.5 ml directamente del corazón. La hemolinfa era cultivada directamente sobre agar de TCBS. El camarón fue disecado y luego una porción de los hepatopancreas se utilizó en un sistema aséptico y se homogenizó en 10.0 ml de agua salino estéril (2.5%). El patógeno (0.1 ml) fue separado directamente sobre agar de TCBS. Ambas muestras fueron incubadas para 24-48 horas en 30°C. Uno de los camarones fue aclarado con salino estéril y la superficie del exoesqueleto raspado con un lazo. Un camarón con los puntos negros en el exoesqueleto fue desinfectado con etanol (el 95%) que la superficie externa de una lesión fue quitada con un scalpel y una muestra tomados de la capa subyacente. Ambas muestras fueron rayadas sobre agar de TCBS e incubaron según lo descrito arriba. Las tinsiones recogidas se presentan en la tabla 3.1

3.3.1.3 aislantes de un brote del síndrome de Zoea II que algunas tinsiones también fueron recogidas de las larvas que sufrían el "síndrome de Zoea II" en un criadero comercial en Manta Ecuador (tabla 3.1). La etapa larval de Zoea que demostraba muestras de la enfermedad claras fue recogida: a saber que exhiben el letargo, la zona digestiva vacía, Hepatopancreas, descoloridos reducido y con "Bolitas" en la zona digestiva. Las muestras fueron recogidas de un tanque que sufría del síndrome de Zoea II tratado recientemente con los antibióticos. Las larvas eran analizadas según lo descrito en la sección 2.1.4

Tabla. 3.1. La Identificación de tinsiones según el análisis de la taxonomía numérico con datos obtenidos con el sistema Biolog y el API 2ONE. (Después de figura 3.1a y 3.2b).

El racimo No.	Las tinsiones se arracimaron con los datos de Biolog	Identificación	Cepas con los datos Biolog y API 2ONE
1	C17, C7a	Photobacterium.spp.	C17, C7a
2	HL32, HP1	V. damsela	HL32, HP1
3	C6, LE3, HL34	V. Pelagius	C6, LE3, HL34
4	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus	V. alginolyticus	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus
5	HL57, HL58	V. parahaemolyticus	HL57, HL58
6	HL29, PB2	V. parahaemolyticus	HL29, PB2
7	C20, C8, EX1	V. campbellii	C20, C8, EX1
8	PB3a, PB5, PB8	V. natriegens	PB5, PB8

No se asignaron tinsiones en el paréntesis al racimo pero se identificaron como las mismas especies.

3.3.2 PRESERVACIÓN DE TINSIONES.

Según lo descrito en la sección 2.1.2.

3.3.3 LA CARACTERIZACIÓN DE LAS TINSIONES.

Para todos los procedimientos y la identificación, fue recuperada según lo descrito en la sección 2.1.2.

3.3.3.1 Escogieron con un palillo de madera estéril y fueron frotada a la colonia crecida fresca del oxidase A (20-24 horas) en un papel de filtro (Whatman, No. 1) impregnó con una gota del reactivo N, N, N', dihydrochloride N'-n'-tetramethyl-p--p del phenylenediamine (Punto-prueba 3550-26-8, Difco, Michigan los E.E.U.U.). Después de no más de 1 minuto un cambio al color violeta o azul fue colocado como reacción positiva del oxidase. En una reacción negativa el borrón de transferencia permanecía sin cambio del color.

3.3.3.2 Suspendieron a las colonias similares de Biolog-GN en salino estéril (2.5%) a una densidad óptica equivalente a un 0.5 estándar de MacFarland (108 células ml⁻¹). Cada uno de los 96 microwells de una placa de Biolog-GN fue llenado de 150 UL de la suspensión bacteriana. La placa fue incubada para 24 y 48 horas en 30°C y el cambio del color fueron registradas en un lector de ELISA en una longitud de onda de 595 nm. El pozo del control fue utilizado para ajustar una lectura cero. Las lecturas ajustadas fueron incorporadas en una base de datos e identificadas con el software de Microlog 2 (Biolog, Hayward, California). Las fuentes del carbón empleadas en las placas de Biolog-GN se enumeran en la tabla 3.9.

3.3.3.3 Este sistema de API-20NE consiste en 20 tubos que contienen los substratos deshidratados, que se enumeran en la tabla 3.10. Las bacterias se inoculan con los procesos como en la sección 2.1.3 según las modificaciones recomendadas por MacDonell et al. (1982). La suspensión fue utilizada en los medios tubos del terraplén 1-8 y 3 de éstos (glucosa, dehidrolase del arginine y urease) fueron llenados de aceite mineral estéril para crear una atmósfera anaerobia. De la suspensión bacteriana, 0.2 ml fue agregado a la ampolla con el medio AUX. Proporcionado y mezclado sin permitir que las burbujas formen. El resto de los tubos (12) fue llenado completamente de la nueva suspensión bacteriana. Después de 24 horas, los reactivos fueron agregados a algunos tubos según las instrucciones del fabricante. Los tubos fueron sellados con aceite mineral para parar el reactivo que interferían con los tubos adyacentes. Todas las reacciones fueron colocadas 48 horas después de la incubación en 30 °C.

3.3.3.4 Sensibilidad a 01129 El aislante fue examinado y fué separado como césped en TSA + 2.0% NaCl y dos discos con el agente vibriostático 0/129 (2, fosfato de di-ISO-PROPYLPTERIDINE 4-diamino-6,7-) en una concentración de, 10 y 150 fueron colocados en tapa. Después de un período de la incubación de 24 horas en 30°C, los halos de la inhibición fueron medidos. Los resultados fueron cifrados según lo descrito en la tabla 3.2.

Tabla. 3.2. La Identificación de tinsiones según el análisis de la taxonomía numérico con datos obtenidos con el sistema Biolog y el API 2ONE. (Después de figura 3.1a y 3.2b).

El racimo No.	Las tinsiones se arracimaron con los datos de Biolog	Identificación	Cepas con los datos Biolog y API 2ONE
1	C17, C7a	Photobacteriu/ ñ spp.	C17, C7a
2	HL32, HP1	V. damsel	HL32, HP1
3	C6, LE3, HL34	V. Pelagius	C6, LE3, HL34
4	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus	V. alginolyticus	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus
5	HL57, HL58	V. parahaemolyticus	HL57, HL57
6	HL29, PB2	V. parahaemolyticus	HL29, PB2
7	C20, C8, EX1	V. campbellii	C20, C8, EX1
8	PB3a, PB5, PB8	V. natriegens	PB5, PB8
No se asignaron tinsiones en el paréntesis al racimo pero se identificaron como las mismas especies.			

3.3.3.5 La sensibilidad a los antibióticos en la prueba de la difusión del disco (Bauer et el al., 1966) fue modificada para caracterizar la sensibilidad del antibiótico de las tinsiones. Las tinsiones fueron suspendidas en salino estéril (2.5%) y la extensión en el agar de la Moleta-Hinton (Mh) suplido con 2.5% Nad; un círculo de la prueba que contenía 12 discos de 7.0 milímetros (sensidisks gram-negative de Sanofi) unidos fue puesto 5 minutos después de la inoculación. Las placas fueron incubadas (24 horas, 30°C) y los halos de la inhibición se midieron. Los antibióticos probados se presentan en la tabla**3.3**

Tabla. 3.3. La Identificación de tinsiones del ciustered según el análisis de la taxonomía numérico con datos obtenidos con el sistema Biolog y el API 2ONE.

El racimo No.	Las tinsiones se arracimaron con los datos de Biolog	Antibióticos Usados	Cepas con los datos Biolog y API 2ONE
1	C17, C7a	Amikan.	C17, C7a
2	HL32, HP1	Ampicilina	HL32, HP1
3	C6, LE3, HL34	Cephalotin	C6, LE3, HL34
4	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus	Cloranfenicol	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus
5	HL57, HL58	Celotaxine	HL57, HL57
6	HL29, PB2	Gentamicina	HL29, PB2
7	C20, C8, EX1	Netilmicina	C20, C8, EX1
8	PB3a, PB5, PB8	Trimetropin	PB5, PB8

No se asignaron tinsiones en el paréntesis al racimo pero se identificaron como las mismas especies.

3.3.4 IDENTIFICACIÓN DE TINSIONES.

Los datos obtenidos de la caracterización de la tinsión eran analizados con un procedimiento de la numeración taxonómica. Con los diagramas generados con este procedimiento y con la ayuda de la literatura, las tinsiones fueron identificadas a la especie. Los datos obtenidos de los autores siguientes fueron empleados para identificar las tinsiones cuando es posible: Era de Bauman/. 1972; Baumann y Baumann, 1977; Kent, 1982; Oliver, 1982; Baumann y Schubert, 1983; Gilardi, 1985; Sala et al.1986 Austin1988, Austin y Lee, 1992 y Barrow y Feltham, 1993.

3.3.4.1 La codificación de datos que derivaron de las pruebas fue agregada a una base de datos y cifró como la reacción positiva (1.0), la negativa (0) o intermedio (0.5). Las lecturas tomadas de las reacciones de BIOLOG-GN fueron transformadas según los criterios siguientes:
 ¿Reacción negativa si la lectura estaba debajo de 0.200 en 595 nm?
 ¿Intermedio si sobre 0.200 pero debajo de 0.300 nm? positivo si sobre

0.300 nm el pozo del control no considerado así teniendo solamente 95 reacciones con este sistema. El API 20E incorporó 20 reacciones más el oxidase y la sensibilidad al agente vibriostático 0/129 dio un total de 118 reacciones que caracterizan cada aislante, también llamado las unidades taxonómicas operacionales (OTU).

3.3.4.2 El análisis computarizado de los cálculos de semejanzas fue realizado con el coeficiente que emparejaba simple (Priest y Austin, 1993). La fórmula empleada era: donde A y D corresponden a los fósforos positivos y negativos, respectivamente; y B y C representan el número de caracteres que no emparejan entre los pares de OTU. La distancia euclidiana fue utilizada para calcular la desemejanza entre OTU según la ecuación siguiente: donde la adición del valor de todos los caracteres se calcula para cada OTU (el valor del primer OTU para un carácter dado (a) menos el valor del segundo OTU (b) para el mismo carácter). Un diagrama fue generado que representa la relación entre las tinsiones analizadas.

3.4 RESULTADOS.

3.4.1 SOLUCIONES DE TINSIONES.

Un total de 16 aislantes fue obtenido del agua de mar en Manta, 2 de las tinsiones era esparcidores en TSA (tinsiones C14 y C7b) y uno creció lentamente, tomando por lo menos 48 horas para crecer (tinsión C18). La tinsión C3 fue perdida durante el proceso que creaba una subcultura y solamente en ciertos datos podrían ser obtenidos. Nueve tinsiones fueron obtenidas de los camarones enfermos y sanos (tabla 3.1), cuatro aislantes fueron recogidos de las larvas que presentaban el síndrome de Zoea II. Tres tinsiones fueron aisladas de las larvas de zoea II (PB2, PB3a y PB5 cifrados) que no tenían ningún tratamiento antibiótico. Una tinsión fue aislada de las larvas que tenía tratamiento antibiótico 2 horas antes de la colección (PB8). Cinco tinsiones fueron obtenidas de colecciones del cultivo, de la colección nacional de las bacterias marinas (NCBM) que las especies siguientes fueron utilizadas: *Cavia del aeromonas* (13026), *hydrophila del A.* (1134), *Vibrión alginolyticus* (1903) y *fluvialis del V.* (2249). Del tipo *escherichia coli* (25922).

3.4.2 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE TINSIONES.

Los resultados de la caracterización de las tinsiones se realizaron con el sistema de Biolog se presentan en la tabla 3.9. Los resultados del API 20NE se presentan en la parte pasada de la tabla 3.1 con la sensibilidad a 12 antibióticos. Los caracteres útiles para identificar una tinsión al nivel género se presentan en la tabla 3.4 con los resultados para cada tinsión y la identificación genética. Todas las tinsiones aisladas eran barras gram-negativas cortas, excepto C18. Todo creció aerobio y era positivo del oxidase, excepto C18 y C7, aunque la reacción para C7 era dudosa.

Tabla. 3.4. La Identificación de tinsiones según el análisis de la taxonomía numérico con datos obtenidos con el sistema Biolog y el API 2ONE.			
El racimo No.	Las tinsiones se arracimaron con los datos de Biolog	Antibióticos	Cepas con los datos Biolog y API 2ONE
1	C17, C7a	Amikan	Negativo
2	HL32, HP1	Ampicilinal	Negativo
3	C6, LE3, HL34	Cefalotin	Negativo
4	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus, C18	Celotaxine	Positive
5	HL57, HL58	Cloranfenicol	Negativo
6	HL29, PB2	Nitrofurancín	Negativo
7	C20, C8, EX1	Netilmicinai	Negativo
8	PB3a, PB5, PB8	Sulfas	Negativo
No se asignaron tinsiones en el paréntesis al racimo pero se identificaron como las mismas especies.			

3.4.2.1 La taxonomía numérica resulta del análisis numérico de la taxonomía de los datos de Biolog produjo un diagrama (la fig. 3.1 a) con 8 racimos distintivos formó en el 85% de la semejanza (fig. 3.1b) y 9 no arracimaron tinsiones. 7 especies se podrían asignar a los 8 racimos (tabla 3.6) puesto que el racimo 5 y 6 ambos es la misma especie, aunque no agruparon en 80-85% de semejanza. Cuando un análisis fue realizado con datos del Biolog y de los sistemas del API 2ONE, 8

racimos fueron formados y 9 tinsiones también fueron encontrados (fig. 3.2). Las diferencias fueron observadas en el arreglo de las tinsiones en los racimos entre los dos diagramas (tabla 3.6).

3.4.2.2 La identificación de tinsiones que la tinsión C18 fue identificada como luteus del micrococo; las características siguientes fueron observadas que la clasificaron como micrococo: Cocos gram-positivo, no fermentado, aerobio, oxidase-negativo de la glucosa. El luteus del M. porque no creció en la glucosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, no demostró ninguna reducción de nitratos, y era positivo para la gelatina. C1 y C16 fueron identificados como *Stenotrophomonas*, pues eran negativos para la fermentación de la glucosa y el positivo para el oxidase y el motility. No hay identificación a la especie posible (tabla 3.7). La tinsión C12 fue identificada como *Pasteurella* debido a la fermentación de la glucosa, del motility negativo, del oxidase y de sensible positivos al agente vibriostático 0/129. Especie probable: *Multocida* del P. debido al ONPG positivo (b-b-galactosidase), al indol, al manitol de la sucrosa, al arabinose y al urease negativo. PB3a y RE8 fueron identificados como *flavobacterium*, las reacciones que permitieron esta identificación no eran ninguna fermentación de la glucosa, ninguna modificación y positivo del oxidase.

3.4.2.3 La identificación de tinsiones arracimadas filtra C13, C14, C20, C21, C6, C7, C7B, C8, C9, EX1, HL29, HL32, HL34, HL57, HL58, HP1, LE3, PB2, PB5 y PB8 fueron identificados como vibrión. Podrían fermentar la glucosa, eran motile, positivo del oxidase, sensible al agente vibriostático 0/129 y todos crecieron en el agar de TCBS (tabla 3.5) Racimo 1. Las tinsiones C17 y C7a fueron identificadas como *Photobacterium* en ambos análisis. Demostraron las reacciones similares como vibrión, pero no podían utilizar el D-d-alanine o el manitol. Racimo 2. Las tinsiones HL32 y HP1 fueron arracimadas juntas en diagramas, e identificadas como *V. damsela*. Debido a su capacidad de utilizar el D-d-mannose, demostrado una reacción positiva para el dehydrolase del arginine y el gelatinase, y no podían crecer en la sacarosa o la lactosa

Tabla. 3.5. La Identificación de tinsiones según el análisis de la taxonomía numérico con datos obtenidos con el sistema Biolog y el API 2ONE.

El racimo No.	Las tinsiones se arracimaron con los datos de Biolog	Identificación	Cepas con los datos Biolog y API 2ONE
1	C13	Photobacteriu/ spp.	C17, C7a
2	C14	V. damsel	HL32, HP1
3	C14,C20,C21,	V. Pelagius	C6, LE3, HL34
4	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus	V. alginolyticus	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus
5	HL57, HL58	V. parahaemolyticus	HL57, HL57
6	HL29, PB2	V. parahaemolyticus	HL29, PB2
7	C20, C8, EX1	V. campbellii	C20, C8, EX1
8	PB3a, PB5, PB8	V. natriegens	PB5, PB8
No se asignaron tinsiones en el paréntesis al racimo pero se identificaron como las mismas especies.			

Filtra C6, HL34 y LE3 fueron identificados como pelagius del V., aunque HL34 no fue arracimado cuando los datos de Biolog y del API eran analizados. Podían utilizar el ácido, la sacarosa y el mannose D-gluco'nicos; no podían utilizar el L-l-rhamnose y el ácido uno-keto-a-keto-glutaric.

Las tinsiones C13, C14, C7, C9, C21 y PB2 fueron identificadas como alginolyticus debido a su capacidad al enjambre en medios sólidos y utilizar la sucrosa y la lactosa. La tinsión PB2 fue asignada al racimo 6 en ambos análisis numéricos pero tenía características que se asemejaron al Vibrio alginolyticus. (Positivo y salida en enjambre de la sucrosa) más de cerca ese vibrio parahemolítico. C7 fue asignado al racimo 5 cuando los datos de ambos sistemas eran analizados. Aunque la tinsión C7b tenía características similares como las del racimo 4, no podía utilizar.

Tabla.3.6. La Identificación de tinsiones según el análisis de la taxonomía numérico con datos obtenidos con el sistema Biolog y el API 2ONE.

El racimo No.	Las tinsiones se arracimaron con los datos de Biolog	Identificación	Cepas con los datos Biolog y API 2ONE
1	C17, C7b	Photobacteriu/ spp.	C17, C7b
2	HL32, HP1	V. damsel	HL32, HP1
3	C6, LE3, HL34	V. Pelagius	C6, LE3, HL34
4	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus	V. alginolyticus	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus
5	C7	V. parahaemolyticus	C7
6	PB2	V. parahaemolyticus	PB2
7	C20, C8, EX1	V. campbellii	C20, C8, EX1
8	PB3a, PB5, PB8	V. natriegens	PB5, PB8

Tabla. 3.7. La Identificación de tinsiones según el análisis de la taxonomía numérico con datos obtenidos con el sistema Biolog y el API 2ONE.

El racimo No.	Las tinsiones se arracimaron con los datos de Biolog	Identificación	Cepas con los datos Biolog y API 2ONE
1	C17, C7a	Photobacteriu/spp.	C17, C7a
2	HL32, HP1	V. damsel	HL32, HP1
3	C6, LE3, HL34	V. Pelagius	C6, LE3, HL34
4	C7b	V. alginolyticus	C13, C14, C9, C21, C7, (PB2), V. alginolyticus
5	HL57, HL58	V. parahaemolyticus	HL57, HL57
6	HL29, PB2	V. parahaemolyticus	HL29, PB2
7	C20, C8, EX1	V. campbellii	C20, C8, EX1
8	PB3a, PB5, PB8	V. natriegens	PB5, PB8

Figura 3.1. Un diagrama generados por el coeficiente emparejando simple y el método de grupo con promedios de la aritmética basados en los datos de Biolog.a) y b)

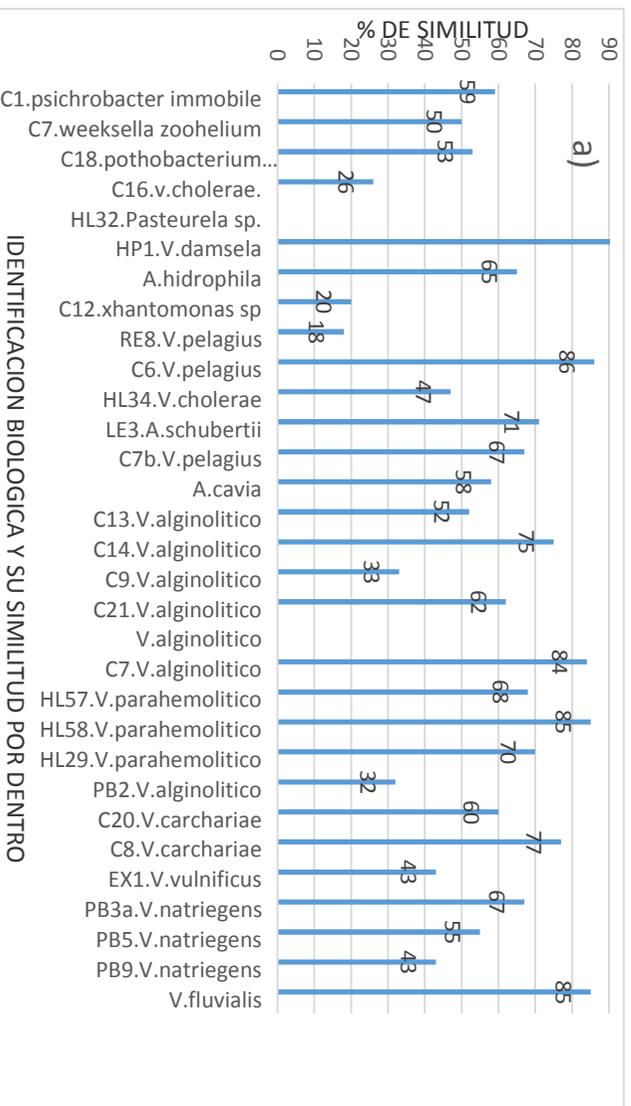
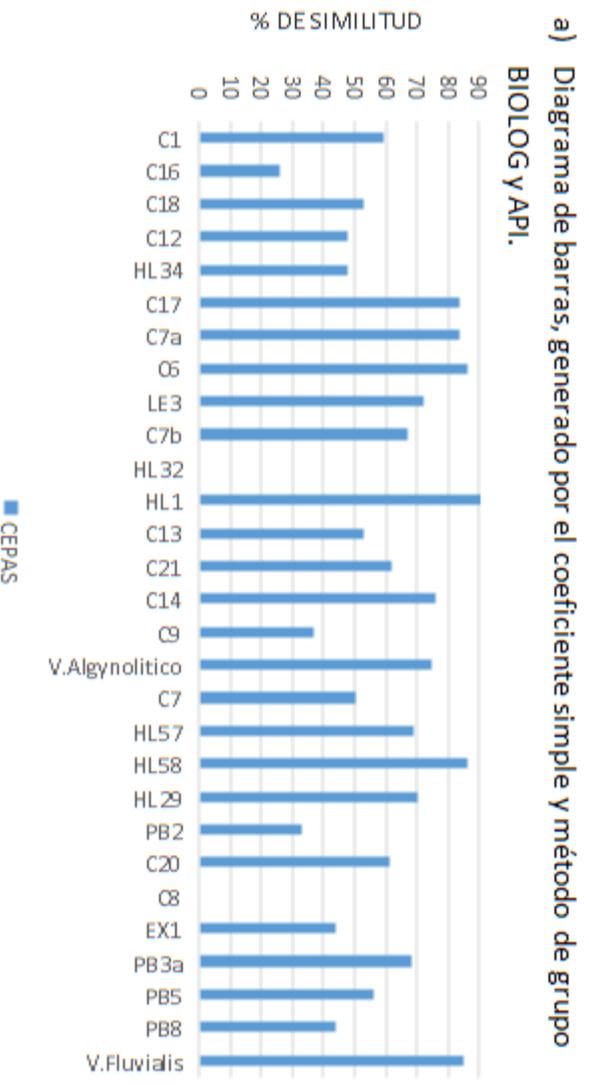
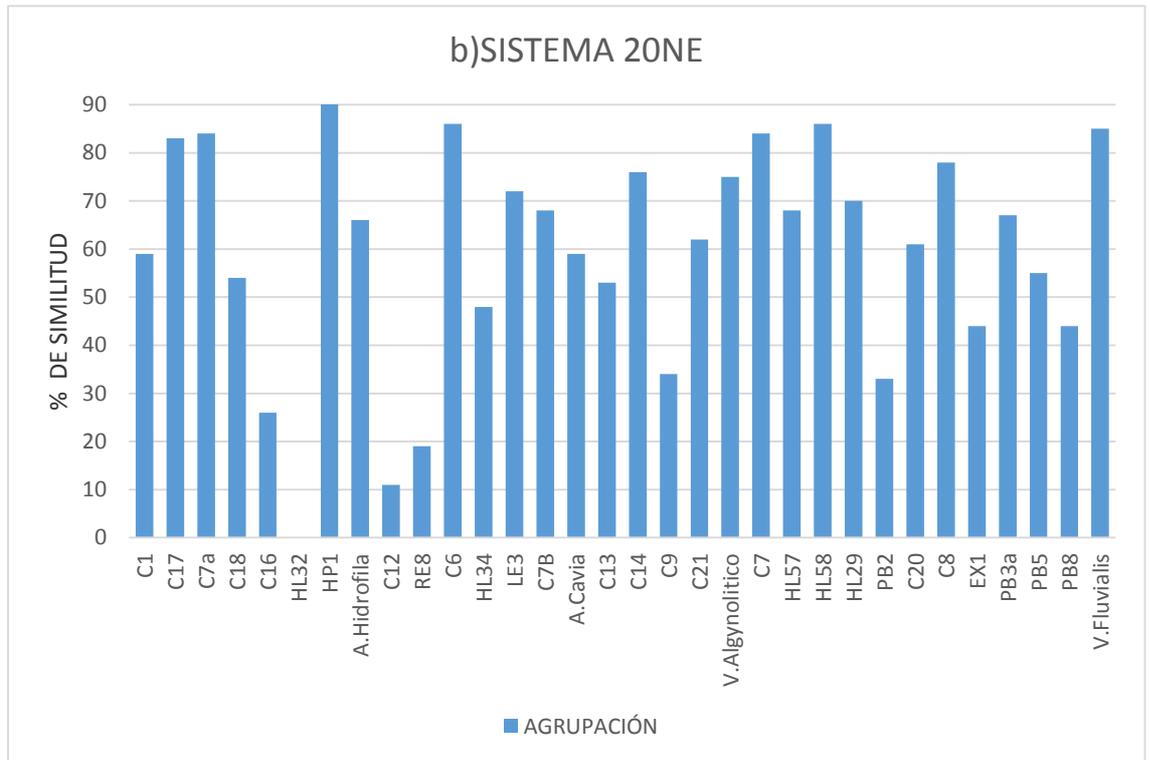
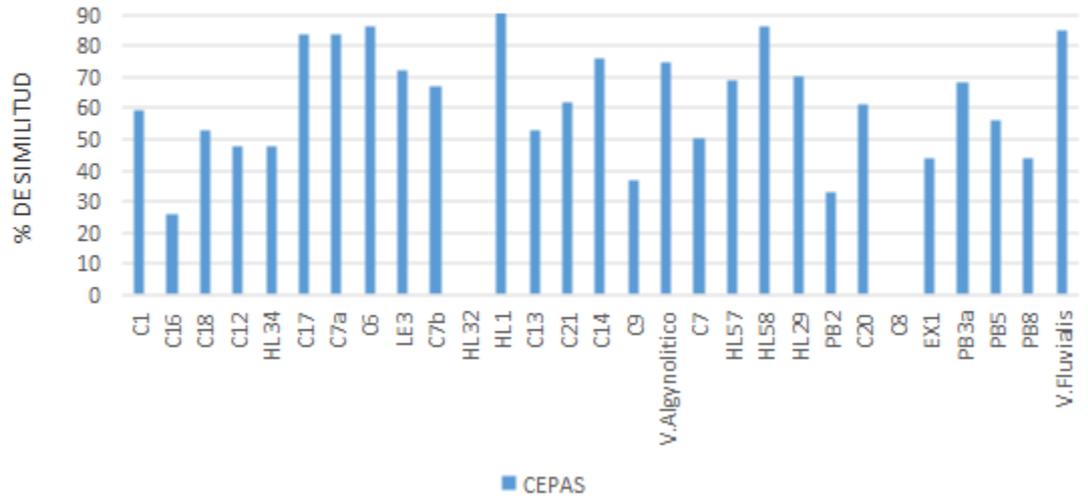


Figura 3.2 a) y b)



a) Diagrama de barras, generado por el coeficiente simple y método de grupo BIOLOG y API.



3.4.3 SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Todas las tinsiones se analizaron para su sensibilidad a 12 antibióticos (Fig. 3.3a, Tabla 3.10). Las tinsiones aisladas del agua de mar eran sensibles

al cloranfenicol pero era resistente al ampicillin, carbencillin, cephalothin, cefotaxime y pefloxacin. Todas las tensiones aisladas de los camarones enfermos y larvas eran sensibles al netilmicin, pero también era muy sensible al gentamicin, nitrofurantoin, cloranfenicol y trimethoprim-sulfamethoxazole.

Las tensiones se agruparon según su origen para analizar los modelos de resistencia entre los grupos. Se formaron cuatro grupos, las tensiones aislaron del agua de mar (16), de los camarones enfermos (9), de larvas enfermas (4) y tensiones del tipo (4). Se observaron las diferencias Significantes en la resistencia a los antibióticos entre los grupos bacterianos (H-prueba 9.029, $p = 0.0289$, $n = 12$; Fig. 3.3b). El agua de mar aislada era la más resistente a los antibióticos que los camarones enfermos y h&vae (el SNK-prueba, $p < 0.05$) pero similar a las tensiones del tipo. Otros grupos no eran significativamente diferentes (el SNK-prueba, $p > 0.05$).

FIGURA 3.3. La sensibilidad antibiótica. a) el Porcentaje de sensibilidad de tinsiones a los antibióticos diferentes. b) las diferencias en la resistencia a todos los antibióticos probados entre los grupos bacterianos.

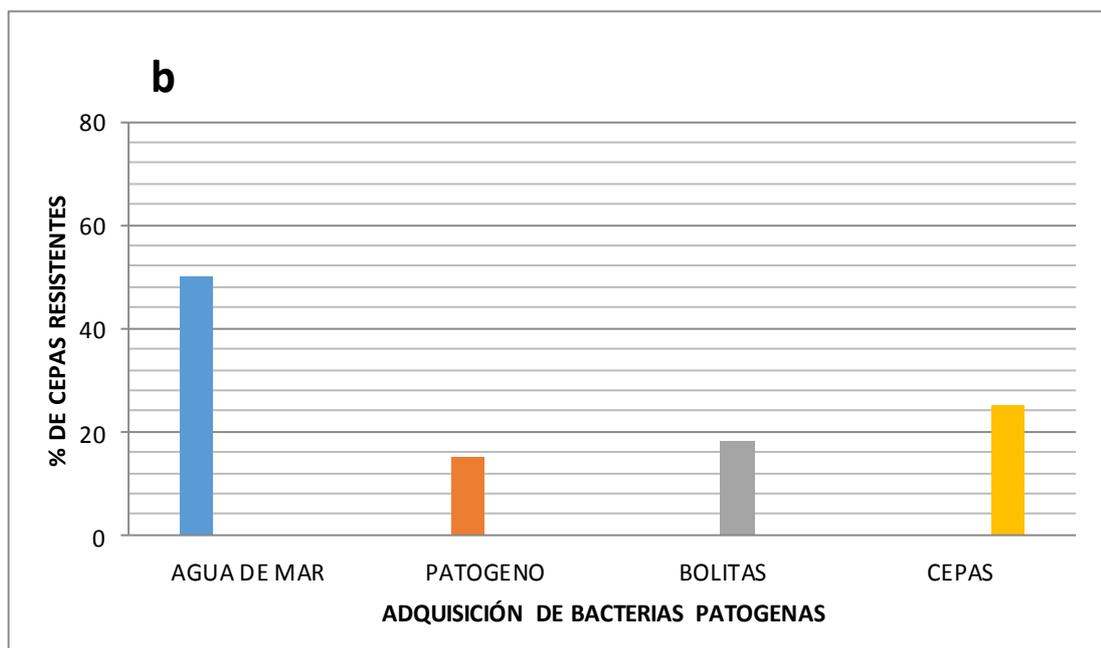
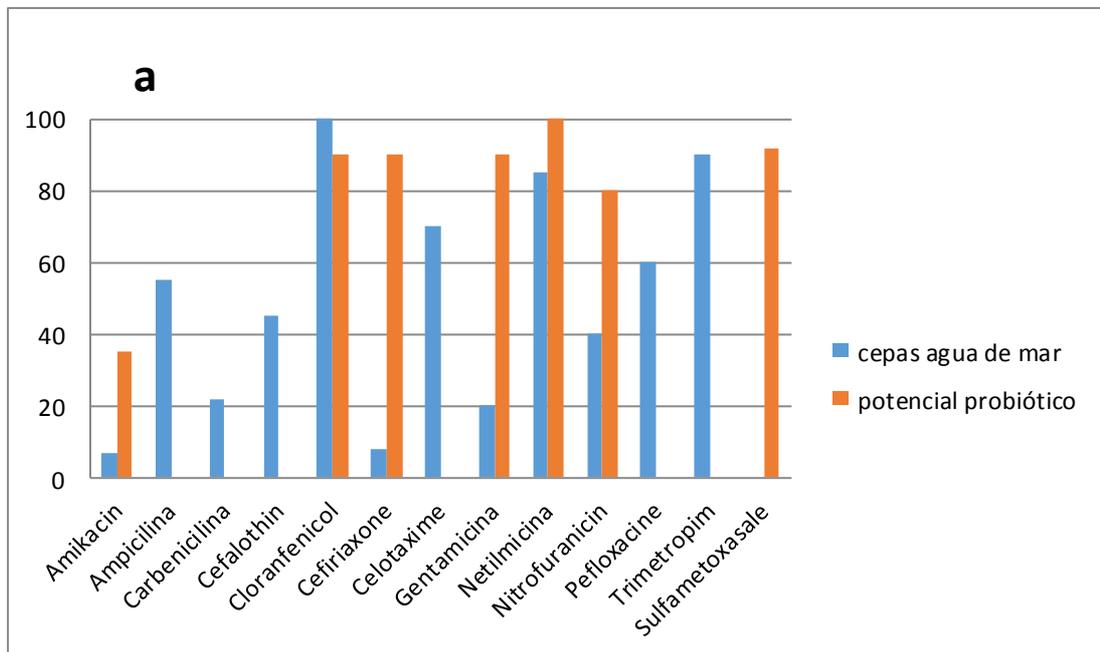


Tabla 3.8 comparación e identificación de cepas con el sistema biológico API 20NE.			
Cepas	Identificación	Identificación Biológica	Identificación API 20NE
C1	Stenotrophomonas sp	Psychrobacter immobilis	Seudomona
C12	Pasteurella multocida	None	V.paraemolíticos
C13	V. alginolyticus	V. alginolyticus	V. alginolyticus
C14	V. alginolyticus	V. alginolyticus	V. alginolyticus
C16	Stenotrophomonas sp	None	W.virosa
C17	Photobacterium	Weekselia	V. alginolyticus
C18	Micrococcus luteus		
C20	V. campbelli	V.carchariae	V.fluvialis
C21	V. algynolíticos	V. alginolyticus	V. alginolyticus
C6	V. pelagius	V. pelagius	V.vulnificus
C7	V.alginolitico	V. alginolyticus	V.paraemolíticos
C7a	Foto bacterias	Foto bacterias	V.paraemolíticos
C7b	V. proteolíticos	V. pelagius	V. alginolyticus
C8	V.campbelli	V.carchariae	V. alginolyticus
C9	V.alginolitico	V. alginolyticus	V. alginolyticus
EX1	V.campbelli	V.vulnificus	V.paraemolíticos
HL29	V.paraemolíticos	V.paraemolíticos	V.paraemolíticos
HL32	V.damsela	Pasteurella sp	None
HL34	V. pelagius	V.cholerae	V.paraemolíticos
HL57	V.paraemolíticos	V.paraemolíticos	V.paraemolíticos
HL58	V.paraemolíticos	V.paraemolíticos	V.paraemolíticos
HP1	V.damsela	V.damsela	V.damsela
LE3	V. pelagius	A.schubertil	V.vulnificus
PB2	V.paraemolíticos	None	V. alginolyticus
PB5	V,natriegens	V,natriegens	A.hidrofila/cavia
PB3a	Flavobacterium sp	V,natriegens	V.vulnificus
PB8	V,natriegens	V,natriegens	A.hidrofila/cavia
RE8	Flavobacterium sp	None	A.salmonicida
A. cavia	A. cavia	A. cavia	A.hidrofila/cavia
A.hidróphila.	A.hidróphila.	Erwinia amylovora	A.hidrofila/cavia
V.alginolitico	V.alginolitico	V. alginolyticus	V. alginolyticus
V.fluvialis	V.fluvialis	Salmonella sp	Chryseomonas luteola

TABLA 3.9 Utilización de los diferentes carbonos con las cepas empleada en este estudio																													
TEST																													
	c1	c2	c3	c4	c6	c7	c7a	c7b	c8	c9	EX1	HL29	HL32	HL34	HL57	HL58	HP1	LE3	PB2	PB3a	PB5	PB8	RES	A.caviae	A.hirofla	V.alginolytico	V.fluvialis		
		BIOLOG_GN																											
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-amino ethanol	-	-	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido acetico	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	v	v	+	+	+	-	-	+	+	v	-	+	+	+	+	+	+
Actonitol	-	-	v	v	-	-	-	v	v	-	-	-	v	v	v	v	+	-	-	+	v	-	v	v	+	v	-	v	+
Alaninamide	-	-	v	-	-	-	v	-	-	v	-	+	v	v	v	+	-	-	v	v	-	+	v	v	v	v	v	-	v
Alpha-ciclodextrin	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	v	v	+	+	-
Alpha-D-glucose	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alpha-D-lactose lactulosa	-	v	v	v	-	-	-	v	v	-	-	-	-	v	v	v	+	-	-	v	v	-	-	v	v	+	v	-	-
Alpha-hidroxi acido butyric	-	v	-	v	-	-	v	-	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-	-	-	+	v	v	-	v	v	-	v	v
Alpha-keto acido butyric	-	-	-	v	-	-	+	-	-	-	v	-	-	v	-	v	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	v
Alpha-keto acido glutárico	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	v	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Alpha-keto acido valeric	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-
Alpha-lactose	-	-	+	+	+	-	-	v	+	-	v	-	-	v	+	v	+	-	-	v	v	-	+	v	+	+	+	-	-
Beta- hydroxi butyric acid	+	+	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	-	-	v	v	+	+	+	+	-	v
Beta metil D-glucoside	-	+	v	+	-	-	-	v	-	-	-	-	v	+	v	v	v	-	v	+	+	+	+	+	+	v	+	+	-
Bromo acido succinic	v	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	v	+	+	v	+	-	-	+	+	v	v	+	+	+	+	-	+
Cellopiose	-	+	v	+	-	-	-	+	v	v	v	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	v	+	v	-	+
Cis-acido aconitic	-	-	+	+	-	-	-	+	v	v	+	-	-	+	+	v	+	-	-	v	v	-	+	+	+	+	v	-	-
Acido citrico	-	-	+	+	-	-	-	v	-	-	v	-	-	+	v	v	+	-	-	-	v	-	+	+	+	+	+	-	-
D-L-Alfa glicerol-fosfato	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	v	-	-	-	v
D-L-camitine	-	v	-	-	+	-	-	v	-	-	-	v	-	-	v	v	-	*	v	v	-	-	v	v	-	+	-	-	-
D-L-acido láctico	-	+	+	+	v	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-alanine	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	v	-
D-arabitol	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
D-extrin	-	v	+	+	+	v	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructosa	v	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galactonic acido lactone	v	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	-	-	+	-	v	v	-	-	-	-	-	-	-	
D-galactosa	-	+	+	v	-	-	-	+	-	+	+	-	v	+	+	+	+	+	v	+	-	+	+	+	+	-	+	v	-
D-acido galacturonic	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	v	v	-	-	-	v	+	*	+	v	v	-	-	-	-
D-acido gluconico	-	v	-	+	v	-	-	+	+	+	+	v	+	+	v	+	+	-	+	+	+	-	+	v	+	+	+	-	+
D-acido glucosaminico	-	-	v	v	-	-	-	v	v	-	-	-	v	+	v	+	-	-	-	-	v	v	v	v	-	-	-	+	+
D-acido glucuronico	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	v	+	v	-	-	+	-	-	+	v	v	-	-	-	-	v
D-mannitol	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+
D-mannose	-	-	+	+	+	-	-	+	v	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v	v	+
D-melibiose	-	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	v	-	+	-	-	-	v	+	-	v	+	+	+	-	-	-	v
D-rarfinose	-	v	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	v	-	-	-	v	-	v	+	+	+	+	-	-	-	v
D-acido saccharic	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	v
D-senne	-	-	-	v	-	-	-	+	-	-	v	-	-	+	-	v	v	-	-	v	v	-	v	v	-	-	+	v	+
D-sorbitol	-	-	v	+	-	-	-	v	+	+	+	-	v	+	v	+	-	-	v	+	-	-	+	+	+	+	-	v	-
D-trehalose	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido formico	-	-	+	+	-	-	-	-	v	-	v	-	v	-	+	-	+	-	-	v	v	-	-	-	+	+	+	-	v
Gamma-amino-acido butiric	v	-	+	v	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-	v	-	-	-	v	v	-	-	+	-
Gamma-hidroxi acido butiric	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	
Gentobiose	-	+	v	v	-	-	-	+	-	+	v	+	v	+	+	+	+	-	+	v	-	-	v	+	+	+	+	-	-
Glucosa-1-fosfato	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	v	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	v	-	-	+
Glucosa-5-fosfato	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	v	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	v	-	-	-	-	+
Glucuronamide	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	v	-	-	-	-	-	v	-	v	-	-	-	-

Tabla 3.9		Utilización de los diferentes carbonos con las cepas empleada en este estudio																																		
TEST																																				
	c1	c12	c13	c14	c16	c17	c18	c20	c21	C6	C7	C7a	C7b	C8	C9	EX1	HL29	HL32	HL34	HL57	HL58	HP1	LE3	PB2	PB3a	PB5	PB8	RE8	A.caviae	A.hirofilla	V.algimolytico	V.fluvialis				
	BIOLOG GN																																			
Glycerol	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	v	+	+			
Glicogen	v	v	+	+	+	-	v	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	v			
Glycil-l-acido aspartico	-	v	+	+	v	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+			
Glycil acido glutamico	-	+	+	+	v	v	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	+	+	+	v	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+			
Hidróxido l proline	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	v	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	v	-	-	-	v	-	-	-	-			
eritintol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-			
Inosine	-	v	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+			
Acido itaconic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	v			
L alanine	v	+	+	+	v	+	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	v	-	+	+	+			
L-alanil-glicina	-	+	+	+	v	+	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	v	+	+	v	+	+	+	+	+	+	v	-	+	+	+			
L-arabinosa	-	v	v	+	-	v	-	v	+	-	v	-	v	v	+	v	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+		
L-asparagine	+	v	+	+	-	+	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	v	+	+			
L-acido aspartico	-	v	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+			
L-fucose	-	-	+	+	-	-	-	v	v	-	v	-	-	v	+	v	+	-	-	+	v	-	-	+	v	+	v	-	-	-	-	-	v	+		
L-acido glutamico	v	+	+	+	v	+	-	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+	v	+	+	+	v	+	+	+	-	+	v	+	-	+	+	+			
L-istidina	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	v	v	+	-		
L-leucine	-	-	+	+	-	-	-	v	v	-	v	-	v	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	v	-	-	-	-	v	+	
L-omitini	-	v	+	+	-	-	-	v	v	-	+	-	-	-	+	v	+	-	-	v	v	-	-	+	+	+	v	-	v	-	-	-	-	-		
L-phenil alanine	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-	-	-	v	v	v	-	-	-	v	-	-	v	-	-	v	v	+	-	-	-	-	-	-	-		
L-profine	v	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+	-	v	+	+	v	v	+	+	v	+	+	v	-	+	+	+	+		
L-acido piro glutamico	v	v	-	v	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	v	v	v	-	-	v	v	-	-	v	v	+	v	v	-	-	-	-	-	v		
L-thamnose	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-	v	-	-	v	-	-	+	-	-	-	v	-	-	v	+	-	+	-	-	-	-	-	-	v	-	
L-senna	+	+	+	+	v	-	v	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	v	v	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L-threanina	-	v	+	+	v	v	v	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	v	+	+	-	+	+	+	+	+	+	v	+	-	+	+	+		
Acido malonico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	v	+	+	+	-	-	-	-	-	v	+	
Maltosa	v	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Metil piruvate	v	v	+	+	v	-	-	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M-inositol	-	-	+	v	-	-	-	v	v	-	-	-	-	v	+	-	+	-	-	v	v	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	v	+
Mono metil succinate	-	-	+	+	-	-	-	+	+	v	+	-	v	+	+	+	+	v	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-D-galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	v	-	+	-	-	v	v	v	-	v	v	+	-	+	-	v	-	-	-	-	
N-acetil-D-glucosamine	-	+	+	+	+	v	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenyl ethilamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	v	-	-	-	v	v	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P-hidroxy acido phenilacetic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Acido propionic	-	+	+	+	-	-	v	+	+	-	+	-	v	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Psicose	-	+	+	+	v	-	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Putrescine	v	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	v	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
Acido quinic	-	v	-	v	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	+	v	-	-	-	v	-	-	v	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	v
Acido sebasic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Acido Succinamic	-	+	+	+	-	-	-	v	+	v	+	-	v	v	+	+	+	-	-	v	v	v	-	+	+	+	v	v	+	-	+	+	+	+	+	
Acido Succinic	+	v	+	+	v	-	-	+	+	+	+	-	v	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	+	+	+	-	+	-	+	v	v	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thymidine	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Turanose	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	v	-	+	+	+	+	-	v	+	v	v	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 40	v	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	v	-	+	+	-	-	-	+	+	v	+	-	+	v	+	+	+	-	+	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Undine	-	v	+	+	-	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	v	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido Urocanic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	v	-	-	-	-	v	
Xylitol	-	-	v	v	-	-	-	v	-	-	-	-	-	v	v	v	+	-	-	-	-	-	-	-	v	+	v	-	-	+	-	+	-	v	v	

Tabla 3.10		Reacciones obtenidas con el sistema API 20NE y la sencibilidad a los antibióticos																																			
TEST		c1	c12	c13	c14	c16	c17	c18	c20	c21	c6	c7	c7a	c7b	c8	c9	EX1	HL29	HL32	HL34	HL57	HL58	HP1	LE3	PB2	PB3a	PB5	PB8	RE8	A.caviae	A.hirofila	V.alginolytico	V.fluivalis				
		API-20NE																																			
Reducción de nitrato		+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Indol		-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Fermentación de glucosa		-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
Dehidrolase argynine		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+			
urease		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Hidrólisis esculín		-	+	+	+	-	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Gelatinase		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-			
PNPG(B-galactosidase)		-	+	v	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	v	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-			
Glucosa		+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	v	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
Arabinose		v	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
Manose		v	+	+	-	-	+	-	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+	v	-	+	+	+	v	-	v	-	-	-	-	+	+	-	+			
Mannitol		v	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+			
N-glucosamine-acetil		v	+	v	+	-	+	-	v	v	-	v	+	v	+	+	+	+	-	-	+	+	+	v	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+			
Maltosa		+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	v	+	+	+	+	+	-	+	+	+	v	--	+	-	+	+	+	+	+	+	+			
Gluconate		v	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+			
Caprale		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Adipate		-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	v	v	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Malate		+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Citrate		-	v	-	-	-	-	+	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	v	v	+	+	-	v	-	+	-	+	v	v	-	+	+	+			
Phenyl acetate		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Sencibilidad a los antibióticos.																																			
Amikan		-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+	v	+	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	-			
Ampicilina		+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-			
Carbencillin		v	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	v	+	+	-	-	-	-	-			
Cefalotin		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Cefotaxine		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+			
Celtriaxone		+	-	+	v	v	v	-	v	v	v	+	+	+	v	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v		
Cloranfenicol		v	-	-	v	v	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v		
Gentamicina		-	v	-	v	-	+	-	v	v	-	-	-	-	v	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Netilmicina		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Nitrofuranos		v	-	-	v	v	+	-	+	v	v	-	-	-	v	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	v	v			
Perfoxacina		v	v	-	-	-	v	-	-	-	v	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	v	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v	
Trimetropin																																					
Sulfametoxazola		-	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+

3.5 DISCUSIÓN

La gelosa de TCBS fue desarrollada para aislar bacterias del enteropatógeno que pertenecen al género de *Vibrio* y sobre todo para el *parahaemolyticus* (Baumann y Schubert, 1983) sin embargo, también tienen que ser usado para aislar el spp de *Vibrio*. De los ambientes marinos (el Nicholis et al., 1976; Las lijadoras y Sartén, 1988). En este estudio 62.5% del aislamiento era clasificado (o el género de *Vibrio* pero se identificaron 37.5% como otro genero (tabla 3.4) y así como Grampositivos. Las dos *Aeromonas* de referencia especies empleadas crecieron bien en TCBS, con una apariencia de la colonia que apareció. El *alginolyticus*, un 2-3 mm la colonia lisa blanquecina amarilla. Los sistemas usados eran infructuosos para identificar (especies de o que la mayoría de las tinsiones probó, aunque el sistema de Biolog era ligeramente más preciso (40.6%). Ambos sistemas podrían clasificar sólo el correcto 62.5% de las tinsiones del género. El eta de Klingner? (1992) podría identificar correctamente al género 98% de especies de cultivo con los sistemas de Biología y 59% (las especies de o (el et de Klingler un. 1992). La diferencia en los resultados puede explicarse cuándo el origen de las especies es considerado, los sistema de identificación se diseñaron para la clínica o normalmente encontró aislamiento y probó con las tinsiones del tipo (Austin, 1982). Cuando el agua aislada donde probó, Biolog podría identificar sólo 44% con un brote de índice en similitud que el mínimo requirió, mientras el API NFT podría identificar sólo 30% del aisla (el Amy et al., 1992).

De las bacterias marinas de los cultivos del tipo (05% eran correctamente identificados al género y 5.3% a las especies por Hansen y Sorheirn (1991). el API 2ONE identificó 78.3% correctamente al nivel del género y 32.6% a las especies por Chung y Kou De otras bacterias acuáticas, (1994). Estos porcentajes son más similares a los resultados de (su estudio dónde el oniy 34.4% el aislar era correcto identificados a las especies y 60.5% al género con el sistema API 2ONE.

Otra manera de usar los resultados de las reacciones de estos métodos de identificación está combinando el resultado y realizando un análisis numérico. Ambos sistemas proporcionan combinación de 115 caracteres de la que son suficientes para un análisis de la taxonomía numérico (Sneath y Sokal. 1973). El análisis de este proporcionó un cuadro de la relación entre las tensiones en los grupos distintivos de especies. En el dendogramas producido (los Higos. 3.1 y 3.2), por lo menos se observaron dos grupos grandes, de tinsiones se identificaron como *Vibrio* (el más bajo grupo).

Los diagramas produjeron con los datos del Biolog con y sin el API 2ONE era similar, pero al parecer una agrupación buena se observó en el diagrama dónde se usaron ambos sistemas (Fig.3.2). Las relaciones dentro del *Vibrio* se agrupan en el diagrama refleja el ADN homología relacionada para esas especies en el género cuando comparó con datos presentados por Baumann y Schubert, 1983,: El *alginolyticus* de *V.* y el *parahaemolyticus* (el ctusters 4 y 5-6) las tinsiones eran estrechamente en racimo, igualmente, ambas especies tenían un 65% de homología del ADN alto. Las tinsiones identificaron como el *carbellii* de *V.* (racimo 7) era en racimo al lado del *y.* el *alginolyticus* / el *V.*

parahaemolyticus se arracima, y por la homología de ADN, los *V. campbellii* se relacionaron a ellos (51% y 55% respectivamente). Las últimas especies de este grupo, el *natrigens* de *V.* también muestra una homología de ADN íntimo con el apoyo mencionado de las especies (el resultado de 40%) y era en racimo adyacente a ellos y era el único problema.

Observando en este grupo de racimos era la presencia de PB3a, identificada como un sp de *Flavobacterium*.

La manera común de aislar e identificar las bacterias del potencial probiótico en los criaderos del camarón ha estado cultivando en TCBS y seleccionando las colonias amarillas grandes e identificándolos con el sistemas del API (los Daniel, 1993; Garriques y Wyban, 1993,; Garriques y Arevalo, 1995,; El etal de Zherdmant., 1997)., esta metodología no es apropiada para identificar las bacterias marinas debido al imprecionante sistemas del API

Un número mínimo de reacciones simples se necesita con éxito para identificar colonias amarillas aisladas en la gelosa de TCBS para los propósitos del probiótico. Pruebas sugeridas que pueden realizarse en las condiciones del criadero a las tinsiones como sacarosa que fermenta el spp de *Vibrio*. : El gramo, la mancha (-), De-prueba (el F), producción de la oxidasa (+), motilidad (\pm), sensibilidad a O/129 (+) y utilización de sacarosa (por el color amarillo de las colonias en la gelosa de TCBS). Pululando en TSA + 2.0% NaCl es necesario diferenciar las tinsiones del *alginolyticus*. Esto fue puesto a pruebas y podría proporcionar bastantes informaciones para identificar las tinsiones con una cantidad suficiente de confianza como la bacteria del potencial probiótico el *V.alginolyticus*

Un resultado sorprendente era de las cepas del agua de mar limpia sea significativamente más resistente a los antibióticos de los camarones enfermos (Fig. 3.3). No pueden ofrecerse muchas explicaciones creíbles para la resistencia de altas tinsiones del agua a los antibióticos probados aquí. La resistencia natural es deseado, pero más probable es que las medidas de halos de inhibición usaron los más sensitivos o resistentes de las bacterias clínicas, muchos de ellos el *Enterobacteriaceae* de familias de *Pseudomonaceae*. Las dimensiones de halo podrían ser los diferentes a aquéllos que exigieron establecer resistencia medioambiental aislada.

3.6 CONCLUSIONES.

Las muestras bacteriológicas en la gelosa de TCBS no aseguran el aislamiento de tinsiones que pertenecen al genero de *Vibrio*, como en este estudio sólo 62.5% de las tinsiones se obtuvieron del agua de mar, los camarones eran definido como el spp del *Vibrión*.

CAPITULO IV

4. COMPETICION DE TINSIONES SELECCIONADAS

4.1 INTRODUCCIÓN.

Se considera que varias características son deseables En seleccionar una tinsión particular de bacterias para ser el tést como un potencial probiótico en los sistemas de larvicultura del camarón. La bacteria debe poder inhibir o fuera-competir otro aislamiento, normalmente debe crecer en un medio de comunicación del líquido con nutrientes encontrados en el sistema del larvicultura, no deben ser los patógenos ni resistente a los antibióticos.

En la competición de ambientes para el espacio y la comida juega un papel importante e influye en composición de ,44 la microflora (Rheinheimer, 1991). Para los organismos más exitosos son Jalways aquéllos que bajo las condiciones dadas, puede colonizar el mejor el substrato existente, puede alcanzar y puede consumir los nutrientes disponibles en el ambiente.

Los microorganismos marinos son capaces de producir sustancias antibióticas que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias del non-marine (Rosenfeld y Zobell, 1947) y también de tinsiones del patogenos humanos (el Lodeiros et al., 1989). La actividad Antibacteriana también se ha informado para varios bacterias aisladas del pez; de 1.1 a 1 .9% de tinsiones aislaron del intestino de dos especies de pez del agua dulce (Cyprinus Carpio y carassius de Carassius) mostró las propiedades inibitorias contra los patógenos comunes el salmonicida de Aeromonas y hydrophlla de À. (el Sugita et al., 1997). Tantos como 22% de tinsiones aislados del rodaballo los efectos inibitorios tenían en contra una variedad de V. anguillarum serotypes, comparó a sólo 3.0% de agua de mar aislada (el eta de Westerdahl. 1991). Ellos también encontraron ese porcentaje superior de las tinsiones aislado del lumen y mucosidad del intestino tiene los patógenos de actividad inibitorios. Aunque ninguna identificación fue emprendida, todas las tinsiones con las propiedades inibitorias eran sensibles al vibriostaticas agente 01129. En otro estudio, la bacteria del potencial probióticos de los criaderos en Ecuador. Varios patógenos del pez obtenidos del salmonidos (el Austin et al., 1995). - Se han informado otros microorganismos a los destacamentos las propiedades inibitorias, las microalgas de Tetraselmis inhibieron el langostino (Austin y Día, 1990) y patógenos del pez (el Austin et al., 1992).

La metodología empleada para probar la actividad antibacteriana es importante, desde que las metodologías diferentes probadas han producido los resultados inconstantes. Rosenfeld y Zobefl (1947) propuso uno de los primeros métodos más viable; una tinsión de la prueba era cultivada en un plato de la lluvia y después de la solidificación, las cepas del marino era intercalado en los cuadrantes. Olear divide en zonas adyacentes del crecimiento se interpretó como la supresión de crecimiento. El eta de Loderios! (1989) y Ruiz

Del. (1996) " los crecimientos " bacterianos en un plato inoculado con las bacterias desafiadas como un césped. De nuevo, los halos claros eran los interpretados como la señal de inhibición. Austin y Día (1990) empleando una técnica del antibiograma en que 5 discos de papel de filtro de mm eran impregnados con un extracto de suecica de T., puso encima de un césped de spp de Vibrio., los halos se observaron después de que la incubación se interpretó como la inhibición. El Olsson et al. (1992) probó tres metodologías, difusión del disco, doble-capa y un doble-capa modificado. Ellos encontraron que la difusión del disco era el método reproducible. Ellos también encontraron que el medio de crecimiento es importante, desde el crecimiento en gelosa marina o caldo menos detectable produjeron el metabolitos inhibitorio que hizo el crecimiento en el caldo de soja de tryptic. El Austin et al. (1995) empleado una metodología para probar la actividad antibacteriana o antagonismo de tinsiones cruz-rayas, donde la interrupción de crecimiento o crecimiento excesivo era rayada como la evidencia de antagonismo.

4.2 OBJETIVO.

El objetivo de este estudio era identificar una tinsión capaz de competir eficazmente para los recursos contra otras tinsiones, incluso los patógenos. Primero, las tinsiones del potencial probiótico deben ser capaces de encima de-creciente o inhibiendo otras tinsiones en un medio sólido.

Segundo, las tinsiones seleccionadas pueden competir fuera de los patógenos potenciales en un líquido mediu que se parece a los nutriente de agua del criadero. La parte segunda intentó demostrar que una tinsión exitosa tendría el éxito en unos medios de comunicación líquido, También el comportamiento de las cepas en larvas de cría en condiciones fue estudiado. Parámetros investigados eran la concentración y volumen del inoculum, y los intervalos entre el inocula. Este estudio produce datos necesarios para los experimentos subsecuentes.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.3.1 MEDIOS DE UTILIZACION SÓLIDOS.

Agua de mar limpia y 8 tinsiones aisladas de los camarones enfermos (EX1, LE3, HL29, HL32, HL34, HL57, HL58 y HP1) era empleado en este experimento. Cuando un estudio preliminar, la técnica empleada por el Austin et al. (1995) fue llevado a cabo para estudiar las interacciones de tinsiones. La gelosa marina (MA) se inocularon los platos entonces con las rayas del paralelo de dos tinsiones bacterianas crecidas estaban intercaladas en los ángulos rectos. El plato estaba incubando para 24 hrs en 30 °C y la interrupción de crecimiento excesivo. Como un estudio final, una Kirby-Bauer disco-difusión prueba modificada se llevó a cabo a las 24 tinsiones seleccionadas para nosotros. Las tinsiones eran crecidas y procesaron como lo descrito en sección 2.1.3. Una tinsión se utilizó en la gelosa Marina (MA) como un césped. Los discos del papel de filtro (7.0 mm Whatrnan No. 1) era impregnado con aislamiento y después de unos minutos puestos encima del césped. Se pusieron seis discos a una distancia en cada plato del Petri con 5 tinsiones. El plato se incubó para 24 horas.

A las 3:00 horas y después del crecimiento de los halos alrededor de los discos eran moderados. El disco del mando también se verificó para un halo.

Los halos de crecimiento de cada tinsión eran moderados y el diámetro del disco del papel de filtro (7.0 mm) substrajo. Había un halo alrededor del disco del mando que también era moderado y substraido. Un promedio de las dimensiones que corresponden a cada tinsión contra los otros se obtuvieron en el orden para producir una estimación del global encima de la capacidad creciente de la tinsión.

4.3.2 MEDIOS DE UTILIZACIÓN LÍQUIDOS.

Esta sección consistió en dos partes. La primera parte involucró inoculando cada tinsión.

En un medio líquido y observando su actuación sin la competición.

La parte segunda consistió en inocular dos tinsiones en cada cultivo (la cultura mixta).

Una bacteria seleccionó como un potencial probiótico del experimento anterior (C14) y 3 potencial patógeno (EX 1, HL32 y HL57) se procesó como descrito en sección 2.1.3 y usó para este experimento.

El agua estaba en un medio de larvicultura de camarón dónde ningún antibiótico se había agregado al agua. Se filtró a través de un filtro del papel (Whatrnan No.1) a través de un 0.45 μ m.

El filtro de membrana se colocaba en autoclave. 5.0 ml del agua se distribuyó en los tubos de ensayo y 50 μ l de las bacterias correspondientes fue agregado para obtener una última densidad de 10000000 CFU ml⁻¹. Los tubos (5 copias) se incubó a las 28°C para 96 hrs y 3 muestras de cada uno (20 μ L) se apuntó a diario hacia MA o TCBS para estimar la densidad bacteriana. Los tubos se agitaron suavemente antes de la muestra que se tomó.

El agua se analizó para el pH, la salinidad, los fosfatos totales (P-P04) y el nitrógeno total.

Los simbiosis ponen en un índice (Bungay y Bungay, 1968) fue usado para evaluar la habilidad de una tinsión en la presencia de otro. El índice era calculado según la ecuación siguiente: $\text{índice} = \frac{\text{crecimiento mixto (ml de CFU)}}{\text{crecimiento puro (ml de CFU)}}$

Las simbiosis ponen en un índice (S.I.) puede calcularse cuando la tinsión estaba crecida en el mismo medio inicial en el mismo crecimiento condiciona en los experimentos. Un índice para poner la tinsión creció bien sola que cuando combinó con otra tinsión, aunque un índice superior significó que creció bien, el cultivo mixto. Un logaritmo anterior basa 10 (Log, o) la transformación fue realizada para obtener un índice cerca de 1.0.

4.3.3 TINSIONES SELECCIONADAS EN UN SISTEMA DE CRÍA DE LARVAS.

El sistema del experimento empleado se describe en sección 2.2.2.2 (Fig. 2.2a y b) y

La metodología de criar larvas en sección 2.2.1.

4.3.3.1 BACTERIOLOGÍA.

Las tinsiones bacterianas eran cultas como descrito en capítulo 2.1.1 y también crecido en M17 elemento (vea sección 6.3.1, tabla 6.1), dependiendo en el experimento, para 18-20 hr a 30°C,

Según resultados obtenidos de la sección de la competición líquida y pre-experimentos,

Se decidió que al reinoculación de las botellas criando larvas cada 48 a 72 hrs para evitar.

Disminuir en la densidad bacteriana. Las botellas criando se probaron a diario y antes de y después de cada inoculación, las muestras se usaron en la gelosa de TCBS e incubaron para 24 hr a 30°C.

4.3.3.2 Proyecto experimental.

Primer experimento.

El objetivo de este pre-experimento era probar el sistema y observar el cultivo de las cepas durante un ciclo criando larvas.

La tinsión C7b era crecida como descrito en sección 2.1.3. Se inoculó al principio y más atrás en las botellas 48 hr.

El experimento segundo.

El objetivo de este ensayo era observar el crecimiento de la tinsión a 3 densidades durante un ciclo criando larvas.

C7b era crecido y procesó como en el primer experimento, entonces se inoculó en las botellas a los 4 y 10 ml de CFU. La inoculación era al principio y más atrás 72 hr.

El experimento Tercero.

El objetivo de este experimento era observar el cultivo de la tinsión cuando

Inoculamos con el caldo a 3 densidades.

La tinsión C7b era crecido en M19 elemento (vea capítulo 6) y 0.5, 1.0 y 2 ml del caldo se agregaron las bacterias al principio y a 72 hr de intervalos.

4.4 RESULTADOS.

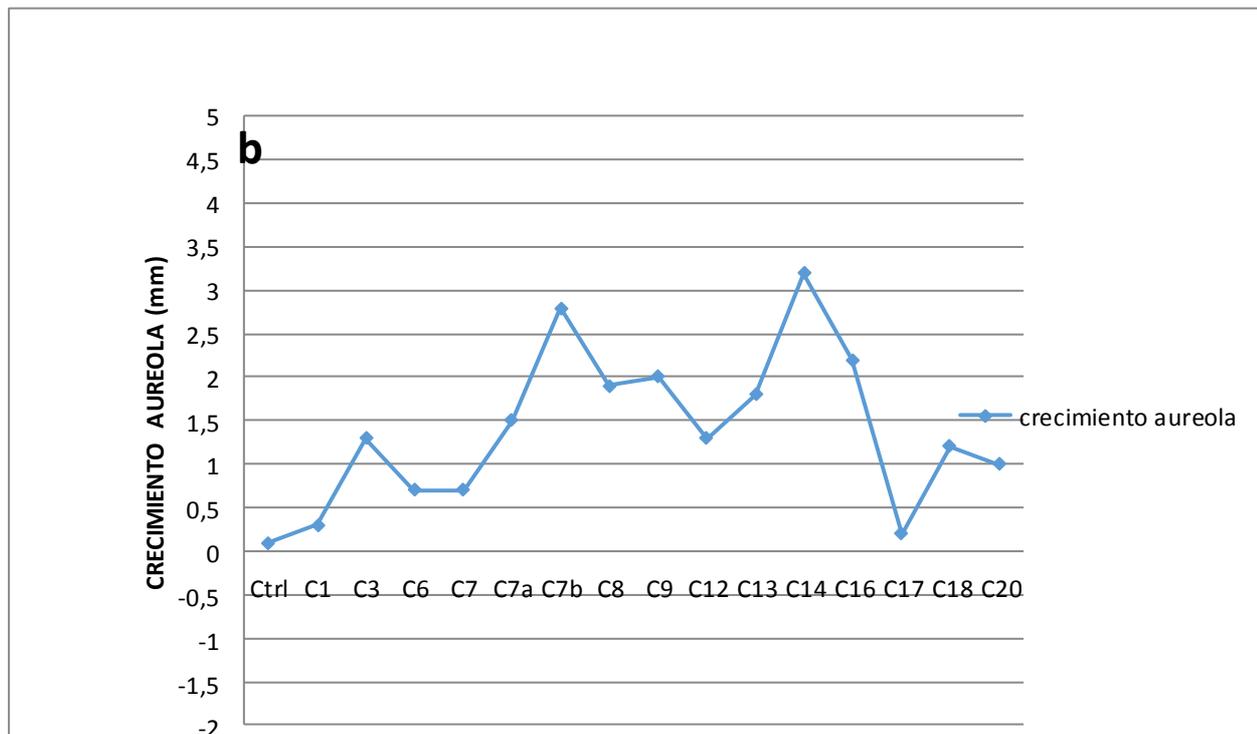
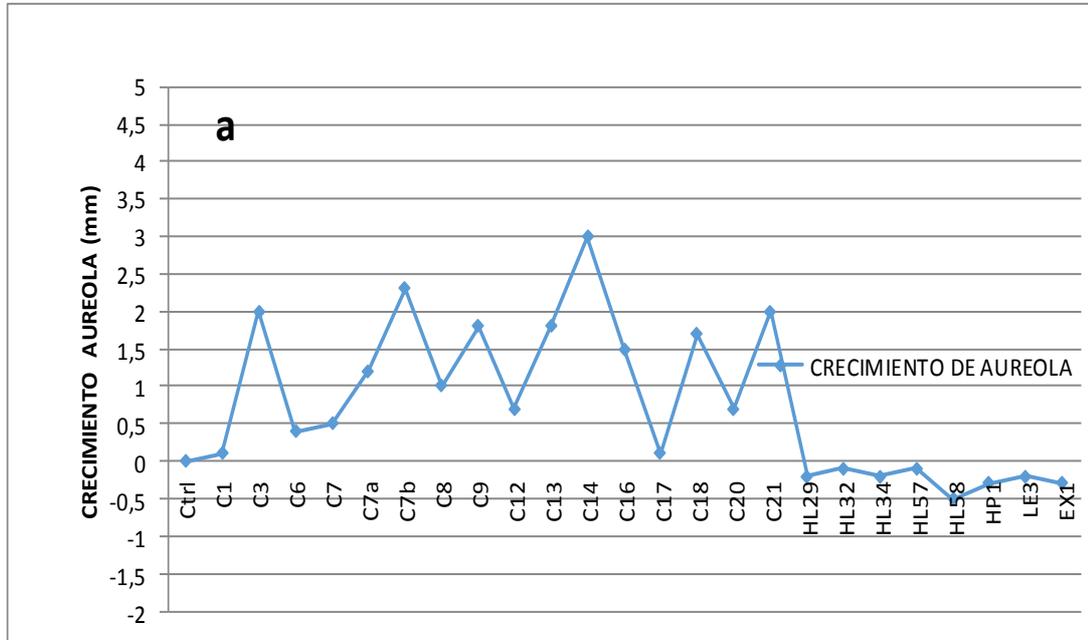
4.4.1 MEDIOS DE UTILIZACION SÓLIDOS.

El experimento de la cruz-rama no produjo cualquier zona de inhibición o encima de-creciente, las tinsiones crecieron entre si al lado de las ocasiones.

La fecha obtenida de los experimentos de Kirby-Bauer modificados se presenta en Figura 4.1. No zonas de inhibición en cualquiera de los desafíos, pero el crecimiento excesivo claro fue notado. Las tinsiones aislaron del agua de mar (candidatos del probiotico) cuando crecieron con otra Agua de mar aislada y contra los patógenos potenciales las varias contestaciones mostraron (Fg. 4.1a). C14 era la tinsión compitiendo con un medio halo de 2.990 mm; era significativamente los diferentes 70.83% de las tinsiones probadas (diferente que 01,06, C7, C7a, 08, 012, 017, C20 y de ahy las tinsiones del patógeno potenciales; El F-prueba de ANOVA, $p < 0.05$).

El agua de mar aislada se examinó, fatigado 014 también era el actor bueno con un promedio de 3.127 mm (Fig. 4. 1b) pero significativamente diferente que sólo 25% de las tinsiones (diferente que C1, C6, C7 y C17; El F-prueba de ANOVA, $p < 0.05$).

Figura 4.1. El Promedio de halos de cada tinsión desafió contra todos y sólo entre tinsiones aisladas del agua de mar (el b). \pm Malo 95% intervalo de confianza



4.4.2 MEDIOS DE UTILIZACIÓN LÍQUIDOS.

Con los resultados de los experimentos en los medios de comunicación de los sólidos, fatigüe C14 se seleccionó como un probiótico potencial para el ensayo líquido contra los 3 patógenos potenciales: HL57, EXI y HL32.

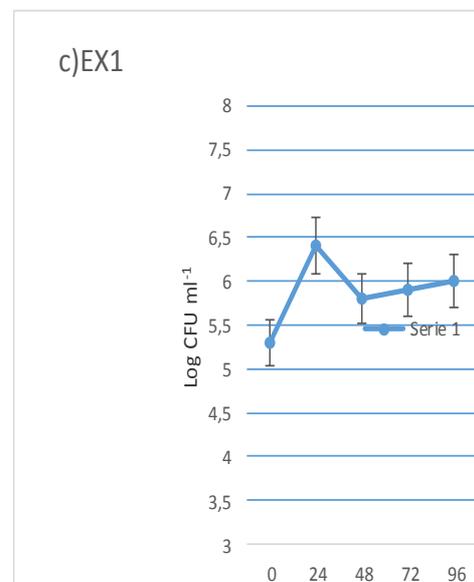
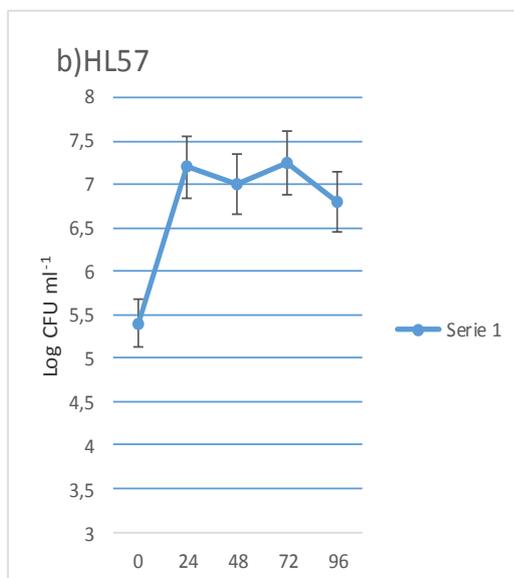
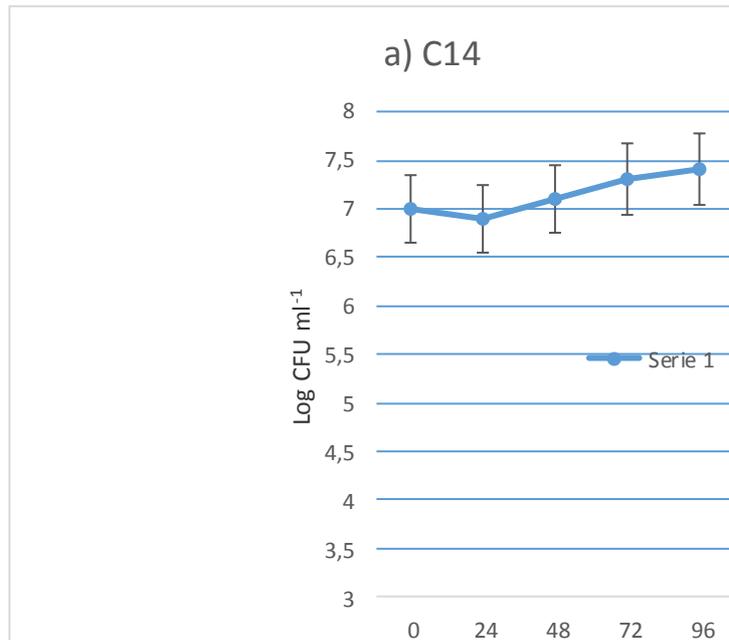
4.4.2.1 CULTURAS AXÉNICAS.

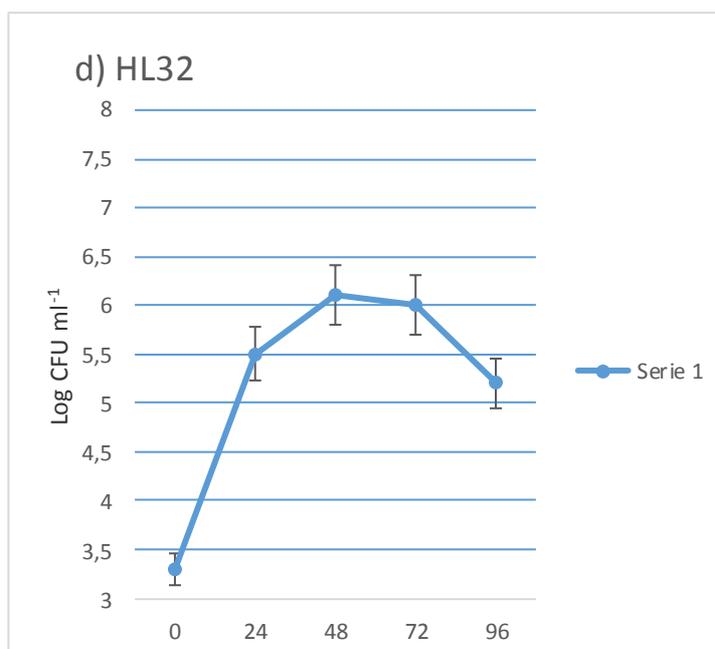
Las 4 tinsiones seleccionadas en el cultivo axénicas se presenta en Figura 4.2. Mucha variabilidad se observó dentro y entre los experimentos. Una tendencia general a aumentar su densidad fue observada, sobre todo cuando se inocularon las más baja densidades al principio. Cuando ellos se inocularon la densidad alta, alrededor de 10 ml de CFU, ninguna variación fue observada con el tiempo (Fig. 4.2: C14 y HL57). Las tinsiones no excedieron 108 ml de CFU y empezaron a disminuir 72 hr más atrás.

4.4.2.2 CULTURAS MIXTAS.

Fatigüe 014 se desafió en un cultivo mixto contra cada uno de las cepas del potencial patógeno (Fig. 4.3). Con la tinsión HL57, los dos mostraron la misma tendencia general a aumentar alcanzando una densidad máxima al final del experimento (Fig. 4.3a). No se observaron las diferencias en la densidad inoculada de ambas tinsiones (el U-prueba de Mann-Whitney = 36.00, $p = 109524$, $n = 5$).

Figura 4.2. Las tinsiones diferentes inocularon exclusivamente en el agua estéril de un criadero del camaron. ± Malo 95% intervalo de confianza.





Se inocularon tinsiones C14 y HL32 la densidad similar (la H = 15.00, p = 0.2857, n 4).

Más atrás 24 y 48 hr de diferencias eran significantes con la tinsión 014 sobre HL32 (Fig. 4.3b); después de 72 hr las diferencias se encontraron todavía, aunque menor (la H = 40, p = 0.0079, n 5). Al final del experimento, las diferencias se pusieron evidentes de nuevo con C14 sobre HL32.

La tinsión EX1 se inoculó en baja densidad que C14 (Fig. 4.3c), EX1 a lo largo del experimento aumentó sus números alcanzando una densidad similar a C14 a 72 hr pero no siendo igual (el t-prueba = 3.030, p = 0.0163, n = 5). A 96 hr EX1 empezó a disminuir y C14 aumentaron ensanchando el hueco de nuevo entre ellos.

Cuando los elementos de una tinsión inocularon exclusivamente y en un cultivo mixto se comparó, y se observaron las diferencias (Fig. 4.4a). La Tinsión HL57 tendió a tener una densidad superior solo que la combinación de n con C14. A 96 hr el gráfico muestra una densidad similar pero ninguna diferencia estadística fue descubierta (el t-prueba = 2.175, p = 0.0613, n = 5).

La tinsión HL32 se inoculó a una densidad significativamente diferente en ambos experimentos (Fig. 4.4b). Sin embargo, a 24 y 72 hr del experimento ninguna diferencia significativa se observó (el t-prueba = 0.1504, p = 0.8842, n = 5; y t-prueba = 0.0084, p = 0.0818, n = 5, respectivamente). A las 48 y 96 hr había diferencias significantes (el t-prueba = 3.470, p = 0.0084, n = 5; H 16.00, p = 0.0159, n = 5).

Tensión que EX1 se inoculó a una densidad significativamente diferente en ambas Fig. De los experimentos 4.4c). A 48 hr los dos inocularon alcanzado una densidad similar (la H = 20.00, p 0.1508. n = 5) que no cambió después de esto (t-prueba 1.907. p = 0.0929, n = 5 para 72 hr; el t-prueba = 1 .030. p = 0.3332, n = 5 para 96 hr). Se muestran los resultados para el cómputo del índice de la simbiosis para las tensiones involucradas en la figura 4.5 Tensión 014, generalmente tendió a crecer bien cuando en la combinación con las tensiones del patógeno. Tensión que HL57 tendió a crecer bien cuando no combinó con 014, pero las diferencias no eran significantes (Fig. 4.5a). Tensión que HL32 mostró a una tendencia del mercado a crecer bien cuando combinó con 014, sobre todo a 96 hr de crecimiento. Tensión que EX1 también tendió a crecer bien cuando combinó con 014 esto era significativo a 72 y 96 hr de crecimiento.

4.4.2.3. CALIDAD DE AGUA.

Los parámetros medidos en el agua usada en estos experimentos, tenía 8.45 pH, 3.4% salinidad, lo siguiente 1.013 ± 0.22 r1 de mg P-p04 y 55.98 r' de mg del nitrógeno total.

Figura 4.3 a) las tinsiones inocularon en un cultivo mixto en el agua estéril de un criadero del camaron. \pm Malo 95% intervalo de confianza.

Figura 4.3 b). Las tinsiones inocularon en un cultivo mixto en el agua estéril de un criadero de camarón. Intervalo de confianza +/- 95%.

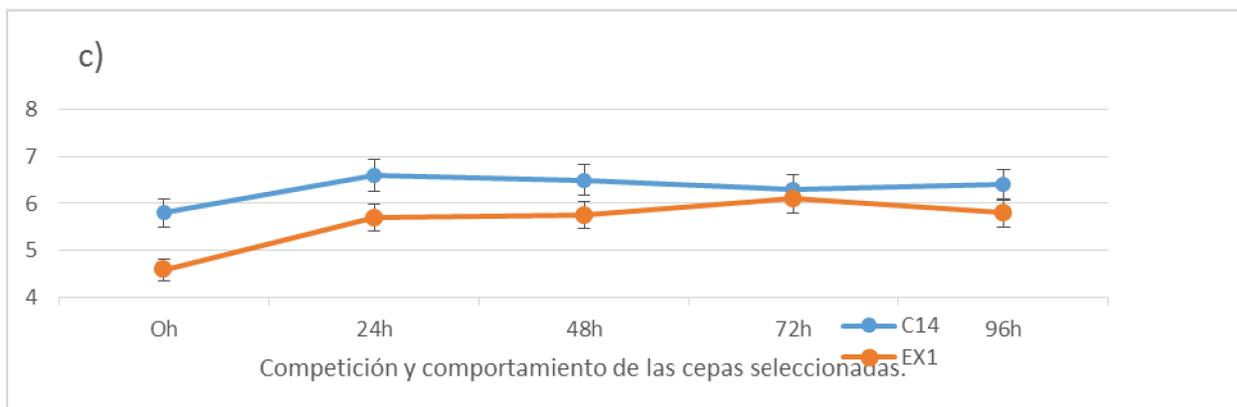
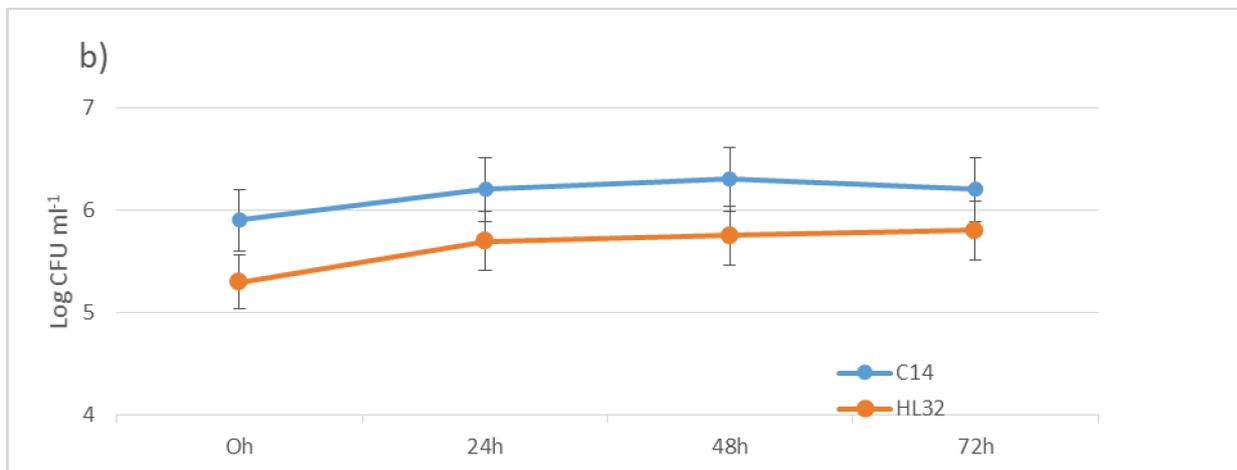
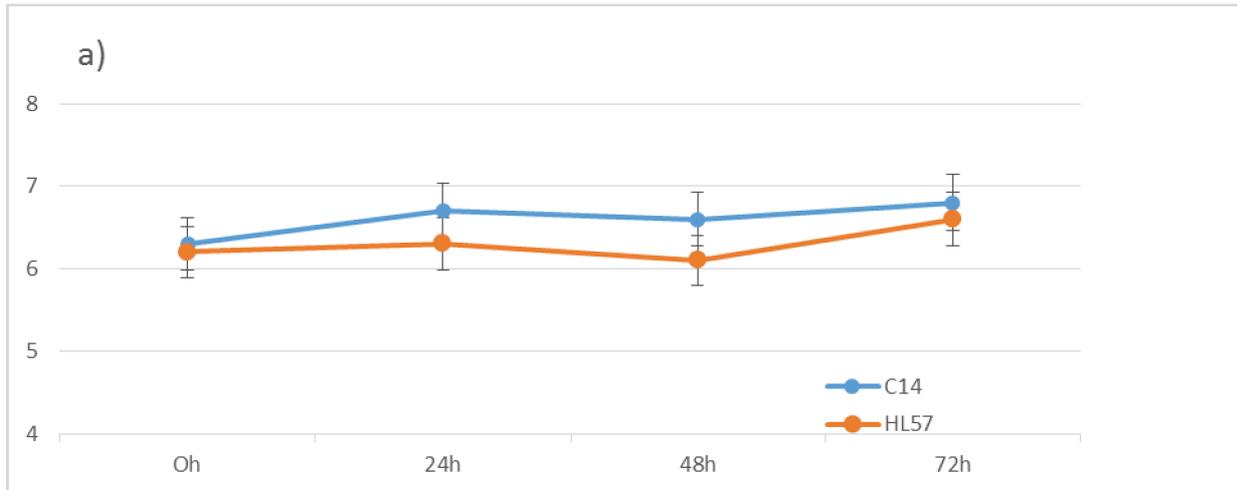


Figura 4.4. La Conducta de tinsiones cuando inoculó exclusivamente y cuando en un criadero mixto con la tinsión C14. \pm Malo 95% intervalo de confianza.

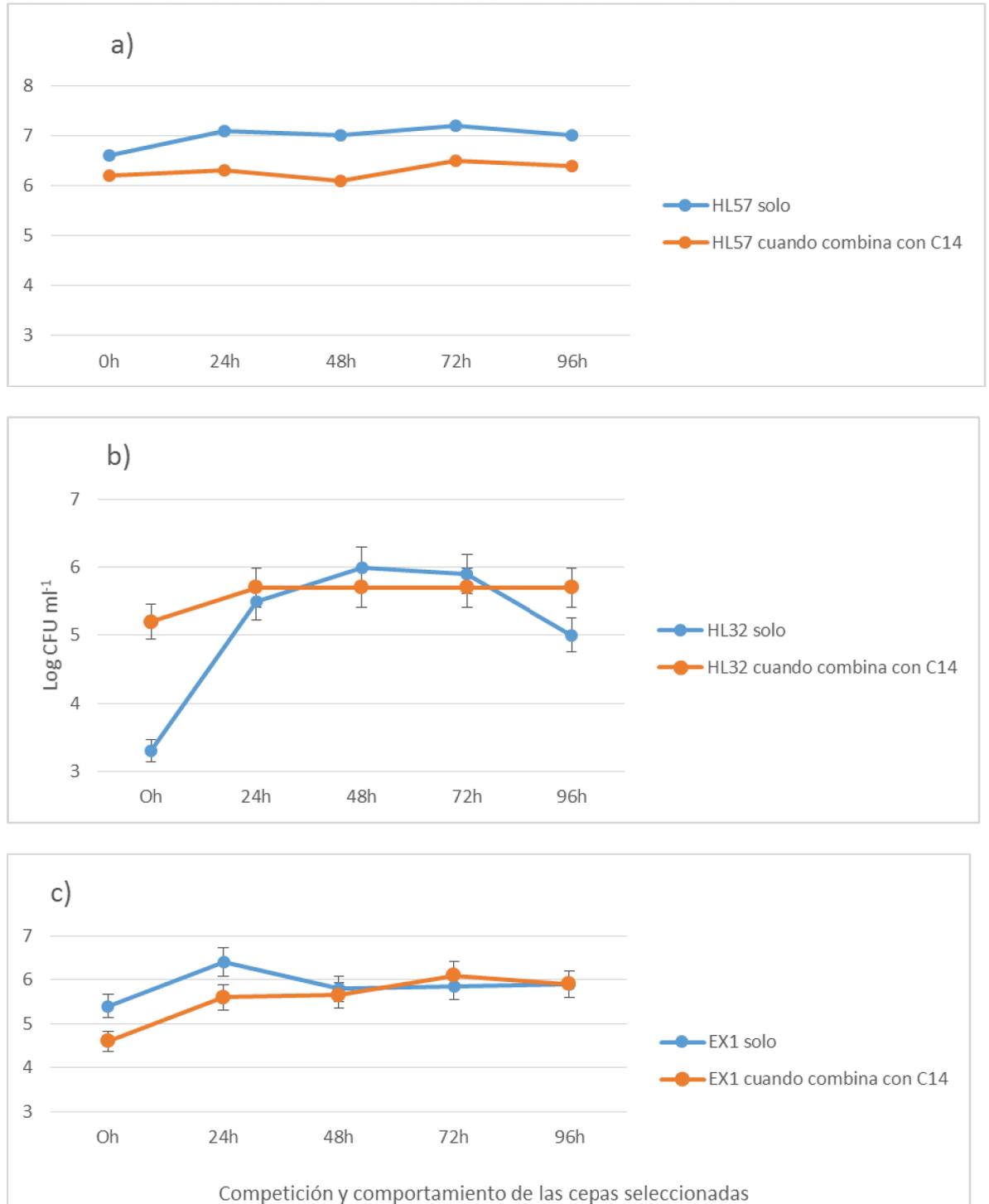
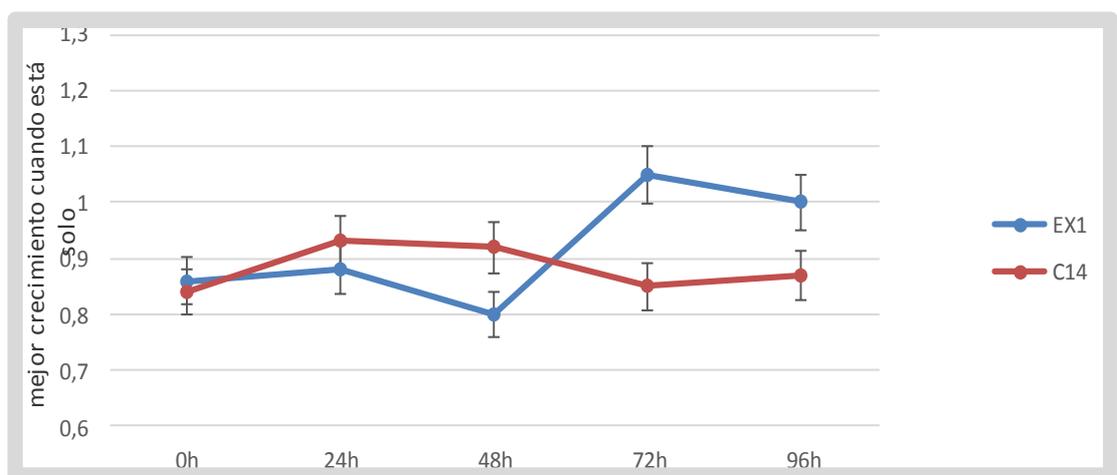
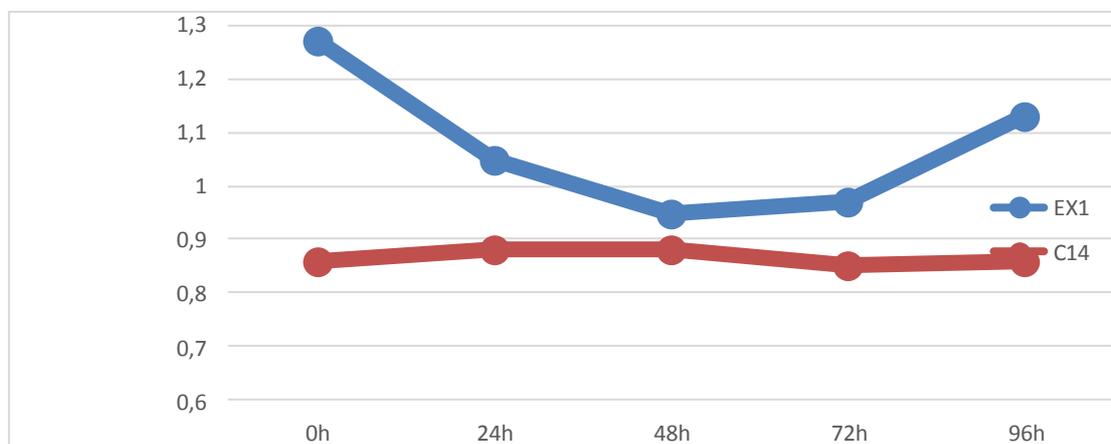
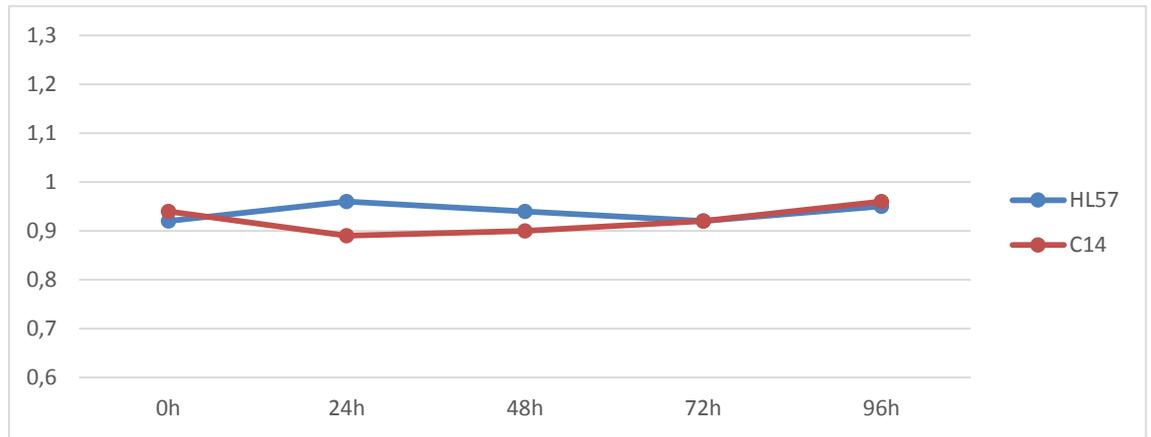


Figura 4.5. La simbiosis pone en un índice de las tinsiones empleadas. Intervalo de confianza +/-95% de confianza.



4.4.2.4 PRIMER EXPERIMENTO

El resultado del primer experimento se presenta en Figura 4.6a. Antes de la inoculación de tinsión no había ninguna diferencia significativa entre las bacterias en las botellas (el t-prueba = 1 .153, $p = 0.3131$, $n = 3$), pero después de la inoculación (15 mm después de la primera muestra) la diferencia era significativa (Fig. 4.6a, Z1 (P.I.)). A 24 hr la densidad de bacterias en el tratamiento tendió a disminuir, pero los segundos inoculación mantuvieron bien la densidad anterior el mando. Las densidades bacterianas en el tratamiento y en el mando la misma tendencia tenía y los dos alcanzaron un nivel similar al final del experimento cuando los larvas cambian de mysis 3 a postlarvae 1.

4.4.2.5 EXPERIMENTO SEGUNDO.

Al principio del experimento segundo (Fig. 4.6b) no había ninguna diferencia significativa en la densidad bacteriana entre los tratamientos (Mesa 4.1), sólo después de que cada inoculación hizo que las diferencias significantes aparecen entre algunos tratamientos (organiza Z1+ y Z3-M1 de Mesa 4.2 y Figura 4.6b).

En el mando, la densidad bacteriana no era significativamente diferente durante el ciclo criando larvas (Una Manera Repetida Mide ANOVA: $F = 1.568$, $p = 0.2450$, $n = 3$), sólo al final del ciclo (la fase M3-PL1) la densidad aumentó significativamente (el $F = 4.598$, $p = 0.0103$, $n = 3$).

Un primer tratamiento que la tinsión se inoculó a 6.90×10^4 el ml de CFU, y ninguna variación significativa se observó en la densidad bacteriana durante el ciclo (Una Manera Repetida Mide ANOVA: El $F = 1.804$, $p = 0.1876$, $n = 3$). Al final del experimento un aumento se observó, pero ningún análisis estadístico podría hacerse debido a la falta de copias ($n = 1$).

En el segundo tratamiento la tinsión se inoculó a 6.87×10^4 ml de CFU. El cuarto día fue uno con la densidad bacteriana más baja (los 3.16×10^3 malos ml de CFU, fase Z3). Este día era significativamente diferente de el segundo, el quinto y el último día (organiza Z1+, Z3-M1 y M3-PL1 respectivamente) criando larvas (Una Manera Repetida Mide ANOVA: El $F = 5.2012$, $p < 0.05$ para los 3 casos, En el tercer tratamiento que la tinsión se inoculó a 1.38×10^6 ml de CFU. Ninguna diferencia significativa se observó entre los días del ciclo criando (Una Manera Repetida ANOVA: El $F = 2.993$, $p = 0.05017$, $n = 3$). Al final del experimento un aumento se observó también, pero ningún análisis estadístico debido a la falta de datos (el $n=1$).

Para la supervivencia de larvas al final del experimento, por favor vea sección 7.3.1.1.

4.4.2.6 EXPERIMENTO TERCERO.

Las primeras inoculación en este experimento aumentaron la densidad bacteriana significativamente en los tratamientos (Fig. 4.7 y tabla 4.2-) y sólo después de 48 hr la densidad disminuyó significativamente para alcanzar un nivel similar al mando. La segunda inoculación significativamente sólo aumentaron la densidad en los 0.5 y 1 .0 tratamientos de 1 ml (Tabla 4.2-). Los terceros inocularon y no alteraron la densidad bacteriana

significativamente en cualquiera de los tratamientos (las tablas 4.2-). después de la primera inoculación, la densidad bacteriana en los tratamientos era significativamente superior, que la densidad en el mando, exceptúa en el cuarto día antes de que la segunda inoculación fuera agregado. La densidad bacteriana en el mando aumentado significativamente al final del experimento (días 8 y 9), un modelo también observó en los tratamientos.

Los volúmenes diferentes de caldo bacteriano inoculados no representaron las diferencias significativamente a cualquiera entre los tratamientos en los primeros 4 días del experimento (tabla 4.5). Después de 24 hr de la segunda inoculación, sólo tratamiento 0.5 era significativamente diferente que los otros dos. Al final del experimento la densidad bacteriana en el tratamiento " 2.0 ml " disminuyeron poniéndose diferente significativamente a los otros dos tratamientos y similar al mando.

El agua en el tratamiento a que se agregaron 2.0 ml, se puso turbio y no aclaró después de 48 hrs.

Tabla 4.1. Diferencia en la densidad bacteriana entre el tratamiento de la segunda media del log CFU ml-1					
Estadíos	tratamiento				F, test, P
	Control	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
Z1	3,46	4,07	3,94	3,92	1,00. 0,440
Z1+	3,06(a)	3,73(a)	4,49(ab)	4,20(b)	3,86. 0,056
Z2	3,35	3,87	4,16	4,42	3,17. 0,085
Z3	2,88.	3,38	3,5	3,54	1,27. 0,350
Z3-M1	2,69(a)	4,05(b)	4,69(bc)	4,57©	8,47. 0,007
M2	3,39	3,85	4,19	3,99	1,15. 0,387
M3	3,26	3,54	3,87	3,30	0,86. 0,500
M3-PL	4,54	4,47	4,53	4,49	-

Tabla.4.2.Las diferencia significativas (valores de p) entre las densidades de bacterias en cada etapa larval (día) de tratamiento 0,5 ml ⁻¹ de experimento 3										
0,5 ml	Z1(pl)	Z1+z2	Z2 +	Z2+(pl)	Z3	M1	M2	M2(pl)	M3	PI
Z1(PL)		0,6293	0,0036	0,7056	0,7885	0,6027	0,8019	0,3091	0,0376	0,0705
Z1+-Z2	0,6293		0,0084	0,8792	0,6986	0,9331	0,6510	0,1756	0,0055	0,0157
Z2+	0,0036	0,0084		0,0135	0,0049	0,0163	0,0079	0,0006	0,0002	0,0002
Z2+(PL)	0,7056	0,8792	0,0135		0,7028	0,9153	0,9800	0,2492	0,0102	0,0271
Z3	0,7885	0,6986	0,0049	0,7028		0,4924	0,8382	0,4031	0,0319	0,0703
M1	0,6027	0,9331	0,0163	0,9153	0,4924		0,9903	0,2157	0,0098	0,0247
M2	0,8019	0,6510	0,0079	0,9800	0,8382	0,9903		0,3035	0,0122	0,0333
M2(PL)	0,3091	0,1756	0,0006	0,2492	0,4031	0,2157		0,1667	0,2037	
M3	0,0376	0,0055	0,0002	0,0102	0,0319	0,0098	0,0122	0,1667		0,5693
PL1	0,0705	0,0157	0,0002	0,0271	0,0703	0,0247	0,0333	0,2037	0,5693	

Tabla.4.3.Las diferencia significativas entre las densidades de bacterias en cada etapa larval (día) de tratamiento 1,0 ml ⁻¹ .										
1,0 ml	Z1(pl)	Z1+z2	Z2+	Z2+(pl)	Z3	M1	M2	M2(pl)	M3	PI1
Z1(PL)		0,1960	0,0017	0,2771	0,9835	0,8383	0,2924	0,9756	0,9436	0,7995
Z1+-Z2	0,1960		0,0136	0,6839	0,2433	0,1993	0,7500	0,1657	0,1806	0,0606
Z2+	0,0017	0,0136		0,0158	0,0022	0,0018	0,0154	0,0017	0,0016	0,0006
Z2+(PL)	0,2771	0,6839	0,0158		0,3593	0,2482	0,7565	0,3048	0,2886	0,1123
Z3	0,9835	0,2433	0,0022	0,3593		0,9718	0,4194	0,9191	0,7645	0,7006
M1	0,8383	0,1993	0,0018	0,2482	0,9718		0,1962	0,9700	0,9502	0,7727
M2	0,2924	0,7500	0,0154	0,7565	0,4194	0,1962		0,3990	0,3647	0,1639
M2(PL)	0,9756	0,1657	0,0017	0,3048	0,9191	0,9700	0,3990		0,9307	0,4949
M3	0,9436	0,1806	0,0016	0,2886	0,7645	0,9502	0,3647	0,9307		0,7169

Tabla 4.4. Las diferencias significativas entre las densidades de bacterias en cada etapa larval(día) de tratamiento de 2.0 ml⁻¹

2.0ml	Z1(PL)	Z1+Z2	Z2+	Z2+(PL)	Z3	M1	M2	M2(PL)	M3	PL1
Z1(PL)		0.4223	0.0321	0.3240	0.9739	0.4836	0.6147	0.9026	0.9187	0.6830
Z1+Z2	0.4223		0.1068	0.7011	0.7286	0.7290	0.9111	0.5732	0.6322	0.9583
Z2+	0.0321	0.1068		0.1226	0.0326	0.1437	0.1110	0.0162	0.0330	0.0768
Z2+(PL)	0.3240	0.7011	0.1226		0.3287	0.7857	0.6613	0.1817	0.3342	0.4397
Z3	0.9739	0.7286	0.0321	0.3287		0.6400	0.6965	0.6490	0.9089	0.7194
M1	0.4836	0.7290	0.1437	0.7857	0.6400		0.9526	0.4574	0.5887	0.9882
M2	0.6147	0.9111	0.1110	0.6613	0.6965	0.9526		0.4950	0.6732	0.9317
M2(PL)	0.9026	0.5732	0.0162	0.1817	0.6490	0.4574	0.4950		0.8330	0.5057
M3	0.9187	0.6322	0.0330	0.3342	0.9089	0.5887	0.6732	0.8330		0.7134
PL1	0.6830	0.9583	0.0768	0.4397	0.7194	0.9882	0.9317	0.5057	0.7134	

Tabla 4.5. Diferencia entre el tratamiento del tercer experimento

Estadíos	tratamiento				F-test,p
	Control	0,5 ml-l ⁻¹	1.0 ml-l ⁻¹	2.0 ml-l ⁻¹	
Z1	3.29*	2,40*	2,11*	1,95*	-
Z1(PL)	3,29*	4,24	4,69	4,59	1.00, 0.416
Z1+Z2	2,87*	3,78	3,97	4,28	2.05, 0.195
Z2	-	-	-	-	-
Z2+	3.04*	2.91	3.00	3.10	0.16, 0.857
Z2+(PL)	3.04*	3.92	4.10	3.79	0.18, 0.838
Z3	2.48(a)	4.16(b)	4.70©	4.67©	74.75,<0.0001
M1	2.19(a)	3.96(b)	4.62(b)	4.14(b)	37.37,<0.0001
M2	2.18(a)	3.92(b)	4.20(b)	4.12(b)	66.23.<0.0001
M2(PL)	2.18(a)	4.55(b)	4.82(b)	4.85(b)	9.43**,0.024
M3	3.87(a)	5.12(b)	4.79(ab)	4.63(ab)	4.12, 0.048
PL	4.05(a)	4.94(b)	5.04(b)	4.09(a)	11.10, 0.003

Figura 4.6. La tinsión C7b en un sistema de cultivos de larvas. A) cuando inoculó cada 48 hr. b) cuando inoculó cada 72 horas y a concentraciones diferentes.

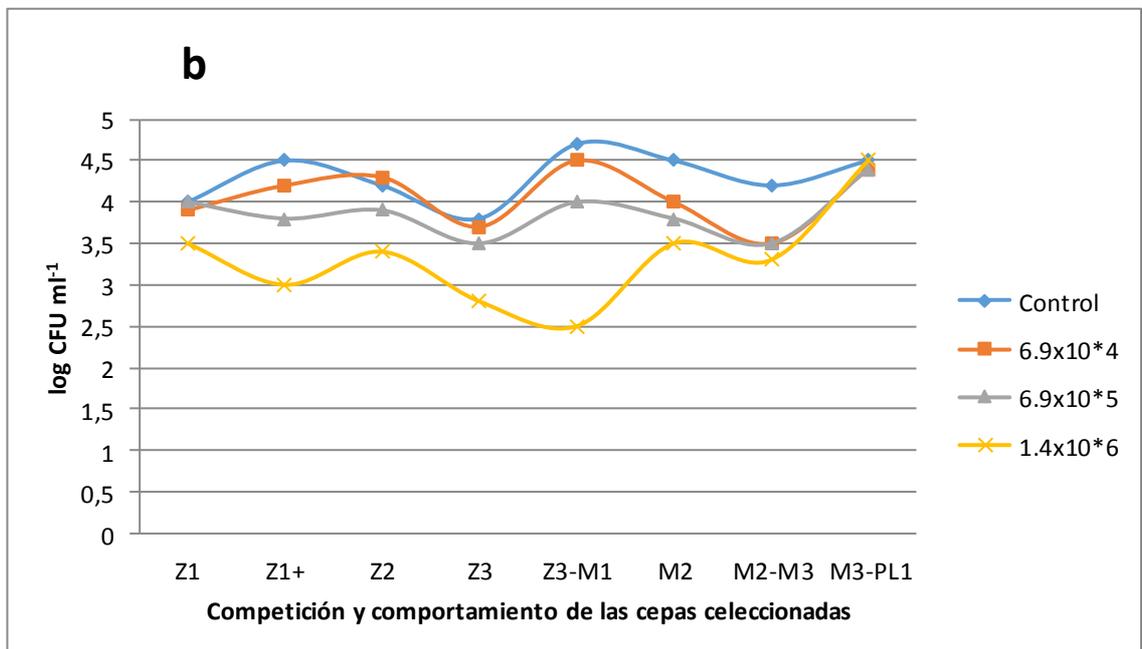
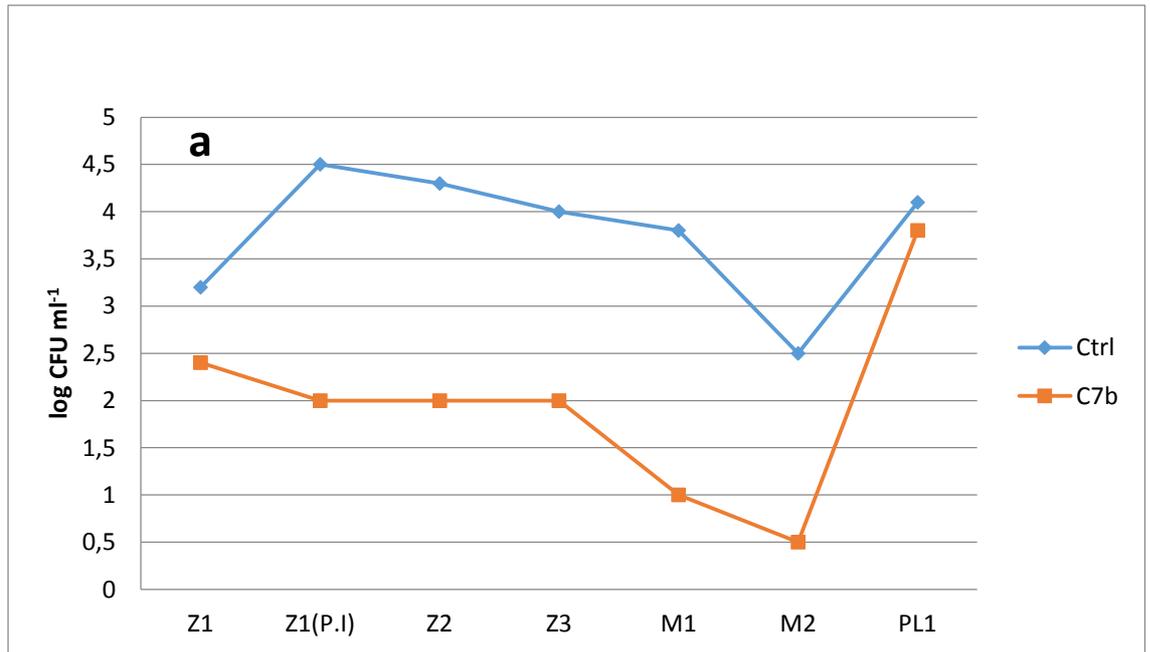
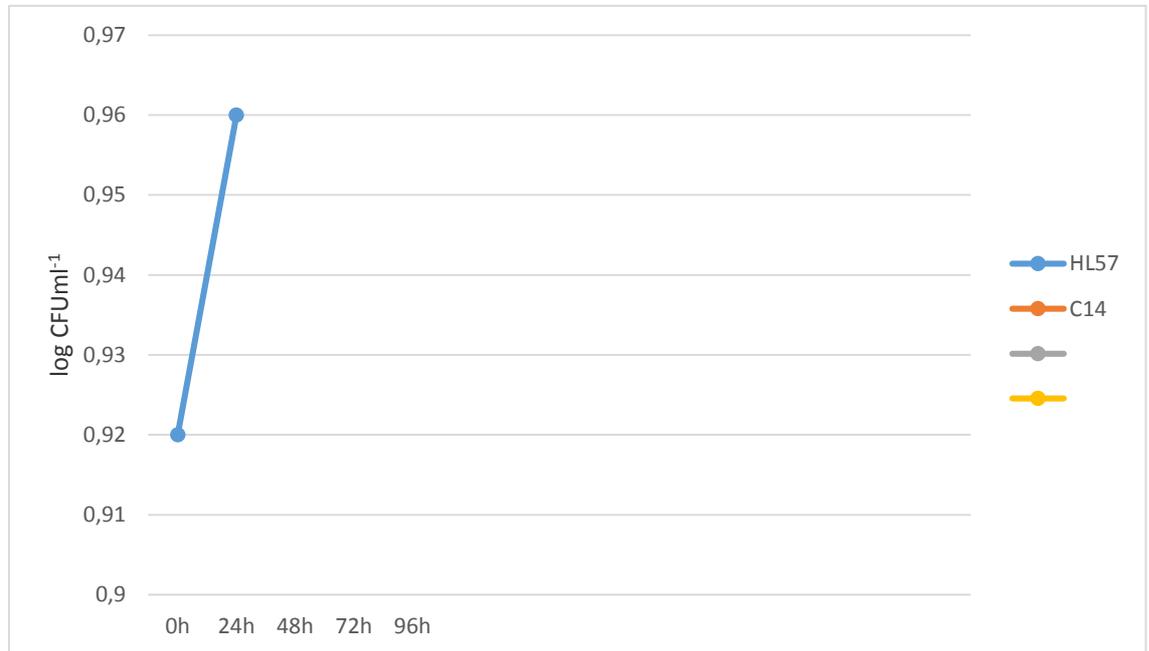


Fig 4.7 Los datos en el Leño de la media el ml1 de CFU. Tratamientos con la misma carta en el paréntesis o sin cualquiera no es significante diferente (una manera ANOVA, SNKtest). El dato del aceite. * El H-prueba de *KmskaWallys. La PI = poste- la muestra inocuada.



4.5 DISCUSIÓN.

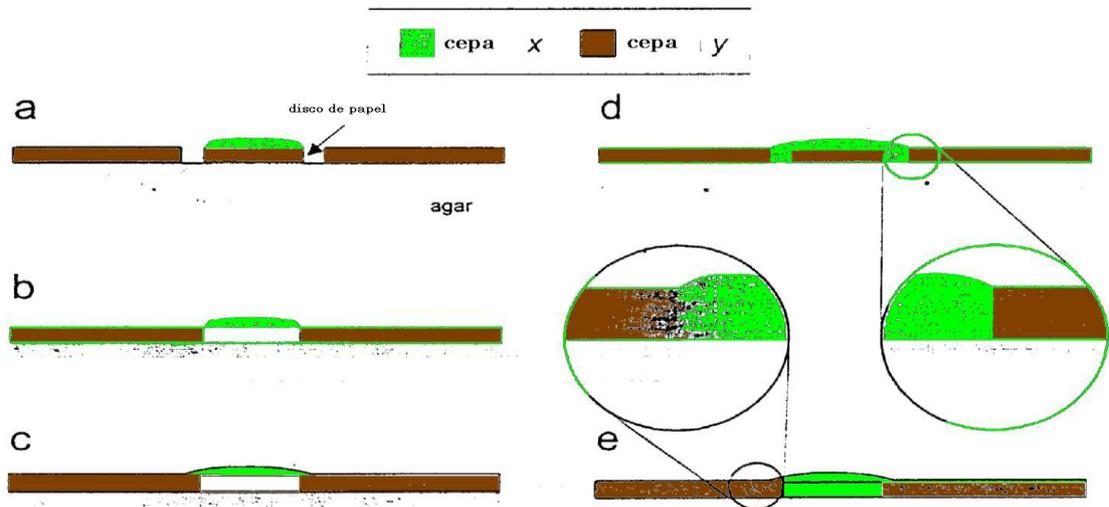
4.5.1 COMPETICIÓN EN UN MEDIO SÓLIDO.

La técnica de la cruz-rama empleada por el Austin et al. (1995) se probó y produjo subsecuentemente allí los resultados inciertos donde cualquiera ninguna zona de inhibición o encima de-creciente o ellos no fueron observados fácilmente.

La prueba de difusión de disco modificada se desarrolló con los resultados aceptables, como él las observó de la capacidad encima de-creciente de tinsiones permitió. Una ventaja agregada de este método es que un valor numérico que permite las comparaciones cuantitativas así entre las tinsiones pudiera grabarse. Era supuesto que las tinsiones con el número más alto tenían una actuación buena compitiendo para espacio o nutrientes que las tinsiones con los números menores.

Podrían observarse varias interacciones bacterianas con el método empleado (Fig. 4.8). Una inhibición real dónde una tinsión inhibe otro produciendo los

compuestos antibióticos. En (Figura 4.8a) tinsión de inhibido por sustancias producidas por el x de tinsión y viceversa (Fig. 4.8 b). Figura 4.8. Las Posibles interacciones entre dos tinsiones en un disco difusión competencia ensaye modificado. 1) La inhibición de y; el 2) la inhibición de x; el 3) fuera-de competición de x; el d) fuera-competición de y; e) ninguna interacción.



Fuera-competición dónde una tinsión inhibe otro porque puede competir bien para los recursos. La tinsión y fuera-competividad el x (Fig. 4.8c) y viceversa (Fig. 4.8d).

Ningún halo de inhibición fue observado (Fig. 4.8e), sugiriendo que ningún de las sustancias inhibitorias fueron producidas por cualquiera de las tinsiones probado. Otros autores han obtenido resultados similares que emplean los mismos o similares métodos. Ruiz et al. (1996) empleado una prueba dónde una tinsión aisló de los cultivos de Vieira era crecida en la gelosa marina y entonces untó encima de la inoculación de bacterias del patógeno. Ellos observaron zonas de seguridad de inhibición de crecimiento, en algunos casos tanto como 13.50 mm. Olsson et al. (1992) Observó sólo zonas débiles de inhibición de crecimiento alrededor de discos impregnados en el cultivo de natants excelente en el patógeno del pez y. el anguillarum. Austin y DÍA (1990) se encontró el método empleó aquí, y uno similar (el Austin et al., 1992) para ser fiable cuando los productos del extracelular desafiantes de las microalgas marinas como la Tetraselmis contra el patógeno el spp de Vibrio.

La competición de tinsiones se descubrió en la mayoría de casos (Fig. 4.8c y d). Cuando un halo fue descubierto que era supuesto que las bacterias del disco habían encima de el cultivo. Pero para determinar si una tinsión que crece como el cultivo (Fig. 4.8d) realmente se fuera-competió por el uno del disco (el x de tinsión), las tinsiones fueron cambiadas es decir tinsiones crecidas en un disco y viceversa. No deben de-crecerse encima de tinsiones

cuando las posiciones se cambiaron en el disco. Los resultados obtenidos en este apoyo de la tesis esta en la mayoría de casos.

Ningún paso fue tomado para observar en detalle si había falta de interacción en algunos casos (Fig. 4.8e). En el caso de la ningún-interacción, ambas tensiones tendrían un número de encima de-crecimiento positivo que depende de la posición en el plato del Petri, cualquier crecimiento en el disco. Esta situación se observó en algunos de los ensayos.

Basado en la discusión presentó aquí, el método de difusión de disco modificado parecería ser aceptable para evaluar el encima de la capacidad creciente de tensiones, pero no podría ser bien coleccionada para la inhibición de análisis de crecimiento o test para que las sustancias inhibitorias produjeran tensiones.

El método de la capa doble para el test sustancias inhibitorias descritas por el Dopazo et al. (1988) podría ser más conveniente para este propósito. Se inocularon platos de gelosa marina con los cultivos del caldo, después de la incubación, las células estaban frías con la niebla del cloroformo y una cubierta que contienen las bacterias del patógeno se vertió encima de ellos y podrían observar una zona de seguridad de inhibición alrededor de las bacterias frías. También se ha usado para evaluar inhibición de patógenos del pez común por las bacterias marinas con éxito (de Dopazo, 1988), por el rodaballo intestino y la superficie aislada (de Olsson. 1992; El Westerdahl et al., 1991), por varios días de agua dulce aisla el intestino, el ambiente y sedimento del pescado (el Sugita et al., 1997).

4.5.2 COMPETICIÓN EN EL MEDIO DE LÍQUIDO.

Cultivando las tensiones en un sistema del lote como emplearon aquí tiene las desventajas, debido al desarrollo de nutrientes de vaciamiento o acumulación de sustancias inhibitorias (Fredrickson, 1977).

Aquí no puede ser un problema importante desde que, cuando el análisis de agua mostró, algunos nutrientes estaban en los niveles altos, y la duración del experimento era corta. También se descubrió ningún declive significativo en la mayoría de densidades del cultivo más atrás 96 hr cuando las cepas fueron inoculados exclusivamente. La producción de sustancias automovil-inhibitorias y su acumulación podría haber sido importante aunque no descubrió en los experimentos del media sólidos, porque es posible que el método que usó en los medios de comunicación de la competición sólidos no puede mostrar a las sustancias inhibitorias. Otros parámetros que podrían afectar el comportamiento de las bacterias son los cambios en el pH, oxígeno disuelto y el alcance máximo de edades fisiológicas en las células (Bungay y Bungay, 1968). Considerando el oxígeno disuelto, los cultivos fueron agitados vigorosamente dos veces por día para animar el intercambio de gas, y debido a la capacidad de agua de mar, los cambios del pH no deben de haber sido significantes. Ninguno de los parámetros era moderado al final del experimento. Las poblaciones bacterianas diferentes presentan, sobre todo al final del experimento no representaría la situación en los medios del larvicultura.

Tinsiones que se inocularon en baja densidad (Fig. 4.2, EX1 y HL32) rápidamente aumentó sus números comparados con las tinsiones que se inocularon a las densidades

Superiores. Las tinsiones no excedieron 107 ml de las células. Este límite podría ser porque los números máximos de células por ml que este sistema pueden utilizar productos extracelulares pudieran ser un factor limitando, desde la falta de nutrientes es improbable limitar el crecimiento. Las tinsiones EX1 y HL32 no excedieron 106 ml de las células, esto podrían reflejar algunas diferencias en requisitos de crecimiento.

Cuando las tinsiones eran inoculadas en los cultivos mixtos, ninguna prueba directa de efectos negativos fue observada (Fig. 4.3). Lemos et al. (1991) grabó los resultados similares cuando ellos inocularon dos tinsiones que no produjeron ningún producto inhibitorio. El único caso donde una influencia negativa fue observada era cuando C14 y HL32 eran juntos (Fig. 4.3b), aunque los dos se incubaron a la misma densidad, HL32 disminuyó significativamente después de 24 hr y seguidamente recuperado. En los casos se analizó, la interacción observada entre las tinsiones se defina como el neutralismo. Bungay y Bungay (1968.) el estado que no es inconcebible que dos o más especies crecen totalmente independientemente en la cultivo mixto, aunque tal relación sería muy difícil confirmar. Los datos presentados aquí podrían hacer pensar una relación. El Lemos et al. (1991) también se encontró que cuando dos antibiótico no tenían tinsiones productivas mixtas y ellos coexistieron sin el efecto adverso apreciable en nosotros.

Para demostrar el efecto de inocular las tinsiones del patógeno con el potencial probiótico (014), cada uno de los patógenos potenciales se comparó solo y combinó el cultivo (Fig. 4.4).

Se grabaron C14, aunque en los experimentos correspondientes ellos se inocularon a las densidades diferentes. El al de Lemos.et. (1991) mostró eso en menos de 5 hr la densidad de una tinsión competida puede vaciarse severamente por una tensión que produjo las sustancias inhibitorias. En este caso, ninguna sustancia inhibitoria se descubrió que los métodos usados, es Posible que 014 tuvieran un efecto inhibitorio contra HL57. Hoyt y Sizemore mostraron en sus experimentos con y. el harveyi en una densidad celular crítica (10v a 10 ml células) debe alcanzarse para un bacteriocin para ser eficaz en los experimentos, la densidad raramente excedió así 107 ml de CFU”.

La simbiosis ponen en un índice (SI.) indica el crecimiento de una tinsión en mixto y comparó con el crecimiento, mientras proporcionó una medida de habilidad competitiva. Una de las condiciones es que las tinsiones se deben haber inoculado a la misma densidad en ambos experimentos (cuando exclusivamente y cuando mixto). En los resultados de estos experimentos, sólo dos de los tres desafíos cumplieron esta condición (HL57-C14 y EX1 -Ci 4). Sin embargo, si el índice de la simbiósis es considerado a pesar de la variación en la densidad inicial en los ensayos (Fig. 4.5), tinsión C14 tenía un sí debajo de 1.0 que los medios que creció bien solo que combinó con otras tinsiones. El mismo puede decirse sobre la tinsión HL57 que tenía un perfil similar. La tinsión EX1 empezó con una actuación similar y entonces aumentó su S.I. al alrededor de 1.0 después de 72 hr. Esto significa que después de 72 hrs que EX1 tendió a crecer bien cuando en la combinación con 014 estaba solo.

4.5.3 MUESTRAS DE TENSIONES SELECCIONADAS EN UN SISTEMA DE CRÍA DE LARVAS.

El ciclo de cría de larvas, de Z1 a PL1 era inconstante en los 3 experimentos, los más cortos tomaron sólo 6 días (experimento 1) y los 9 días más largos (experimento 3). Los experimentos se dirigieron bajo las mismas condiciones de cría, y la única posible fuente de variación en las larvas.

Después de la suma de microalgas y la larva (Zi), la medida de bacteria crecida en la gelosa de TCBS en el agua de cría estaba en 2.28×10^3 ml de CFU y 8.40×10^4 ml de CFU para las bacterias heterotróficas totales, en los tratamientos. En el agua de cría para larvas de protozoas de *Penaeus vannamey* se encontraron números similares de bacterias heterotróficas totales, por término medio de 2.64 ml, de CFU (Hameed, 1993); también en los cultivos del cangrejo el trituberculatus de *Portunus* en metro / CFU se grabó para la zoea (el eta de Suzuki, 1990). Desde el agua en los experimentos presentados en esta tesis el comedero se filtró 0.45 μ m y esterilizó con rayos ultravioletas, la mayoría de la fuente de bacterias era la microalgas y larvas. Se han informado Nauplio para llevar una carga bacteriana de 3.9×10^5 CFU ml (Hameed 1993).

Una observación interesante particular era el aumento significativo de la densidad bacteriana en el extremo de cada experimento, en los mandos y en casi todos los tratamientos. El Berthe et al.

(1992) se encontró que las densidades bacterianas en los criaderos del camarón en Colombia tienden a aumentar rápidamente entre 4 y 5 días y después se pone estable.

Hameed (1993) observó sólo un aumento gradual de los huevos de postlarvas.

Las inoculaciones bacterianas aumentaron el número de bacterias significativamente en las botellas criando larvas, pero la densidad disminuyó significativamente después de 48 hr. Cuando se inocularon las bacterias en el agua de la incubación estéril (sin larvas) la densidad no disminuyó durante el experimento que duró 96 hr (vea Fig. 4.2a). Un sistema de cría larval es mucho más complejo que un cultivo axénica de bacterias. Las bacterias tienen que competir con los recursos con otras especies, ellos se rozan con larvas del camarón (Maeda, 1988) y se inhibe (en el vitro) por substancias producidas por otros microorganismos, como la microalgas (Austin y DÍA, 1990).

En el experimento segundo, casi ninguna diferencia se observó entre los tratamientos, después de la inoculación, que se grabaron significativamente. Con los datos disponible.

Una inoculación de 105 ml de CFU parecía ser la densidad buena de bacterias del potencial probióticos en un sistema de cría de larvas. Las bacterias fueron centrifugadas y lavaron dos veces, este proceso podría haber reducido la viabilidad de las bacterias. En el experimento tercero, las bacterias no se centrifugaron pero se inocularon incluso el caldo y su densidad era significativamente superior. En ambos experimentos el intervalo de la inoculación era 72 hr.

En el experimento tercero, la inoculación de volúmenes diferentes dio lo mismo en la densidad bacteriana. Pero con 2.0 ml, el agua era muy turbia después de que se infringieron las reglas de inoculación de las larvas. También en este tratamiento la densidad bacteriana al final del experimento empezó a disminuir para alcanzar un nivel similar al mando. El tratamiento 0.5 ml x 1 más bajo, valor significantes producidos que los otros tratamientos por muchos días (Tabla 4.2). Por consiguiente, 1.0 ml era el volumen bueno para el caldo bacteriano inoculado para alcanzar un número máximo de bacterias con los efectos perjudiciales en la calidad de agua.

4.6 .CONCLUSIONES.

El método de difusión del disco modificado era conveniente para medir encima del-crecimiento de una tinsión por otros, pero no podría satisfacerse a analizar producción de sustancias de inhibición. C14 era la tinsión que creció la mayoría de las otras tinsiones y tenía el más alto del índice creciente (2.990), aunque la producción de difusión no se demostró las sustancias inhibitorias. Cuando desafió en un medio líquido, ninguna inhibición clara de los patógenos potenciales se observaron HL57, HL32 y EXI por tinsión 014.

En los casos se analizaron la interacción observada entre las tinsiones como el neutralismo.

La Inoculación de bacterias en un sistema de cría larval se logró la mejor introduciendo las bacterias con el caldo a 1.0 ml cada 48-72 hr, aunque la variabilidad alta fue observada que hizo difícil interpretar los resultados.

4.6.1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO EXTENSO.

El método de la capa doble propuesto por el Dopazo et al. (1988), aunque la prueba de disco-difusión modificada, debe emplearse si el objetivo es descubrir sustancias disolubles que podrían inhibir el crecimiento de tinsiones.

Los experimentos de la competición de líquidos podrían dar la valiosa información, pero la atención extra tiene que ser pagada para reducir la variabilidad en las estimaciones bacterianas.

CAPITULO V

5 .SELECCIÓN DE LA TINSION DEL PATOGENO VIBRIO SPP EN LARVAS DE PENAEUS VANNAMEI.

5.1 INTRODUCCIÓN

5.1.1 ESTUDIO DEL PATÓGENO

Hay tres técnicas básicas por inocular las bacterias en los camarones con el objetivo de reproducir una infección: la inmersión en una suspensión bacteriana, incubación anal u oral, e inyección intramuscular. Varios autores han usado estas metodologías. No ha habido ningún tipo experimental reproducible por inducir el problema, aunque las diferencias sobre su eficacia existen.

Varios estudios de bacterias en camarones no a informado Vibrio para ser el género normalmente asociado (el eta de Takahashi!, 1984a, Chen, 1992; El Liao et al. 1992; Lightner 993). Especies aisladas del camarón enfermo incluyen el parahaemolyticus, y el vulnificus, el alginolyticus de V., y el damsela y. el harvelli (Lightner, 1993, 1976). Este género también utilizó termino marino y los ecosistemas acuáticos estuarinos dónde el camarón vive naturalmente y se cultiva (el Vanderzant et al., 1971, Yasuda y Kitao, 1980,; Ruangpan y Kitao, 1991). Es generalmente conveniente que el Vibrio spp es patógeno oportunos que causan la enfermedad cuando los mecanismos de defensa del camarón se componen (Lightner 1993).

Se han llevado los estudios de Patógeno en el Penaeus aztecus (el Vanderzant et al., 1970); el P monodon. (El eta de la Canción. 1993; Roque., 1993; El Jiravanichpaisal. 1994; Alday-Sanz, 1994,; Prayitno y Latchford, 1995,; El Roque, 1995), P .stylirostris. (Arume, 1989,; Pizarro y Alfaro, 1994), P .brasiliensis. (Esteve y Quijada, 1995), P. japonicus. (El Takahashi et al., 1984a; El Takahashi, 1984b; Vera et., 1992; de Peña!, 1993), setiferus de P. (Leong y Fontaine, 1979,; Leong y Hanrahan, 1980,; Lewis y Lawrence, 1983). Hasta recientemente ningún experimento se ha dirigido en el P.vannamei. (Guerra y Gomez-gil, 1996). La Mayoría de estos estudios se ha llevado a cabo en los camarones adultos, pero no en larvas.

Una posible manera de probar el efecto de un potencial probiótico es desafiar al camarón con un patógeno y evaluar si el probiótico es capaz de proteger al camarón de la infección. Un método reproducible para desafiar al camarón con las tinsiones del patógeno se necesita en orden.

5.1.2 DESAFÍO DEL BAÑO.

Los primeros estudios se llevaron a cabo por el Vanderzant et al. (1970) con el P .aztecus, cuando 3 horas después de un desafío del baño en un Vibrio parahaemolyticus a 10⁴ CFU/ml de agua, Todos los camarones probados se murieron. En 1993 et del Roque usó el desafío del baño que agrega de nuevo el amoníaco sindicado como un factor para provocar una tinsión de una concentración estimada de 0.98 de mg de

NH₃-NO. Una tinsión atípica de *P. vulnificus* se inoculó densidad alta de 07 ml¹ de CFU. Los resultados preliminares indicaron estadísticamente la diferencia significativa entre los camarones.

Esteve y Quijada (1995) obtuvo los resultados significantes cuando ellos sumergieron (los camarones en las densidades alta como 108 ml¹ de CFU de *y. el anguillarum*. A la densidad más alta, incluso cuando el camarón era cortado para mantener una vía de entrada para las bacterias, sólo 15% de (los camarones se murió; pero porque ninguna copia fue realizada, es imposible deducir la inferencia de estos resultados.

Una ruta oral por que las bacterias podrían ganar el acceso al camarón también se ha observado.

Alday-Sanz (1994) desafió el *P. monodon*. Con el *V.vulnificus*.; el sumergió los camarones en una densidad de 5x1 ml de CFU y observó las bacterias o los restos bacterianos en el intestino del camarón después de 20 minutos.

También se han usado los desafíos del baño con larvas penaeidae; Prayitno y Lntchford (1995)

Larvas y postlarvas de *P.monodon* a *y. los harveyi* indujeron las mortalidades significantes ($p < 0.05$) dentro de 48 hrs, dependiendo de la edad de larvas. Sólo 25% de las zoeas sobrevivían las 48 hr en 55% del postlarvas sobrevivían una exposición similar. Ellos también descubrieron ese crecimiento las mismas bacterias del patógeno a la más baja salinidad (1 .0 - 1 .5%) reforzó las mortalidades significativamente de las fases larvales. El PH influyó en el patógeno, a los más bajo valor del pH (5.5) el decreciente (l de virulencia. también se obtuvieron mortalidades Significantes de 70% cuando se desafiaron zoeas de *P.monodon*. con un *V.harveyi*. luminosos a las dosis tan bajo como 1, 2 ml 1 de CFU (el Le-Groumehlec et al. inédito).

5.1.3 DESAFÍO DE LA INCUBACIÓN.

El dato muy pequeño está disponible para este tipo de estudio del patógeno. En experimentos dirigidos por el eta de la Canción, (1993) las dosis fuertes de 107 de CFU para el camarón fue exigida para causar 80% de mortalidades después de 14 hrs con el *V.damsela*, a través de la incubación anal. Se desafiaron sólo cinco camarones por la dosis (5x10⁵, 5x10⁶ y 5x10⁷ CFU por el camarón) con una copia. AldaySanz (1994) demostró la variación sustancial en la mortalidad de camarón entre los tratamientos cuando un desafío de la incubación oral fue usado.

5.1.4 DESAFÍO DE INYECCIÓN.

Este tipo de desafío en la mayoría se estudió y practicó en todos los informes presentados en la tabla 5.1 que se inyectaron de suspensiones bacterianas en el segmento abdominal tercero de galancete o las gambas del penaeidae adultas.

En la mayoría de los ensayos es difícil establecer si las mortalidades fueran reales los patógenos de las bacterias o, más probablemente, una tóxina. Con las bacterias inocuas (*coli* de *E.* o spp de *Badilus*.) para proporcionar los datos tóxico en una hipótesis. No hay ningún acuerdo para informar los resultados, o LD₅₀, o porcentaje de mortalidad. Intentando la estabilidad en

LD50 y pueden ser allí útil parece ser una contestación de dosis muy irregular en muchos estudios.

Endo - y las exo-toxinas produjeron para el *V. parahaemolyticus*. y *alginolyticus* también eran probado para su papel en el patógeno (Leong y Hanrahan, 1980), que fue mostrado y ellos eran capaces de inducir las mortalidades significantes en *Penaeus* y también se han probado las bacterias frías como los estimulantes del potencial immune. La muestra de los resultados que las bacterias de *V. alginolyticus* indujeron alguna protección contra el desafío subsecuente aumentando el nivel de aglutinación no específico (Lewis y Lawrence, 1983).

Se encontraron las diferencias en el patógeno de las bacterias, entre las especies pero dentro de las tinsiones de las mismas especies (Takahashi, et.al. 1984b; Arurne, 1989).

Chen, et.al. 1992; Vera, et.al. 1992; del la Peña 1993). Los Resultados no son conclusivos, sobre todo con el baño y metodologías del cultivo dónde muy pocos experimentos se han dirigido. El Roque (1995) concluye ese desafío de la inyección que no es una técnica fiable para evaluar la virulencia de una bacteria aislada. Ella encontró una diferencia pequeña entre bacterias aisladas e incluso cuando se compararon los patógenos de los camarones con bacterias patógenas que no eran los de ellos.

Tabla 5.1. Contorno de la inyección de retos en camarones peneidos.				
Especie de camarón	Bacteria empleada	Dosis (CFU camarón ¹)	Mortalidad	Referencia
P. setiferus	V. parahemolíticos	1.3x10 ⁶	LD50	Leong and fonaine,1979
“	V. anguillarum	2.2x10 ⁶	LD50	“
“	V. alginosus	9.1x10 ⁶	LD50	“
“	V. alginolítico	3.2x10 ⁷	LD50	“
“	V. alginolítico	1.0x10 ⁵	LD50	“
P. japonicus	Vibrio sp.	2.7x10 ⁴	100%	Takahashi et al, 1984
“	Vibrio sp.pj	1x10 ² -1x10 ³	LD50	De la peña et al. 1993
“	V. alginolítico	1.00x10 ⁶	LD50 96hr	Vera et al,1992
“	V. parahemolíticos	4,27x10 ⁷	LD50 96hr	“
“	V. anguillarum	8.32x10 ⁷	LD50 96hr	“
P. stylirostris	V. spp y Pseudomonas spp	4.0x10 ² para 3.3x10 ⁴	LD50	Arume,1989
“	E. coli	1.0x10 ⁶	LD50	“
P. Indicus	V. campbelli-like	2.19x10 ⁷	LD50	Hameed et al,1996
P. monodón	V. dansela	1x10 ⁶	75%	Song et al, 1993
“	V. harveyi	10 ⁵ -10 ⁶	53-100%	Jiravanich paisal y Miyaza1994
“	V. vulnificus	5.0x10 ⁶	75%	Alday Sanz,1994
“	V. vulnificus	1x10 ⁶ -1x10 ⁵	50%-20%	Roque,1995
“	V. anguillarum	5.0x10 ⁶	100%	Alday-Sanz,1994
P. brasiliensis	V. anguillarum	1x10 ⁷	100%	Esteve y Quijada,1995

5.2 OBJETIVOS

Los objetivos de esta parte del estudio eran:

Para probar la tinsión del patógeno previamente seleccionadas por un desafío de inyección en las gambas juveniles.

Selección de las tinsiones capaz de infectar la larva de la gamba con el potencial probiótico.

5.3 MATERIALES Y METODOS.

5.3.1 DESAFÍO DE INYECCIÓN PARA LOS CAMARONES JUVENILES.

Se criaron los *Penaeus vannamei* de las postlarvas en un sistema de recirculación que consisten en cuatro tanques de 500 L (Fig. 5.1 a), se alimentó con el nauplio de *Artemia* y alimentos comerciales. Cuando ellos alcanzaron un medio peso de 0.75 g, eran reunido y lo colocaron en 20 L de agua (Fig. 5. 1b). Camarones que pesan menos que 0.5 g o más de 1.0 g normalmente se desecharon. Una recirculación de los sistemas experimentales consistió en 16 acuarios que se conectaron a los tanques de crecimiento para proporcionar los mismos parámetros de calidad de agua durante los experimentos. El agua de la salida era reunida en un tanque de sedimentación, atravesado un lecho bacteriano, desinfectado con una luz de ultra violeta antes de devolver al sistema principal.

5.3.1.1 PROYECTO EXPERIMENTAL.

Los camarones se abastecieron a una densidad de diez por acuario con cuatro copias para el tratamiento. Debido al número del límite de agua, podrían correrse sólo cuatro tratamientos al mismo tiempo. Así cada experimento consistió en cuatro tratamientos, éstos eran inyectados con dos tinsiones de la prueba, un caldo de *Escherichia controlan* y un mando salino (2.5% NaCl). UN total de 5 experimentos fue dirigido y donde en cada experimento con agua de mar se probó con aislado del camarón enfermo. Una apreciación global de los experimentos se presenta en la figura 5.2.

Figura 5.1. El diagrama del sistema empleado para criar los camarones de penaeidae en el desafío con las bacterias del patógeno potencial en un acuario dónde los camarones se desafiaron en la balanza.

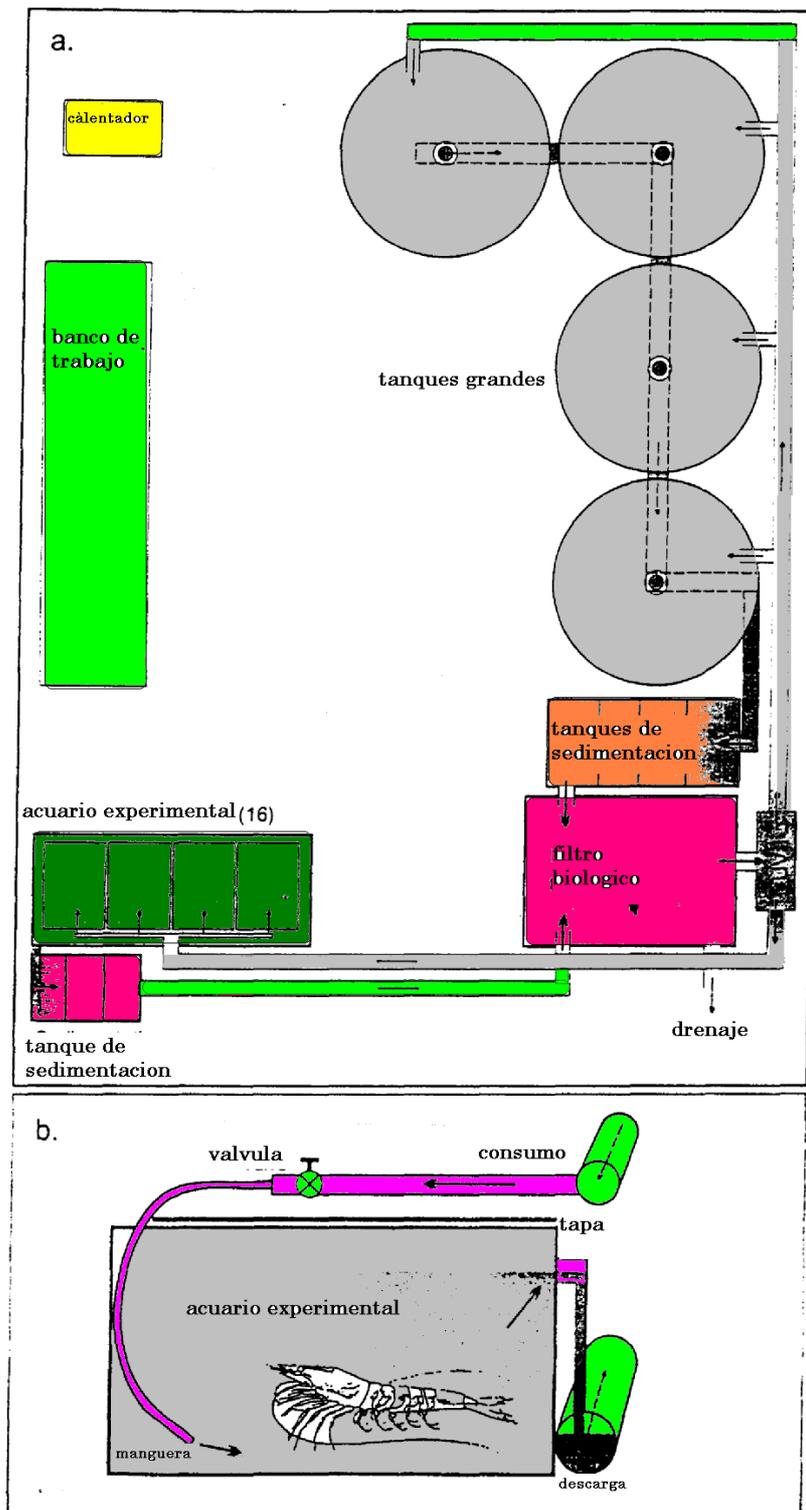
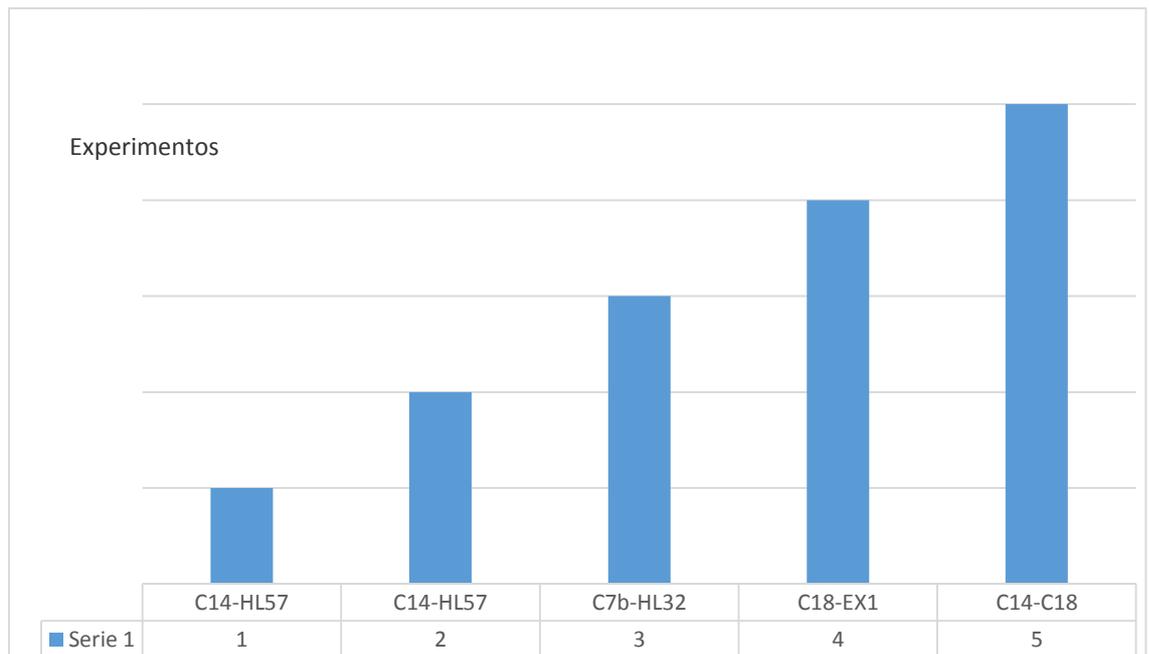


Fig 5.2 patogenicidad de cepas seleccionadas.



5.3.1.2 PREPARACIÓN DE LA INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS.

Las tnsiones bacterianas seleccionaron, como el potencial probióticos en el capítulo anterior C7b sea, C14, 018, y como los patógenos potenciales, HL32, EX1 y HL57 (vea capítulo 3 para las características de tnsión, fuente e identificación). Las tnsiones eran crecidas y la suspensión bacteriana procesada y descrita en capítulo 2.1.3.

Basado en los pre-experimentos, una densidad de 1.0 x ml1 de CFU se seleccionó como apropiado para demostrar las diferencias en las mortalidades. El camarón se le inyectó 5 ml de la inoculación en el segmento abdominal tercero y entonces se guardó bajo la observación para 96 hr, las mortalidades se anotaron en todas las horas para los primeros 24 hr 5 veces por día.

Para evaluar la presencia de spp de Vibrio en el sistema de agua antes de y después de la esterilización de UV, el agua se preparó en agar marino y agar de TCBS incubados a 30 °C y los CFU después de 24 hrs.

5.3.2 el patogeno en la larva del camarón (el desafío del baño)

El nauplio del *Penaeus stylirostris* (la fase N2-3) era reunido, y criado como lo descrito en el capítulo 2.2 Dos sistemas de cría eran empleado, el sistema de la botella de plástico (2.2.2.2) y el sistema del frasco (2.2.2.3). El último sistema era principalmente empleado

Para los pre-experimentos.

Tabla 5.2 experimentos llevados a cabo para la patogenicidad de la cepa seleccionada		
Exp	Cepa aprobada	Observaciones
1	C14,HL57	Alta concentración inyectada
2	C14,HL57	
3	C7b,HL32	
4	C18,EX1	Baja concentración de C18
5	C14,C18	

Tabla 5.3 experimentos para probar la patogenicidad de las cepas seleccionadas en larvas de *Penaeus stylirostris* con un desafío.

Exp	Tratamiento tratamiento controlado			Densidad (Nauplio l ⁻¹)	Rep	Observaciones
1*	HL57			70**	5	Pre-experimento en 21 botellas
2	HL57 - 2.5%	HL57 0.5%	-	120	3	Pre experimento con cepas de diferentes salinidades
3	Cepas PB3a PB5, PB6	PB5 PB3a,	-	120	5	Caldo de cultivo C14
4	Mix ¹ - 1.0ml l ⁻¹	Mix ¹ 3.0ml l ⁻¹	C14 3.0ml l ⁻¹	200	8	Inoc. De altas concentraciones bacterianas MIX ¹ =PB3a, PB5, PB6, PB8.
5	Mix ² - no Desinf-Desinf	Mix ²	-	120	9	Desinf con Iodo Inoc, 2.0 ml l ⁻¹ Mix ² = PB3a, PB5, PB6, PB8, RE8.
Pre 6	0 ug ml ⁻¹ 15ug ml ⁻¹	5ug ml ⁻¹ 30ug ml ⁻¹		120	4	La supervivencia de las larvas mudadas desinfectadas con florfenicol.
6	HL58 PB5	PB3a -		120	8	Prevención, desinfección con florfenicol.

5.3.2.1 BACTERIOLOGÍAS

Las tinsiones eran crecidas como descrito en sección 2.1.1. En algunos experimentos las larvas se analizaron para la densidad bacteriana como descrito en sección 2.1.4

5.3.2.2 PROYECTO EXPERIMENTAL

Se resumen los experimentos realizados en figura 5.3 y se describieron más allá en los experimentos, por lo menos la larva crecía sin cualquier inoculación bacteriana.

Experimento 1.

Patógeno de tinsión HL57.

El objetivo: (el pre-experimento) para investigar el patógeno de tinsión HL57.

El sistema empleado fue uno con 21 botellas plásticas (descrito anteriormente). Setenta zoea se pusieron en 1.0 L que se inoculó con el caldo bacteriano a 1.0 ml.

Otro caso negativo, la densidad de bacterias inoculada era 1.0 de ml. * el sistema preliminar. * * Se abasteció con zoea 1. Representante. = el número de copias.

La supervivencia de las postlarvas y la fase fue grabada.

Experimento 2.

El efecto de salinidad en la tinsión del patógeno HL57.

El objetivo: para determinar si las alteraciones en la salinidad a que la tinsión HL57 era crecido teniendo un efecto en su patogenicidad.

El sistema del frasco ha estado desarrollando y sólo 3 copias por el tratamiento y 4 del mando podrían correrse. Sesenta nauplio se abastecieron 4-5 en 390 ml. Un lote de tinsión HL57 se incubó en TSB + 2.5% NaCl y otro lote eran crecidos en TSB (0.5% NaCl).

El mando consistió en larvas sin la inoculación bacteriana. Se grabó la supervivencia de postlarvas y la fase al final del experimento.

Experimento 3.

larvas enferma complica el desafío

El objetivo: para investigar el patógeno de tinsiones P83a, PB5 y PB6 aislaron de una

“Zoea 2 ' con síndrome (vea la discusión).

Sesenta nauplio se inocularon 4-5 en 370 ml. Los tratamientos eran:

Cepas de o PB5

PB3a

PB3a, PB5 y PB6

Las larvas se inocularon con el caldo bacteriano filtrado

Se corrieron cinco copias para cada tratamiento. Se grabó la supervivencia de las postlarvas y la fase al final del experimento.

Experimento 4.

El desafío de la densidad de las larvas y bacteria alto.

El objetivo: para diferenciar los efectos de densidad del nauplio y la densidad bacteriana aumentada en las mortalidades.

Una mezcla de bacterias del patógeno potencial se inoculó a un volumen normal de inoculación (1.0 ml ') y a un volumen superior (3.0 ml *1). Los tratamientos consistieron en la inoculación de las tinsiones PB3a, PB5, PB6 y PB8 (8 copias):

La inoculación de o a 1.0 ml

La inoculación de o a 3.0 ml 11

C14 inoculó a 3.0 r' del ml

Ninguna inoculación bacteriál

Las larvas se desinfectaron previamente con 10 ml de yodo activo (Argentyne, a 10%, el Laboratorio Alfa y Omega, Manta Ecuador.) para 15 mm preparado en el agua de mar estéril. Después de que la desinfección las larvas se lavaron completamente con el agua de mar estéril y 100 nauplio se utilizaron 4-5 se abastecieron en frascos con 365 ml de agua de mar estéril. Se grabó la supervivencia de postlarvas y la fase al final del experimento.

Experimento 5.

Desafío de la desinfección de las larvas.

Objetivo: para determinar si la desinfección de la larva fuera más susceptible a la infección.

Una mezcla de tinsiones se inocularon PB3a, PB5, PB6, PB8 y RE8 a 2.0 ml 1.1 de larvas, los tratamientos eran:

La inoculación de tinsiones de larvas desinfectada

La inoculación de tinsiones no desinfectadas.

Larvas desinfectadas sin la inoculación bacteriana.

Un lote de nauplio fase 4-5 se desinfectó con el yodo a 10 mg para 10 mm y entonces se abastecieron 60 larvas en 370 ml. Se realizaron los tratamientos con 9 copias, se grabó La supervivencia de las posttarvas y la fase al final del experimento. Pre-experimento 6. La desinfección Larval con el florfenicol.

El objetivo: Para determinar los efectos de varias concentraciones del florfenicol antibiótico que enfoca en la desinfección, supervivencia y muda.

Nauplio se desinfectaron 2-3 con el yodo (10 mg 1.1 para 10 mm) los animales se abastecieron a una densidad de 60 por frasco. El siguiente tratamiento dónde las larvas se trataron con concentraciones de florfenicol:

0.0 ml1

5.0 ml1

15.0 ml

30.0 ml

Se corrieron cuatro copias de cada tratamiento. La supervivencia a Z1 y el número de nauplio que mudó a Z1 después de 48 hrs fue grabada. Se maceraron Larvas y se colocaron en agar marino y gelosa de TCBS para cuantificar la eficacia del antibiótico.

Experimento 6.

La Susceptibilidad de las larvas desinfectada.

El objetivo: Para investigar si la desinfección de las larvas fueran más susceptibles a infecciones.

Se desinfectaron Nauplios (1-2-3 con el florfenicol (15 ml' pg para 17 hr), completamente se lavó y se abasteció a 60 nauplios 4-5 por botellas con 420 ml de agua de mar estéril.

La inoculación de o de tinsión HL58

La inoculación de o de tinsión PB3a

La inoculación de o de tinsión PB5

o ninguna inoculación bacteriana

Cada tinsiones se inocularon a 1.0 ml de caldo por el litro de agua de mar. Ocho copias eran el rodamiento antifricción por tratamiento.

5.4 RESULTADOS.

5.4.1 DESAFÍO DE INYECCIÓN PARA LOS CAMARONES JUVENILES.

La diferencia más significativa en el peso de los camarones entre los experimentos 5

(Fg 5.4).

Se presentan las mortalidades obtenidas en los experimentos en Figura 5.2. No se observaron las mortalidades de Los camarones después de 48 hr del desafío de inyección y la mayoría ocurrieron durante

Las primeras seis horas, movimientos lentos y erráticos, anorexia y opalescencia al sitio de inyección o del músculo abdominal entero se observó en los camarones moribundos.

El coli de E. y la solución salina no produjeron las mortalidades en los camarones inyectados, con la excepción de un camaron inyectado con la salina en el experimento segundo.

5.4.1.1 experimento 1. F C14 y HL57.

Tabla 5.4 pesos de camarones inyectados. Experimentos con la misma letra en la celda inferior, no son estadísticamente diferentes Krustal Wallis un análisis de la varianza en filas y los procedimiento en parejas.					
Experimento	1	2	3	4	5
(g)	0.705	0.721	0.714	0.767	0.877
Desviación estándar	0.1573	0.2059	0.1479	0.1699	0.1742
Diferencia entre el tratamiento	H=8.840 p=0.886	H=9.47 P=0.852	H=21.640 P=0.117	H=20.790 P=0.144	H=17.53 P=0.0006
Tamaño de la muestra	160	160	160	160	140
Diferencia entre el experimento.	a	A	ab	b	c

En el primer experimento dónde fatiga 014 y HL57 se inyectó a las densidades altas

Tabla 5.5 pesos de camarones inyectados. Experimentos con la misma letra en la celda inferior, no son estadísticamente diferentes Krustal Wallis un análisis de la varianza en filas y los procedimiento en parejas.					
Experimento	1	2	3	4	5
(g)	0.705	0.721	0.714	0.767	0.877
Desviación estándar	0.1573	0.2059	0.1479	0.1699	0.1742
Diferencia entre el tratamiento	H=8.840 p=0.886	H=9.47 P=0.852	H=21.640 P=0.117	H=20.790 P=0.144	H=17.53 P=0.0006
Tamaño de la muestra	160	160	160	160	140
Diferencia entre el experimento.	a	A	ab	b	c

(Fig. 5.2), se observó ninguna diferencia en la mortalidad entre ellos (el SNK-prueba $p < 0.05$, $n=4$), pero los dos eran significativamente diferentes de los mandos (el SNK-prueba $p < 0.05$, $n4$).

5.4.1.2 EXPERIMENTO 2. FATIGA C14 Y HL57.

En el experimento segundo dónde fatiga C14 y HL57 se inyectó a baja densidades (Fig. 5.2b), una diferencia significativa se observó entre las tensiones probadas. El isolated de tensiones de una hemolinfa de el camarón enfermos (HL57) produjo una mortalidad significativamente superior que los otros tratamientos. La tinsión se aisló del agua de mar (C14).

Tabla 5.6. Detalles del experimento 1. Se inoculó con cepa bacteriana HL57.											
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Etap a larval	Z1	Z+	Z2	Z2+	Z3	Z3-M1	Z3-M1	Z3 - M1 M2	M2-M3	M3-PL1	M3-PL1
Inoculación (CFU ml ⁻¹)*	2.0 x10 ⁶	-	-	-	2.1x 10 ⁶	-	2.8x 10 ⁶	-	-	-	-
Microalgas (CFU ml ⁻¹)*	1.0x 10 ⁶	-	5.0x 10 ⁵	-	7.25x 10 ⁵	9.5x 10 ⁵	8.24 x10 ⁵	-	-	-	-
Especies de microalgas	30/70	-	0/70	-	0/100	0/100	0/100	-	-	-	-
Artemia (naup.ml ⁻¹)*	-	-	-	-	-	1.0	1.0	4.0	2.0	2.0	-
Temp °c	-	28	29	9	29-30	27	25	28	29	26	27
Agua *** Vol(ml)	1100	1100	1150	1150	1225	1300	1375	1375	1375	1375	1375

5.4.1.3 EXPERIMENTO 3. FATIGA C7B Y HL32.

El experimento tercero en que fatiga C7b y HL32 se inyectó (Fig. 5.2c), también se observaron las diferencias significantes; la tinsión se aisló del agua de mar (C7b) e identificó como *Y. alginolyticus* produjeron las mortalidades significativamente superiores que el aísle de la hemolinfa de un camarón enfermo (HL32). El (último no era significativamente diferente de los tratamientos del mando.

5.4.1.4 EXPERIMENTO 4. FATIGA C18 Y EX1.

En el experimento cuarto (Fig. 5.2d) tinsión 018 se inyectó a un más bajo las densidades. Ninguna diferencia significativa se encontró entre las tinsiones C18 y EX1 a las densidades empleadas.

5.4.1.5 EXPERIMENTO 5. FATIGA C18 Y C14.

En el experimento quinto (Fig. 5.2e) tinsión 018 todavía no podría inyectarse a la densidad deseada. Las mortalidades obtuvieron cuando fatiga C14 fue inyectado y era significativamente diferente a los otros tratamientos. En uno de las copias del *E. coli* como tratamiento, el flujo de agua detuvo por una noche, el agua se puso muy turbia y 4 camarones se murieron. De otra copia un camarón saltó fuera del acuario, este mismo pasó en un acuario del tratamiento de NaCl.

La filtración ultravioleta en el sistema recirculando redujo las bacterias significativamente en la gelosa de TCBS, de una media de 1.35×10^2 antes del tratamiento a una media de $1.50 \text{ m}'$ de CFU después del tratamiento de UV (Mann-Whitney prueban = 69.00, $p = 0.0379$, $n7$). En la gelosa Marina una reducción muy significativa se observó también, de $8.88 \times 4.38 \times 10^1 \text{ ml}'$ de CFU (MannWhitney prueban = 77.00, $p = 0.0006$, $n7$).

Las densidades mostradas son las densidades logradas en el agua después de la inoculación. * La *Microalga especie proporción: Isochrysis / Chaetoceros. El volumen de agua aumenta debido a la suma de microalga.

5.4.2 DESAFÍO DEL BAÑO CON LARVAS DE CAMARÓN.

5.4.2.1 EXPERIMENTO 1. TINSIÓN DEL PATÓGENO HL57.

El primer sistema probado era difícil dado que había que manejar la temperatura que fluctuó significativamente durante el curso del experimento sobre todo (tabla 5.6). Las larvas se abastecieron como Zoea 1, y ninguna postlarva se observó antes del 1 día del 0th. Ninguna diferencia se observó entre los dos tratamientos (el t-prueba = 1 .007, $p = 0.3477$; Fig. 5.3a). UNA supervivencia baja se obtuvo en los tratamientos y la supervivencia máxima lograda era 38.57%. UNA diferencia significativa se observó en el porcentaje de larvas que mudó a postlarvas al final del experimento (Fig. 5.4a), significativamente más postlarvas se observaron en el mando comparado al tratamiento de HL57.

5.4.2.2 EXPERIMENTO 2. EL EFECTO DE SALINIDAD EN EL PATÓGENO DE TINSIÓN HL57.

El nuevo sistema fue probado pero la temperatura varió significativamente (Tabla 5.7). En estas postlarvas del experimento se obtuvo en sólo 9 días después de abastecer con los nauplios 5.

Se proporcionaron cuatro inoculaciones bacterianas a los frascos correspondientes, y al segundo día el agua se puso turbia en esos frascos. En el tercer día estaba de nuevo claro.

Las supervivencias altas (sobre 70%) era registrado sin la diferencia significativa entre los tratamientos ($E = 0.4545$, $p = 0.6523$, $n = 4$ y 3 ; Fig. 5.3b). No se obtuvieron las diferencias en el porcentaje de larvas que mudaron a postlarvas ($F 0.3644$, $p = 0.7071$, $n = 3$ y 44), ilustró en Figura 5.4b.

5.4.2.3 EXPERIMENTO 3. LARVAS ENFERMAS FATIGA EL DESAFÍO.

En estas postlarvas del experimento también se obtuvo en 9 días con una variación ligera

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Etapa larval	N5	Z 1	Z2	Z2+	3	M1	M1- M2	M3	PL1
Inoculo (CFUml ⁻¹)	5.1x 10 ⁶	-	-	1.8x 10 ⁶	-	2.0x 10 ⁶	-	2.0x 10 ⁶	-
Microalgas (CFU ml ⁻¹)	1.87x 10 ⁵	1.2x 10 ⁵	1.84x 10 ⁵	1.2x 10 ⁵	-	-	-	-	-
Especie Microalgas	30/70	30/70	0/100	0/100	-	-	-	-	-
Artemia (naup.ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	1.0	1.0	3.0	-
Temp °C	27	28	29	28	2	27	27	29	30
Agua Vol (ml)	390	420	470	500	-	-	-	-	-

en la temperatura (Tabla 5.8). Simplemente se proporcionaron una vez los nauplios de Artemia debido a una escasez en el suministro, pero ninguna mortalidad pesada fue observada. Las bacterias se inocularon 3 veces a 48 intervalos del hr que empiezan cuando los nauplio fueron abastecidos, el volumen agregado era 0.1 ml por cada 100 ml de agua de mar.

Se obtuvieron las supervivencias altas sin las diferencias significantes entre los tratamientos (la $H = 6.923$, $p 0.1400$), aunque el tratamiento dónde fatiga PB3a, PB5 y PB6 sea

Las densidades mostradas son las densidades logradas en el agua después de la inoculación. * Microalgas: Isochrysis / Chaetoceros. * * * El volumen aumenta debido a la suma de microalgas.

Inoculado tendido para ver la supervivencia (Fig. 5.3c). Se observaron las

Diferencias en el número de larvas que mudaron a postlarvas entre los tratamientos (la H = 11.41, P = 0:0223), el tratamiento donde fatiga PB3a, PB5 y PB6 fue inoculado juntos era significativamente diferente que el resto (SNK prueban, p <0.05) como puede apreciarse en Figura 5.4c.

Las densidades mostradas son las densidades logradas en el agua después de la inoculación. * La *Microalgas especie: Isochrysis / Chaetoceros. El volumen de agua aumenta debido a la suma de microalgas. ? = ningún datos grabó.

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Etapas larval	N5	Z1	Z1+	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL1
Inoculo (CFUml ⁻¹)	x10 ⁵	-	X10 ⁵	-	X10 ⁴	-	-	-	-
Microalgas (CFU ml ⁻¹)	1.35x 10 ⁵	1.41x 10 ⁵	7.22x 10 ⁴	-	-	-	-	-	-
Especie Microalgas	30/70	30/70	0/100	0/100	-	-	-	-	-
Artemia (naup.ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-
Temp °C	29	28	29	28	29	29	29	29	29
Agua Vol (ml)	370	390	410	430	430	430	480	530	530

5.4.2.4 EXPERIMENTO 4. EL DESAFÍO DE DENSIDADES ALTAS EN LARVAS Y BACTERIAS.

Las primeras postlarvas se observaron en el 1 día de O de cultura (Mesa 5.9). Empieza el experimento la mezcla de tensiones bacterianas (PB3a, PB5 PB6 y PB8) se inoculó lo normal (1.0 ml 1) y las concentraciones altas (3.0 ml); y C14 sólo a la concentración alta. Después, ninguna inoculación se hizo hasta 72 hrs porque el agua de los tratamientos de la concentración altos era

turbia. Entonces, se realizaron dos inoculaciones extensas cada 48 hr a la concentración normal.

Se observaron diferencias en la supervivencia entre los tratamientos (Fig. 5.3d). La inoculación de volumen alto de caldo bacteriano (3.0 ml) rindió la más baja supervivencia, sin tener en cuenta la tinsión (Mesa 5.10). El porcentaje de larvas que había mudado a postlarvas al final del experimento era muy significativamente diferente entre los tratamientos (la $H = 16.66$, $p = 0.0008$)(Tabla 5.10 y Fig. 5.4d). Los tratamientos dónde un volumen alto fue inoculado produjeron menos postlarvas que los otros.

Las densidades mostradas son las densidades logradas en el agua después de la inoculación. * La microalga especie proporción: Isochrisis / Chaetoceros. Los aumentos de volumen de agua debido a la suma de microalgas, ningún dato se grabó.

Tabla 5.9. Detalles del experimento 4. Los tratamientos fueron mezclas de PB3a y PB6 inoculado el primer día con (1.0 ml^{-1}), y C14 con altas concentraciones (3.0 ml^{-1}).										
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Etapal larval	N5	Z1	Z1 +	Z2	Z3	Z3-M1	M1 - M2	M2-M3	M3-PL1	PL1
Inoculo (CFU ml^{-1})	2.8×10^5 8.4×10^5	-	-	C14 2×10^4	-	C14- 2.8×10^5	-	C14- 4×10^4	-	-
Microalgas (CFU ml^{-1})	1.24×10^5	1.24×10^5	-	-	-	-	-	-	-	-
Especie Microalgas	30/70	30/70	-	0/100	-	-	-	-	-	-
Artemia (naup. ml^{-1})	-	-	-	-	-	1.9	2.0	1.0	-	-
Temp °C	28	29	29	28	-	29	29	31	30	30
Agua Vol (ml)	365	385	385	460	460	460	500	500	500	500

5.4.2.5 EXPERIMENTO 5. DESAFÍO DE DESINFECCIÓN DE LAS LARVAS.

Se obtuvieron Postlarvas al 10 día de experimento (Mesa 5.11). La inoculación bacteriana se hizo 3 veces a 72 intervalos x hr, y una baja concentración que intencional se logró.

Ninguna diferencia significativa se logró entre los tratamientos (la H = 5.883, p = 0.1175, n = 9; Fig. 5.3e). El tratamiento dónde las larvas fueron desinfectados tendió a tener la supervivencia mayor que el mando; Las larvas que también se desinfectó y las bacterias inocularon, las supervivencias producidas. Se observaron las diferencias en el porcentaje de postlarvas (E = 7.642, p = 0.0006, n=9) (Fig. 5.4e). Se resumen Los tratamientos que difieren en la mesa

5.12. Los tratamientos dónde se inocularon las bacterias mostraron el más bajo porcentaje de postlarvas mudaron a 10 días de experimento.

Las densidades mostradas son las logradas en el agua después de la inoculación * la *Microalga especie: Isochrisis / Chaetoceros. El volumen de agua aumenta debido a la suma de microalga.

Tabla 5.10. Diferencia en el porcentaje de postlarvas en el tratamiento de experimento 5.				
Tratamiento (volumen inoculado)	Control	Larvas Desinfectadas	Larvas + mezcla bacterial	Larva desinfectada +mezcla bacterial
% PL	68.49	82.10	31.06	32.11
Std Desviación	23.97	13.60	32.35	35.59
N°	9	9	8	8
Diferencia	A	a	b	b

Tabla 5.11. Detalles del experimento 5. Tratamiento con larvas infectadas y desinfectadas con una mezcla de PB3a PB5 PB6 PB8 Y RE8.										
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Etapa larval	N5	Z1	Z1+	Z2	Z2-Z3	Z3-M1	Z3-M1 M2	M1-M2	M3-PL1	PL1
Inoculo (CFU ml ⁻¹)	6.2X 10 ⁴	-	-	1.5X 10 ⁴	-	-	3.7X 10 ²	-	-	-
Microalgas (CFU ml ⁻¹)	1.6x 10 ⁵	8.8x 10 ⁴	-	7.3X 10 ⁴	-	-	-	-	-	-
Especie Microalgas	30/70	30/70	-	0/100	-	-	-	-	-	-
Artemisa (naup. ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	1.0	1.5	1.5	2.9	-
Temp °C	27	28	29	28	28	30	28	28	29	28
Agua Vol (ml)	370	390	390	410	410	410	475	475	475	475

5.4.2.6 PRE-EXPERIMENTO 6. LA DESINFECCIÓN DE LARVAS CON EL FLORFENICOL.

La carga bacteriana del nauplio desinfectado con el yodo estaba reducida de 7.40 x10² a 3.02 x 10² nauplio 1 de CFU de bacterias heterotróficas totales. En la gelosa de TCBS la reducción era de 2.6 x10¹ el nauplio 1 de CFU para poner a cero. Entonces el nauplio (fase 2-3) se puso en las unidades experimentales, después de que ellos mudaron a zoea 1, los resultados de la desinfección se presentan en tabla 5.13 y Figuran 5.5. AB los tratamientos eran significativamente diferentes (la H = 13.4, p = 0.0038, n = 4).

Tabla 5.12. Detalles del experimento 6. Tratamientos con larvas desinfectadas e inoculadas.										
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Etapas larval	N5	Z1	Z1+	Z2	Z2- Z3	Z3 - M1	M1- M2	M2	M2 - M3	M3- PL1
Inoculo (CFU ml ⁻¹)	1.1X 10 ⁴ 1.3X 10 ³ 3.0X 10 ⁴	1.1X 10 ⁴ 5.3X 10 ² 6.6X 10 ²	6.2X 10 ⁴ 6.6X 10 ³ 2.1X 10 ⁴	-	1.1X 10 ⁶ 3.3X 10 ⁵ 7.0X 10 ⁴	-	6.3X 10 ⁶ 3.5X 10 ³ 5.0X 10 ⁴	-	-	-
Microalgas (CFU ml ⁻¹)	6.2X 10 ⁴	6.5X 10 ⁴	-	6.0X 10 ⁴	-	-	-	-	-	-
Especie Microalgas	30/70	30/70	-	0/100	-	-	-	-	-	-
Bacteria en Microalgas	6.5x 10 ²	1.3x 10 ³	-	1.2x 10 ⁴	-	-	-	-	-	-
Artemia (naup.ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	1.0	2.0	2.3	2.3	-
Temp °C	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
Agua Vol (ml)	420	440	440	460	410	460	460	460	460	460

Más atrás 48 hrs de experimento que los nauplio mudaron a zoea 1, la supervivencia fue estimada y significativamente diferente entre los tratamientos se observó (el F = 0.7152, p = 0.562, n = 4). El porcentaje de larvas que mudó a zoea 1 al final del experimento era significativamente diferente entre los tratamientos (H 10.94, p = 0.0121 n = 4), los resultados se presentan en Tabla 5.13.

Tabla 5.13. Las Diferencias en la densidad bacteriana en la zoea 1 las larvas trataron con diferente las concentraciones de florfenicol y el porcentaje de larvas después de que mudaron a zoea 48 hrs. Los tratamientos con la misma carta no son significativamente diferentes (el método de SNK; $p < 0.05$, $n = 4$).

Tratamiento	0.0	5.0	15.0	30.0
(CFU nauplios ⁻¹)	2.59x10 ⁴	9.50x10 ³	3.33x10 ²	2.75x10 ²
Derivación estándar	7.66x10 ³	8.89x10 ³	4.00x10 ²	2.22x10 ²
Diferencia st	A	b	C	d
% Zoea 1	95.85	92.66	80.25	13.56
Derivación Estándar	4.43	13.33	14.81	10.20
Diferencia st	A	a	A	A
Concentración de florfenicol en ml ⁻¹				

5.4.2. 7 EXPERIMENTO 6. LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS LARVAS DESINFECTADA.

Después de que los nauplios se desinfectaron para 17 hr con el florfenicol, una carga bacteriana de 5.65 nauplio ml de CFU fue grabada cuando se apunto en la gelosa marina y pone a cero en la gelosa de TCBS. La inoculación bacteriana varian entre los tratamientos y durante el experimento (Tabla 5.14).

Una inoculación alta de bacterias se introdujo con las microalgas como puede verse de la tabla 5.14.

Ninguna diferencia significativa se observó en la supervivencia de las larvas entre los tratamientos ($F = 0.3812$, $p = 0.7673$, $n = 8$) (Fig. 5.3f) o en el porcentaje de larvas que mudaron a postlarvas (la $H = 5.734$, $p = 0.1253$, $n = 8$) (Fig. 5.4f).

Las densidades mostradas son las densidades logradas en el agua después de la inoculación, las dimensiones Corresponden respectivamente a los HL5S, P85 y tratamientos de °B3a. La " Microalgas especie proporción: /sochrisis /Chaetcceros. * El volumen aumenta debido a la suma de microalgas.

Figura 5.3. La Mortalidad de *P. stylirostris* .Las larvas en un baño con las tinsiones bacterianas diferentes. Signifique $\pm 95\%$ intervalo de confianza.

Figura 5.4. El porcentaje de larvas que mudaron a postlarvas al final de cada experimento.

Intervalo de confianza $\pm 95\%$.

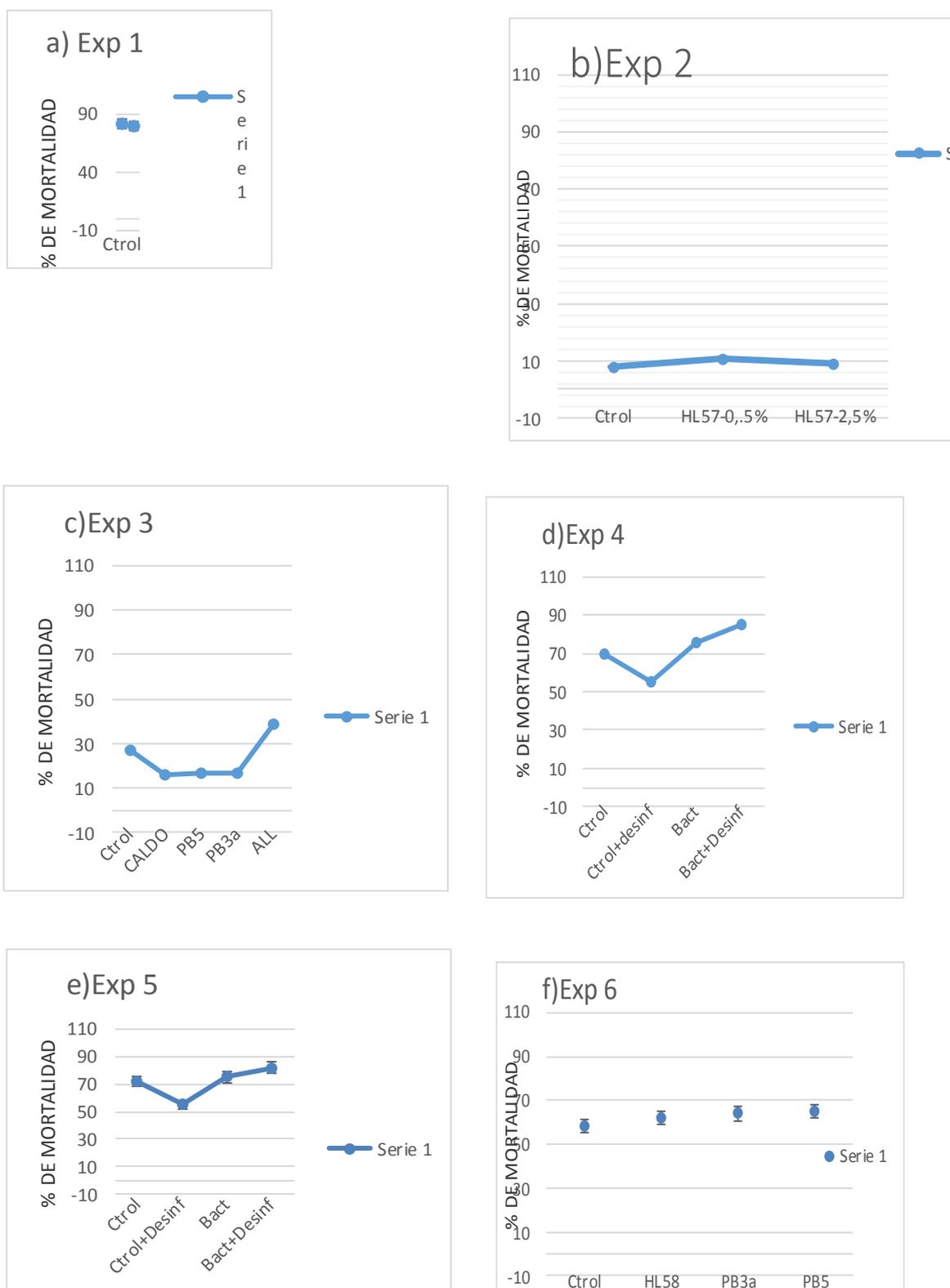
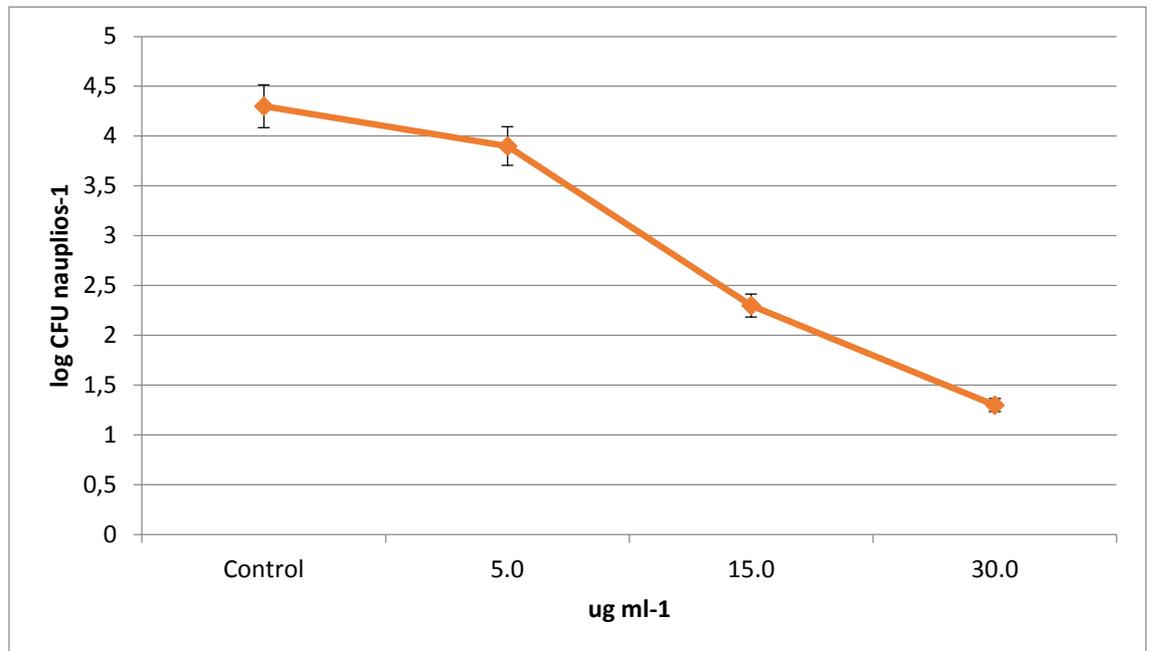


Figura 5.5. La carga bacteriana en nauplios de *P. Stylirostris* desinfectado con Florfenicol a concentraciones diferentes.



5.5 DISCUSIÓN.

5.5.1 DESAFÍO DE INYECCIÓN.

Se encontraron las diferencias entre las especies probadas, tensión que HL57 identificó como *V. Parahaemolyticus* mostraron más patógeno que los otros. Los resultados similares observaron por Vera et. (1992) mostró que una tensión de *V. parahemolyticus*. También causó mortalidades superior los *V. anguillarum* o. El *alginolyticus*. Leong y Fontaine (1979).

El *paraemolyticus* del párrafo también era más patógeno seguido por el *V. anguillarum*, *algosus* de *V.* y *V. alginolyticus* en el orden descendente de ser patógeno. La eta de Chen. (1992) encontraron las diferencias entre otros vibrios, se obtuvieron las mortalidades superiores con una tensión de *harveyi* con uno de *V. de nereis*.

El *V. alginolyticus* aislado no muestra las diferencias en su efecto del patógeno Como se explica porque los dos se aislaron del agua de mar. En otro estudio, de *V. alginolyticus*. Los diferentes patógeno tenían para el *P. stylirostris*. Desgraciadamente se mencionó ningún detalle sobre su origen. Otra de las especies que se identificaron tentativamente como el sp de *Vibrio*. PJ, (del la

el eta de Peña. 1993). Los autores de Sorne han concluido que la bacteria patógena hacia el camarón son de la misma región.

Ellos aislaron la sacarosa luminiscente de las tinsiones negativas de los criaderos en Ecuador y

Thailandia durante los episodios de mortalidades larvales masivas; entonces ellos probaron las tinsiones contra las larvas del *P. monodon*. Aunque no bastantes datos fueron presentados, sus resultados aparecen

Demostrados en cepas asiáticas eran más virulentos que los de suramerica, para el monodon de *P. asiático*.

El *Escherichia coli* indujo que las mortalidades más alta de 5.13×10^5 la CFU ml/ camarón. Arume (1989) los informes específicos de *E. coli*. Tiene un LD50 72hr de 1.0×10^6 CFU /ml camarón. Leong y Fontaine (1979) mostró ese conglomerado de *Micrococcus* (la tensión GFC76-36) no causó ninguna mortalidad con un valor de 1.9×10^7 CFU /ml camarón (62-138 camarón del mm). Según los datos aquí y por Arume (1989), mortalidades producidas por las densidades inyectadas sobre 10^6 CFU/ ml camarones más probablemente a tóxico debido a los números altos de bacteria dentro de los camarones. Una densidad que alcanza 10^6 CFU/ ml camarón podría ser el más alto eso puede inyectarse sin causar un tóxico celular, pero las tinsiones del patógeno reales deben causar las mortalidades a las densidades bajas CFU/ ml los camarones (el peso húmedo). Sin los mandos bacterianos, es difícil establecer si las mortalidades eran debidas al patógeno real de la bacteria o a la presencia de células bacterianas inoculadas.

Mirando los resultados con tinsión C14: con una densidad de 2.69×10^4 / ml de CFU que casi ninguna mortalidad fue grabada, pero con una densidad de 1.58×10^5 , casi todos los camarones se murieron. En algunos los experimentos informaron, se inyectaron a diez camarones de una densidad bacteriana y las mortalidades aumentadas rápidamente de una densidad al próximo (el Chen et al., 1992).

Otro factor importante es el tiempo después de que se observan las mortalidades. En este estudio,

Raramente se descubrieron las mortalidades 24 hrs después de la inyección ni antes de 4 o 5 hrs. También se han informado simplemente las mortalidades altas después de 4-6 hrs de inyección (Vera et al.1992; el Hameed et al. 1996) y a 12-24 hrs (Abraham et al., 1997), cuando una densidad de 10^8 CFU fue inyectada a los camarones.

Con una más baja densidad ($10 - 10^6$ CFU 10^1) el Jiravanichpaisal et al. (1994) obtuvo

Mortalidades sobre 80% en más de 20 hrs. Con los resultados discutió aquí, parece claro que las mortalidades en los camarones en menos de 5-6 hrs después de que la inyección puede ser una indicación de un tóxico celular, sobre todo si una dosis fuerte se inyecta.

Las primeras señales de tinsión notadas en los camarones eran el letargo, el colorido opaco del abdomen y anorexia, seguido por la natación errática y finalmente la muerte. Sobre todo en el que sobrevivía el desafío con potencialmente bacterias del patógeno, En algunos organismos, una área de necrosis se observó en el área de inyección después de algunos días. Casi ninguna evidencia de necrosis se vio en camarones probadas con la solución salina o con el *E. coli*. Vera et al del et. (1992), etal de Hameed. '(1996) y

Abraham et al. (1997) informó las mismas señales en los camarones, pero los autores anteriores también notaron una flexura dorsal pronunciada del abdomen. Lightner y Lewis (1975) observó las señales similares en camarones infectados tomada de las poblaciones naturales.

5.5.2 DESAFÍO DEL BAÑO CON LARVA DEL CAMARÓN.

Se han publicado muy pocos artículos en los desafíos del patógeno experimentales en los camarones penaeidae.

La situación geográfica En larvas de *P. monodon*, los resultados han mostrado la sacarina del asiático.

Las tensiones de *Vibrio* negativos son mucho más virulentas que el suramericano (Groumellec. 1993). Tensión de HL57 se aisló de un camarón juvenil enfermo, pero no se aisló las larvas enfermas. Quizá también es importante considerar los camarones desafiantes con las tensiones aisló de un ambiente similar y/o fase de crecimiento. Las tensiones aislaron de una erupción severa de ' síndrome de Zoea II en un criadero (las tensiones codificaron PB) no causó las mortalidades significantes en larvas coleccionado del mismo criadero sólo semanas después de la erupción. La única diferencia significativa observó, era un más bajo porcentaje de larvas que mudaron al postlarvas al final del experimento (Fig. 5.4c). Sin embargo, cuando algunos de éstos se aislan y se inoculó juntos (a la misma densidad final), se obtuvieron las diferencias significantes en el porcentaje de postlarvas conectado y una tendencia hacia la más bajo supervivencia se observó en las larvas (los Higos. el 5.3c-d y 5.4c - el d). Al parecer una combinación de bacterias patógenas potenciales sea más capaz de dañar la actuación de las larvas que cada bacteria probaron exclusivamente. Inoculando un volumen alto de caldo bacteriano (3.0 / ml) reducido la supervivencia significativamente en el tratamiento de tensiones de potencial patógeno, pero también en el tratamiento dónde un potencial probiótico se inoculó al mismo volumen. El agua en ambos tratamientos era turbia y las larvas se infringieron las reglas pesadamente con ruinas que los hacen incapaz mover libremente o alimento. Un modelo similar se observó en un experimento del capítulo anterior estaba infringiendo las reglas fuerte y la turbiedad se notó después de la inoculación de 2.0 ml/l de caldo bacteriano (sección 4.4.3.3 y Fig. 4.7). Bacterias Naturales que habitan larvas o postlarvas podrían ser capaces de acción como una barrera contra la colonización por otras bacterias, incluso los patógenos potenciales (el Fuller, 1989a). El levantamiento de prioridad de la bacteria a la inoculación de tensiones del patógeno puede hacer el organismo más susceptible a la infección (Bonhoff. 1954). Las larvas de camarón se desinfectaron con yodo a desafiarlos con las tensiones del potencial patógeno (experimento 5). El tratamiento de yodo no tenía la acción desinfectante suficiente, y periodo de exposición más largos o las densidades superiores podrían haber dañado a la larva. En un experimento segundo de la larva se desinfectó con el yodo y entonces trató con el florfenicol, pero esta combinación tampoco pudo desinfectar a la larva completamente. La

concentración más apropiada (15 mg) izquierdo una densidad de 3.33×10^2 de CFU / larval final del experimento de un $7.40 \times$ CFU de los 10 nauplios que empezaron. El yodo y los tratamientos del florfenicol sólo manejaron reducir la carga bacteriana en la larva por la mitad. Con esta reducción, bastantes bacterias pueden haber estado todavía presentes para proteger a las larvas de acción de los patógenos potenciales, para que los resultados del experimento sexto no mostraran diferencia en las mortalidades.

La toxicidad de florfenicol se ha analizado en larvas de *P vannamei*. Y *stylirostris*. Y un LC50 de 64 ml del pg se estableció para el nauplio y zoeas (eta de Williams? 1992). Ellos también establecieron la concentración bajo-observar-efecto (LOEC) a 4 ml. En este estudio una concentración de 15 ml no representó ninguna diferencia significativa en la supervivencia o mudando el nauplio, pero a 30 ml1 significativamente la reducción en el número de nauplio que mudó a zoea 1 fue observada.

5.6 CONCLUSIONES.

El desafío de inyección es un método fiable para obtener las diferencias significantes en las mortalidades de los camarones produjo con especies diferentes o tinsiones, si una densidad adecuada se inyecta y controla incorporado en el proyecto experimental. Para los propósitos de la comparación, es aconsejable informar la densidad de bacterias inyectada como el ml de CFU (el peso húmedo) el camarón; pero también informa los datos en el mando fatiga, las diluciones emplearon y tipo de preservación de tinsiones.

La cepa HL57 era significativamente más patógena que otras tinsiones e inyectaron baja densidad de CFU g camarón. C14 y C7b causaron las mortalidades significantes si inyectó a las densidades sobre 1 CFU g1 camarón. El E coli. (ATOO 25922) incluso inyectó a la densidad más alta usada en los experimentos (5.13×10^5 CFU ml camarón) no pudo causar las mortalidades significantes. Es importante incluir una bacteria inocua como el mando.

No se obtuvieron las mortalidades significantes en los desafíos del baño experimental con las larvas, aunque a veces los larvas estaban detenidos en la mudas de postlarvas. La presencia de bacterias en el sistema y/o en la larva podría haber actuado como una barrera que protegió a la larva de la colonización por las bacterias patógenas. Los esfuerzos por completar (y desinfectar las larvas que son más susceptible a la infección eran infructuosos.

5.6.1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO EXTENSO

Sería deseable que continúen con este trabajo y las pruebas establezcan un sistema de desafío reproductible para las larvas del camarón para probar la hipótesis que las bacterias naturales actúan como una barrera contra la colonización por las bacterias del potencial patógeno.

Teóricamente las larvas deben presentar algún amable de actuación reducida, o estimó como la más baja supervivencia, retraso de muda, debilidad, o de cualquier otra manera.

Para los resultados menos inconstantes, es importante tener un lote genéticamente uniforme de organismos de la prueba, y puede obtenerlos en cada reunión de tiempo.

Varias tinsiones con los pocos camarones en varias diluciones podrían dar un patógeno de cada tinsión.

También es importante conservar las tinsiones bacterianas en un medio apropiado, como el nitrógeno líquido a -70 oC.

CAPITULO VI

6. COMPORTAMIENTO DE LAS LARVAS INOCULADAS CON LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO.

6.1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades bacterianas son consideradas como las causas para las mayores mortalidades en los criaderos de los camarones - (Wyban y Sweeney, 1991.; Wilkenfeld, 1992) y deterioro de la producción consistente (los Daniel, 1993). Para el Biólogo encargado del criadero intentar controlar las infecciones bacterianas o incluso la presencia de bacterias del potencial patógeno en el sistema. Básicamente, se han llevado a cabo dos formas de mando bacteriano en los criaderos del penaeidae, el mando químico y biológico.

6.1.1 MÉTODO BACTERIANO EN EL CRIADERO.

El tratamiento antibiótico es la forma ampliamente usada de mando bacteriano en los criaderos de los camarones. En Ecuador, se usan furazolidone y cloranfenicol respectivamente a 0.2-0.6 y 5.0 ml x tn (el Castaño, 1989), aunque recientemente se han usado eritromicina y tetraciclina (los Daniel, 1993) las dosis arriba de 10.0 ml x tn. En la oxitetraciclina de Thailandia es el antibiótico normalmente usado y la eficacia de este compuesto ha disminuido en muchas áreas (el Chanratchakool et al., 1995). Hasta la fecha no está disponible para los criaderos mexicanos, pero a través de la comunicación personal con varios gerentes, los mismos antibióticos usados en Ecuador son empleado en México.

Normalmente un " combinado " de antibióticos ha preparado y ha administrado regularmente la base, sin tener en cuenta cualquier antibiograma anterior o la concentración inhibitoria mínima (MIO) los análisis. La quimioterapia antibacteriana restringiendo a sólo 1 o 2 los compuestos no pueden ser el curso de acción bueno porque aumenta la presión selectiva para la resistencia antibacteriana (Weston, 1996). Se usan muchas veces en los criaderos a las concentraciones bacteriostáticas y permitiendo la generación de tinsiones resistentes (el Zherdmant et al., 1997). La Resistencia puede ser de resistencia intrínseco o adquirido, intrínseco la resistencia natural poseída por una especie bacteriana y normalmente puede especificar por los genes cromosómicos (Towner, 1995). La resistencia Adquirida enlata el b debido a la mutación cromosómica o a la transmisión entre las células; la transmisión genética puede llevarse a cabo por el plasmidio, bacteriófago o por el traslado directo de información genética (Towner, 1995). También un agente antibacteriano puede aumentar el nivel de resistencia a muchos otros compuestos, como es el caso de cruz-resistencia entre la oxitetraciclina y sulfadimethoxine-ormetoprim; la cruz-

resistencia puede ser atribuible, en parte, a la producción de plásmidos que pone en código la resistencia al antibacteriales múltiple (Weston, 1996).

Un acercamiento menos dramático para controlar el número excesivo de bacterias en el sistema está aumentando los tipos de cambio de agua, mientras filtrándose el agua de mar y multi-poniendo a punto el alimento fijan (Wyban y Sweeney, 1991). UV y esterilización del cloro son los métodos de la desinfección ampliamente usados para más equipo del criadero, pero el ozono está usándose más a menudo

(Wilkenfeld, 1992). Un secado completo al exterior del criadero es muy beneficioso aunque no frecuentemente practicado debido al costo (los Daniel, 1993). Un criadero tiene que estar seco durante por lo menos una semana antes de reabastecer para tener una desinfección eficaz (Wilkenfeld, 1992).

Evidentemente, el uso de antibiótico debe evitarse en lo posible y métodos alternativo necesitan ser desarrollado o perfeccionados. El uso de bacterias probióticas para que -compita o prevenga la colonización por las tinsiones del patógeno. La utilización del probiótico en acuicultura y específicamente en criaderos de larvas de camarón presenta en capítulo 1, secciones 1.5 y 1.5.1 respectivamente. Este tipo de mando podría ser el más medioambiental amistoso y el que impone el menor riesgo a la industria.

6.1.2 el uso de nauplio de Artemia como un modelo para investigar la teoría del probiotico.

Artemia es un organismo muy útil para los experimentos debido a sus únicos rasgos. Puede ser criado en grandes cantidades de animales homogéneos y se sale del cascarón fácilmente en las condiciones estériles.

Por consiguiente se usó como un modelo para investigar la calidad del probiótico de la tinsión seleccionada.

Se han usado los nauplio de Artemia como los vectores por entregar compuestos de terapéuticas nutritivas de diversos valore a las fases larvales de animales acuáticos. Por ejemplo, pueden enriquecerse los nauplios con las emulsiones del lípido para aumentar los niveles de ácidos grasos no saturado (eta de Dhert. 1990; Vera, 1992) o ácido ascórbico (eta de Mohney. 1990). Chemotherapeutants, como el trimethoprim-sulfamethoxazoie (eta de la Silla. 1991), sulfadimethoxine-ormetoprim (18), oxitetraciclina (el Roque, 1995), sarafloxacin (Dixon., 1995; El etal de Duis., 1995), sulfadimethoxine la sal de sodio y enrofloxacin (Cappeliaro un. 1993) también se ha introducido con éxito en los organismos de cultivos de nauplio de Artemia.

Inoculando los intestinos de animales designados con " las bacterias del probiótico " a través del bioencapsulación y alimentación son otro uso alternativo para el nauplio de Artemia. Sin embargo, literatura que trata con el asunto es escasa. Se han introducido las Bioencapsulación, bacterias con ácido láctico son éxito en larvas del camarón con las mejores tasas en supervivencia (Garcia-de-la-Banda, 1992). Varias bacterias han estado incorporadas en el nauplio de Artemia para desafiar la larva del camarón oralmente con un patógeno los Vibrios anguillarum (Silla., 1994a). Esta ruta también se ha usado para organismos vivientes del mar (de la Silla. 1994b), la carpa juvenil (Joosten, eta. 1995) y otra especies de peces (Campbell 1993).

6.2 OBJETIVOS.

Evaluar a las larvas de *Penaeus vannamei* inoculadas con la bacteria del potencial probiótico.

Análisis del comportamiento de la tinsión del potencial probiótico C14 para proteger el nauplio de *Artemia* contra el patógeno HL58.

6.3 MÉTODOS Y MATERIALES

6.3.1 INOCULACIÓN DE BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO EN LARVAS DE CAMARÓN EN EL SISTEMA DE CRÍA.

El nauplio de *Penaeus vannamei* (la fase N2-5) era reunido hasta que mudaron como Z1, ellos se criaron como descrito en capítulo 2.2. El sistema del tanque (sección 2.2.2.1) y el sistema de la botella (sección 2.2.2.2) era empleado en este juego de experimentos.

6.3.1.1. BACTERIOLOGÍA.

Las tinsiones eran crecidas como descrito en sección 2.1.1 y En algunos experimentos se usaron M14 elemento o M17 (vea el apendice). El caldo se inoculó en las unidades experimentales a las concentraciones descritas en cada uno de lo siguiente experimentos. El caldo era también consecutivamente diluido en la salina estéril y cobertor- en la gelosa marina y a veces en la gelosa de TCBS si apropiado para estimar la densidad de bacterias.

En algunos experimentos la bacteriología de larvas se analizó como descrito en la sección 2.1.4.

6.3.1.2 .PROYECTO EXPERIMENTAL.

Se realizaron seis experimentos para observar la actuación de larvas de *P. vannamei* cuando se agregaron las bacterias del potencial probióticoal en el sistema de cría. (Tabla 6.1). Experimento 1. La Tinsión C7b a tres densidades.

Tabla 6.1 Experimentos para probar el rendimiento de las larvas peneidos cuando se inocularon con bacterias probióticas potenciales.							
Exp	Tratamiento				Densidad (Zoeas l ⁻¹)	Rep.	Observaciones
	1	2	3	4			
1	Control	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	120	6	3 conc de cepas C7b (CFU ml ⁻¹), medio TSB+2.0 % NaCl.
2	Control	0.5	1.0	2.0	120	6	3 conc con caldo de C7b (ml ⁻¹), medio M16.
3	Control	Cepa + caldo	caldo	-	120	8	1.0 ml inoculadas, C7b, medio M19.
4	Control	Cepa + caldo	caldo	-	120	8	1.0 ml ⁻¹ de C7b, medio M19.
5	Control	cepa	caldo	Cepa + caldo	100	5	1.0 ml ⁻¹ de cepa C14, medio M19.
6	Control	cepa	caldo	-	183	4	1.0 ml ⁻¹ de C7b, medio M19.
Abastecidos con nauplios 4-5. Rep.= número de repeticiones.							

El objetivo: determinar el efecto de inocular un probiótico potencial en las tres densidades.

Tinción de C7b se procesó como en sección 2.1.3, y entonces se inoculó al principio a las botellas del experimento y a 48 hrs a las 104, 10 y 106 ml¹ de CFU. Se evaluó la supervivencia de la larva en el momento cuando las primeras postlarva aparecían.

Experimente 2. La tinción C7b a tres densidades con el caldo.

El objetivo: probar el efecto de inocular un potencial probiótico a tres densidades con el caldo en que era crecido.

La tinción C7b era crecida como descrito en sección 2.1.1, pero crecida en el elemento M14. Se inoculó a 0.5, 1.0 y 2.0 ml de caldo por litro de agua para la cría de larvas.

Los inocularon al principio y entonces en intervalos de 72 hr.

Experimente 3. La tinción C7b con el caldo.

El objetivo: observar el efecto de una tinción del potencial probiótico y del caldo solo en la utilización de larvas. La tinción C7b crecida como descrito en

sección 2.1.1, pero crecido en M17. La tinsión se inoculó con el caldo y el caldo se inoculó exclusivamente al principio a 1.0 ml 1, al tercer y sexto día.

Expérimento 4. La Tinsión C7b con el caldo.

El objetivo: como experimento 3.

Este experimento era una copia del experimento anterior pero las primeras inoculadas era atrás de 24 hrs.

Experimente 5. Tinsión C14 con el caldo.

El objetivo: Para observar la actuación de la larva inoculada con el potencial probiótico la tinsión C14.

Muestra C14 se procesó como descrito en secciones 2.1 .1 y 2.1.3 pero crecido en el medio.

M17. Para el primer tratamiento, se inocularon 014 exclusivamente; para el segundo tratamiento se inoculó con el caldo; y para el tercer tratamiento, el caldo se filtró a través de 0.45 micras y se inoculó. Todos los inocularon al principio con 1.0 ml al cuarto y séptimo día.

Experimento 6. La Tinsión C7b en un sistema en el tanque.

Objetivo: para observar el comportamiento de las larvas inoculadas con una tinsión del potencial probiótico en un sistema que más estrechamente se parece a un ambiente de cría.

La tinsión C7b se procesó como descrito en sección 2.1.1 pero creció en M17 elemento. Se inoculó a 1.0 ml al primero, quinto, séptimo y noveno día. La densidad estimada de nauplio utilizada (estadios 4-5) era 183 nauplio.

6.3.2 DESARROLLO DE UN MÉTODO EXPERIMENTAL PARA PROBAR LA TINSION DEL PROBIÓTICO UTILIZANDO SPP DE ARTEMIA EN LARVAS.

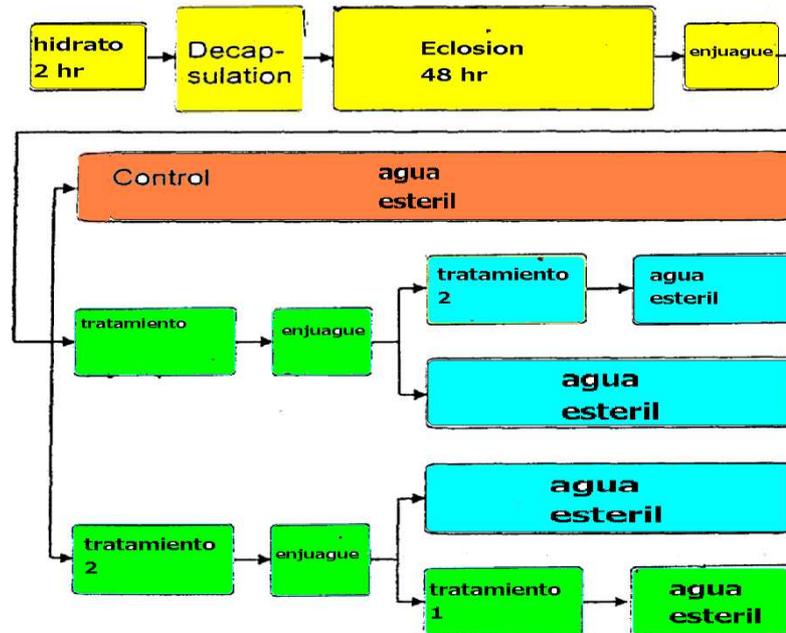
La metodología propuesta por (de Gomez-gil).Se empleó asépticamente bacterias bioencapsuladas en los nauplios de Artemia estéril. Figura 6.1 es un diagrama de circulación de los pasos principales tomado para este juego de experimentos, una descripción de cada experimento se proporciona debajo.

6.3.2.1 .DESINFECCIÓN DEL QUISTE DE ARTEMIA QUE SALE DEL CASCARÓN.

Se hidrataron los quistes para 2 hr y entonces se descapsula según la metodología propuesta por (el eta de Sorgeloos1977). Después que ellos se salieron del cascarón en 200 ml de agua de mar estéril a una densidad de 5.0 m1 a 30 °C, 35% salinidad, con la iluminación constante y agitación

mecánica. El cloranfenicol de los antibióticos (Chloromycetin, Parke-Davis, México) 30.0 mg y thrimetropim-sulfametoxazol (Bactrim, la Roca de Productos, México) a 40.0 y 8.0 mg respectivamente, se agregó al agua de la incubación para asegurar una desinfección completa del nauplio. Después de 48 hrs, el nauplio a salido del cascarón era asépticamente reunido en un cedazo de 120 um y se lavó completamente con agua destilada estéril.

Figura 6.1 Diagrama Básico de los experimentos dirigido con el nauplio de Artemia estéril para el comportamiento del probiótico.



6.3.2.2 COMPORTAMIENTO BACTERIANO Y PREPARACIÓN DE LA INOCULACIÓN

Los patógenos potenciales que se probaron HL58 y los potenciales probióticos C14 en estos experimentos. Las tinsiones se procesaron como descrito en sección 2.1.3.

6.3.2.3 BIOENCAPSULACIÓN DE TINSIONES EN EL NAUPLIO DE ARTEMIA

Se dirigieron los Pre-experimentos en un sistema que consistió en caja Petri y entonces un último sistema se introdujo con los tubos de ensayo. En los primeros sistema, se agregaron 50 ml de agua de mar estéril a cada plato de Petri y en el segundo sistema, 20 ml a cada prueba de los sistema de plato de Petri y cinco copias en la prueba. El agua era filtrada a través de 0.45 micras, el carbón activado, UV, se esterilizó y finalmente el autoclave. En el sistema del tubo de ensayo, se agitaron con el agua vigorosamente para oxigenar la muestra.

Un lote del nauplio estéril se agregó a un frasco con 200 ml con la inoculación bacteriana a una densidad de 100 nauplio a 10 ml de células bacterianas. Otro lote se agregó a un frasco similar pero sólo con el agua de mar estéril. Después de una hora los nauplios se enjuagaron completamente con el agua de mar estéril y se contaban para agregar 30 nauplios por plato de Petri o 10 por el tubo de ensayo. El plato de Petri con la inoculación de bacterias fue agregado para desafiar al nauplio. Para el segundo sistema el primer lote era más allá dividido en 2 y los nauplios se agregaron a un segundo frasco conteniendo otra inoculación de bacterias, durante una hora. Entonces ellos fueron enjuagados, se contaban y se agregaron a los tubos de ensayo. Los nauplios que salieron en los platos de Petri o tubos de ensayo después de 48 hr, entonces los nauplios vivos eran contados. Al final del experimento los nauplios se analizaron la carga bacteriana (vea 2.1.4)

6.3.2.4 PROYECTO EXPERIMENTAL

Se resumen los experimentos dirigidos con el nauplio de Artemia descrito en tabla 6.2.

Tabla 6.2 Experimentos para probar la supervivencia de los nauplios de Artemia cuando se inocularon con un potencial patógeno y el potencial de bacteria probióticas.							
Exp	Tratamiento				Sistema	Rep.	Observaciones
	1	2	3	4			
1	C14-H ₂ O	C14-HL58	H ₂ O-HL58	C14-C14	PD	3	1.0 ml de bacteria 2.0 en PD
2	C14-H ₂ O	C14-HL58	H ₂ O-HL58	C14-C14	PD	2	0.1 ml de bacteria 0.2 en PD.
3	C14-H ₂ O	C14-HL58	H ₂ O-HL58	-	TT	4	0.5 ml de bacteria, 50 ml frasco.
4	C14-H ₂ O	C14-HL58	H ₂ O-HL58	HL58-C14	TT	5	0.5 ml en los 50 ml frasco.
5	C14-H ₂ O	C14-HL58	H ₂ O-HL58	HL58-C14	TT	5	0.5 ml en los 50 ml frasco.
6	C14-H ₂ O	C14-HL58	H ₂ O-HL58	HL58-C14	TT	5	0.5 ml en los 50 ml frasco. 20 nauplios TT-
Las cepas a la izquierda se inoculó primero y después de lavar la otra cepa, PD=Placa de Petri, sistema de T, T=Tubos de ensayo, Rep.=Número de repeticiones.							

Experimento 1.

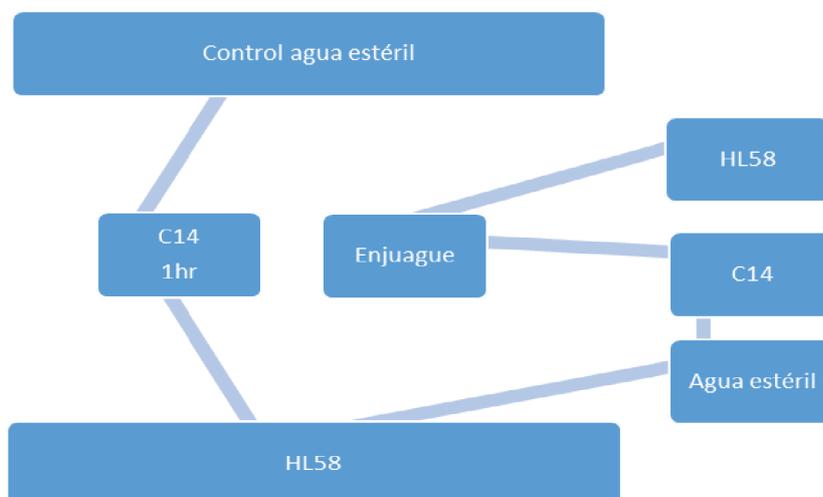
El objetivo: para evaluar la supervivencia del nauplio de Artemia cuando inoculó con las bacterias del potencial probiótico y bacterias patógenas.

Los nauplios de Artemía se procesaron como descrito anteriormente y un lote estéril era dividido en tres (Fig. 6.2). Un lote se puso en un plato de Petri con 50 ml de agua de mar estéril y 1 ml de tinsión C14 (O.D. 1.00 a 610 nm); ellos permanecían en este caldo para 1 hr después de que se lavó. Otro lote permaneció en el agua de mar estéril y el tercer lote se puso en otro plato de Petri con 50 ml de agua de mar y 1 ml de tinsión HL58 (C.D. 1.00 a 610 nm). Del primer lote, se contaban 30 nauplio y se pusieron en la caja de Petri llenado con 50 ml de agua de mar, uno tenía 1 ml de tinsión 014, otro 1 ml de HL58 y el tercero sólo el agua de mar (tabla 6.2). Los nauplios permanecían después de 48 hr en los platos después de que la supervivencia era contada, cada tratamiento era seguido con antifricción triple.

Experimente 2.

El objetivo: para evaluar la supervivencia del nauplio de Artemia cuando inoculó con una baja densidad de bacterias del potencial probióico y bacterias patógenas.

Figura 6.2. Diagrama de experimentos 1 y 2.



Este experimento era similar al anterior pero 0.1 ml de las tinsiones se inoculó en los platos de Petri con 50 mm de agua de mar (Fig. 6.2). Se realizaron Dos copias de cada tratamiento (Tabla 6.2). Después de 48 hr de desafío el nauplio vivo se contaba.

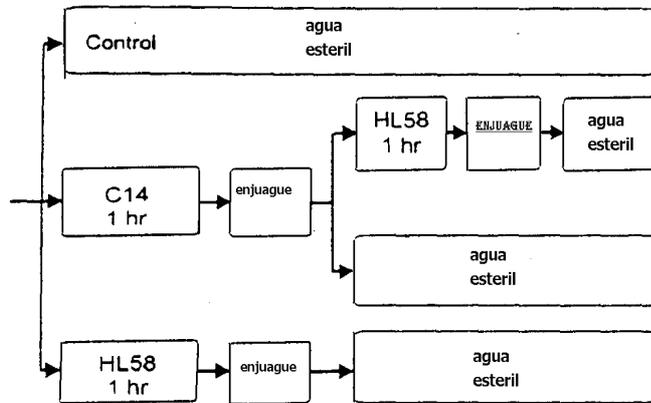
Experimento 3.

Las bacterias del potencial probiótico y bacterias del patógeno.

El objetivo: reducir el tiempo de exposición del nauplio a las tinsiones probadas y examinar el sistema del tubo de ensayo.

Capítulo 6

figura 6.3 diagrama de experiencia 3



Un lote del nauplio de Artemia se expuso a la tinsión C14 por una hr, se enjuagó y fue dividido en 2 (Fig. 6.3), un lote fue expuesto para probar HL58 durante una hora extensa entonces, mientras el otro permanecía en el agua de mar esteril. Otro lote no fue expuesto para probar C14 pero directamente expuesto para probar HL58

para una hr.

De unos de los lotes (los tratamientos,

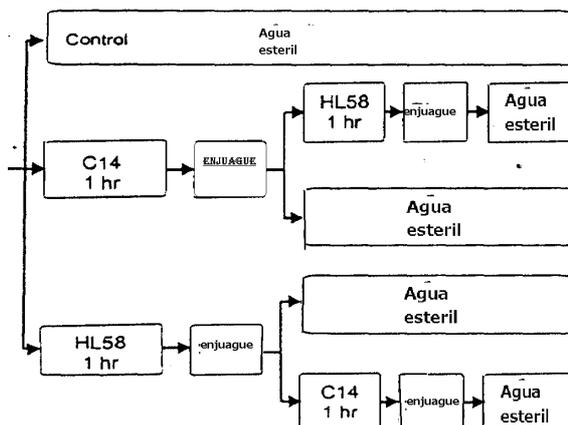
Tabla 6.2) se contaron diez nauplios y se intruducían en los tubos de ensayo con 20 ml de agua de mar esteril dónde ellos permanecían hasta 48 hrs. Los tratamientos (Tabla 6.2)

Se hacían cuatro copias. Después de ese tiempo se contaban los sobrevivientes y el volumen bacteriano analizado.

Experimento 4

El objetivo: para observar la actuación del nauplio de Artemia cuando inoculó con una tinsión del potencial probiótico y para desafiarlos con una tinsión del patógeno y viceversa.

Figura 6.4 dia grama de experiencias 4-6



Este experimento era similar al número 3, pero otro tratamiento fue introducido (tabla 6.2, Fig. 6.4). Un lote de nauplio se inoculó primero con la tinsión del patógeno HL58 durante una hora, se enjuagó y entonces se inoculó durante otra hora con el potencial probiótico tinsión C14. Los tratamientos se corrieron con cinco copias y la supervivencia se estimó

a 48 hrs. Se probaron Nauplios después de la inoculación y al final del experimento se analizó las cargas bacterianas.

Experimento 5

El objetivo: para observar la actuación del nauplio de Artemia cuando inoculó con una tinsión del potencial probiótico y después desafiarnos con una tinsión del patógeno y viceversa.

Este experimento era una reproducción de experimento 4 (Tabla 6.2, Fig. 6.4).

Experimento 6

El objetivo: para observar la actuación del nauplio de Artemia cuando inocula con una tinsión del potencial probiótico y entonces para desafiarnos con una tinsión del patógeno y viceversa pero a una densidad alta de nauplio por ml.

Este experimento es similar a los experimentos 4 y 5 pero en lugar de 10 nauplio por el tubo de ensayo, se agregaron 20 en cada tubo de ensayo (Tabla 6.2, Fig. 6.4).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 INOCULACIÓN DE LA LARVA DE CAMARÓN EN EL SISTEMA DE CRÍA CON LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO.

6.4.1.1 EXPERIMENTO 1. LA TINSIÓN DE C7B TRES DENSIDADES.

El ciclo de cría de la larva tomó 8 días de Z1 a PL1 (Tabla 6.3). Desde que este experimento fue hecho para probar el sistema en parte, se observaron variaciones en la temperatura. Las bacterias se inocularon dos veces en una suspensión ajustada a un O.D. de 1.056 st 610 nm para las primeras inoculaciones y 1.033 durante el segundo, la densidad bacteriana para estas suspensiones respectivamente 1.03×10^8 y 2.1×10^8 ml de CFU.

Se lograron supervivencias altas superiores al 80% con todos los tratamientos al final del experimento (Fig. 6.5a). La inoculación bacteriana diferente no tenía el efecto en la supervivencia como ninguna diferencia significativa entre los tratamientos (H-prueba 3.004, p 0.3910, n = 6). No se obtuvieron los datos para el porcentaje de las larvas que mudaron a postlarvas y al final del experimento las densidades bacterianas diluidas en el agua.

Tabla 6.3. Los detalles del experimento 1. Tratamiento con cepa C7b inoculado con 10-4,10-5 y 10-6 CFU ml-1									
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	
Etapa larval	Z1	Z1+	Z2	Z3	Z3-M1	M2	M2-M3	M3-PL1	
Inoculo (CFU ml ⁻¹)	6.9x 10 ⁴ 6.9x 10 ⁵ 1.4x 10 ⁵	-	-	-	1.4x 10 ⁵ 1.4x 10 ⁶ 2.8x 10 ⁶	-	-		
Especie Microalgas	20/80	20/80	-	0/100	-	-	-	-	
Artemia (naup.m l ⁻¹)	-	-	-	-	-	1.0	2.0	1.0	
Tem p °C	?	30	30	32	¿	¿	¿	¿	
Las densidades mostradas son las alcanzadas en el agua después de las microalgas Chaetoceros o Isochrysis.									

, vea sección 4.5.3.

6.4.1.2 EXPERIMENTO 2. LA TINSIÓN C7B A TRES DENSIDADES CON EL CALDO.

Como en el experimento anterior, el ciclo larval se completó en 8 días (Tabla 6.4) pero la temperatura era más estable. La inoculación bacteriana casi eran los ml1 de CFU para los casos. Debido a una escasez de quistes de Artemia, sólo una dosis se proporcionó cuando la larva estaba en miosis 3.

Se obtuvieron las supervivencias globales bajas (Fig. 6.5), ninguna diferencia significativa fue observada (el ANOVA F-prueba = 2.853, p = 0.0631, n = 6) aunque una tendencia para una supervivencia superior fue observada cuando 1.0 ml fue agregado. En el análisis de ANOVA, el p obtuvo cerca del 0.05 umbral que significa que se interpretaría la falta de diferencias significantes con cautela.

Tabla 6.4. Los detalles del experimento 2. Tratamiento con cepa C7b inoculado con caldo(M14) con 0.5 ,1.0 y 2.0 ml-1									
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	
Etapa larval	Z1	Z1-Z2	Z2+	Z3	M1	M2	M3	PL	
Inoculo (CFU ml ⁻¹)	2.0X 10 ⁴ 5.4X 10 ⁴ 6.1X 10 ⁴	-	9.3X 10 ³ 2.0X 10 ⁴ 1.9X 10 ⁴	-	-	3.8X 10 ⁴ 6.7X 10 ⁴ 7.1X 10 ⁴	-	-	
Especie Microalgas	30/70	-	30/70	0/100	-	-	-	-	
Artemia (naup. ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	2.0	-	
Temp °C	30	32	¿	30	29	29	29	¿	
Las densidades mostradas son las alcanzadas en el agua después de las microalgas Chaetoceros o Isochrysis.									

El porcentaje de larvas que mudó a postlarvas sea por término medio 78% para los tratamientos (Fig. 6.6a) y ninguna diferencia significativa se observó entre los tratamientos (el F-prueba de ANOVA = 0.09598, p = 0.9612, n = 6). Las densidades de las bacterias en las postlarvas al final del experimento era por término medio 9.12 x10² de CFU (Fig. 6.7a), y ninguna diferencia estadística se observó en la densidad entre los tratamientos (el F-prueba de ANOVA = 0.6644, p = 0.5970, n = 3). Había una tendencia para grabar más bacterias de los tratamientos dónde más bacterias fueron inoculadas.

6.4.1.3 EXPERIMENTO 3. LA TINCIÓN C7B CON EL CALDO.

Se obtuvieron Postlarvas a 8 días de cría (Tabla 6.5) con las supervivencias altas pero sin las diferencias significantes entre los tratamientos (ANOVA F-prueba 1.635, p 0.2226). Una tendencia se observó hacia una supervivencia superior (74.5%) en el tratamiento dónde C7b era inoculado (Fig. 6.5c), comparó al mando (68.4%) y donde fue agregado el caldo estéril (61.0%).

El porcentaje de larvas que mudó a postlarvas era bajo (Fig. 6.6), 24.2% para el mando, 25.2% para el tratamiento de C7b y 17.4% para el tratamiento del caldo. Ninguna diferencia significativa se encontró entre los tratamientos (el F-prueba de ANOVA = 0.6328, p = 0.5425). La densidad bacteriana en las

postlarvas al final del experimento (Fig. 6.7b) era significativamente diferente entre los tratamientos (ANOVA F-prueba 5.524, $p = 0.0436$, $n = 3$). El tratamiento del caldo tenía significativamente más bacterias que el mando (el SNK-prueba, $p' < 0.05$), ninguna diferencia se observó entre los otros tratamientos (mando-C7b, C7b-caldo)

Tabla 6.5. Los detalles del experimento 3. Tratamiento con cepa inoculada con caldo estéril, con 1.0 ml-1 empleando M17.									
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	
Etapas larval	Z1	Z1+	Z2	Z3	Z3-M1	M2	M3	PL	
Inoculo (CFUml ⁻¹)	2.0X 10 ⁴	-	3.3X 10 ⁴	-	-	1.7X 10 ⁴	-	-	
Especie Microalgas	30/70	30/70	30/70	-	0/50	0/100	-	-	
Artemia (naup.ml ⁻¹)	-	-	-	-	2.0	4.0	2.0	-	
Temp °C	30	32	¿	30	29	29	29	¿	
Las densidades mostradas son las alcanzadas en el agua después de las microalgas Chaetoceros o Isochrysis.									

6.4.1.4 EXPERIMENTO 4. LA TINCIÓN C7B CON EL CALDO.

Este experimento era similar al anterior y los resultados también eran similares (Tabla 6.6 y Fig. 6.5). Se observaron las supervivencias Altas, 63.8% en el promedio para el mando, 77.5% para los C7b y 74.6% para el tratamiento del caldo. Ninguna diferencia significativa se observó entre los tratamientos (el F-prueba de ANOVA = 1.185, $p = 0.3262$, $n = 8$). Aunque una tendencia hacia una supervivencia superior del tratamiento de C7b era nombrada.

El porcentaje de postlarvas al final del experimento también era bajo (Fig. 6.6c), 41.5% para el mando, 30.7% para C7b y 40.0% para el tratamiento del caldo, sin la diferencia significativa entre los tratamientos (el ANOVA F-prueba = 0.4501, $p = 0.6446$, $n = 8$). La densidad bacteriana en las postlarvas era significativamente superior en el tratamiento de C7b (Fig. 6.7c) comparó al tratamiento del caldo (el F-prueba de ANOVA = 6.253, $p = 0.0341$, $n = 3$), mientras no se observaron las diferencias entre el caldo y el mando o entre C7b y el mando.

Tabla 6.6. Los detalles del experimento 4. Tratamiento con cepa C7b inoculado con caldo estéril, con ,1.0 ml-1 con medio empleado M17.									
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	
Etapas larval	Z1	Z1+	Z2	Z3	M1	M2	M3	PL	
Inoculo (CFUml ⁻¹)	-	1.3X 10 ⁴	-	4.8X 10 ⁴	-	6.6X 10 ⁴	-	-	
Especie Microalgas	50/50	-	0/100	0/100	-	-	-	-	
Artemia (naup.m l ⁻¹)	-	-	-	1.0	2.0	3.0	4.0	-	
Temp °C	29	30	30	29	29	30	30	30	
Las densidades mostradas son las alcanzadas en el agua después de las microalgas Chaetoceros o Isochrysis.									

6.4.1.5 EXPERIMENTO 5. LA TINCIÓN C14 CON EL CALDO.

En este experimento las larvas tomaron 10 días para alcanzar las postlarvas (Tabla 6.7). El caldo se filtró a través de 0.45 μ m pero bacterias todavía era recuperado.

Se obtuvieron las supervivencias bajas (Fig. 6.5e, tabla 6.8) con las diferencias significantes entre los tratamientos (el F-prueba de ANOVA = 4.080, $p = 0.0249$, $n = 5$). El caldo como tratamiento produjo significativamente baja supervivencias.

Al final de este experimento largo, un número alto de larvas mudó a postlarvas (Fig. 6.6d) y ninguna diferencia significativa se observó entre los tratamientos (Kruskal-Wallis prueban = 4.754, $p = 0.1907$, $n = 5$). No se realizaron los análisis de la densidad bacteriana en las larvas.

Tabla 6.7. Los detalles del experimento 5. Tratamiento con cepa C7b inoculado con caldo estéril, con ,1.0 ml-1, medio empleado M17.										
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Etapa larval	Z1	Z1+	Z1+ Z2	Z2	Z3	M1	M2	M2-3	M3	M3- PL
Inoculo (C FUml ⁻¹)	2.4 X10 ⁶ 6.7 X10 ⁶ 2.6 X10 ¹	-	-	2.3X 10 ⁴ 4.3X 10 ⁴ ¿	-	-	9.0X 10 ³ 2.2X 10 ⁴ 4.0X 10 ¹	-	-	-
Especie Microalgas	30/ 70	30/70	-	0/100	-	-	-	-		
Artemia (n. aup. ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	1.0	2.2	2.2	3.3	3.3
Temp °C	28	29	30	29	29	29	27	28	30	30
Las densidades mostradas son las alcanzadas en el agua después de las microalgas Chaetoceros o Isochrysis.										

Tabla 6.8 diferencia en la supervivencia y el % de postlarvas entre los 5 tratamientos. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tratamiento (Vol inoculado)	Control	C14 solo	Caldo filtrado	C14+caldo
% sobrevivencia	31.60	29.80	16.60	29.60
Desviación estándar	11.26	5.26	7.02	5.59
Diferencia significativa	a	a	b	A

6.4.1.6 EXPERIMENTO 6. LA TINSIÓN C7B EN UN SISTEMA DE TANQUE.

En este experimento las larvas con este sistema de tanque tomó el tiempo más largo para alcanzar las postlarvas, en un total de 15 días, de nauplios 3-4 a postlarvas. Un total de seis inoculaciones de tinsión se realizaron C7b, cada 48 o 72 hrs. Las inoculaciones bacterianas estaban en el promedio 6.09×10^4 CFU/ml.

Las supervivencias más bajas se obtuvieron con este sistema (Fig. 6.8a) el más marcado aumento en las mortalidades son en cada cambio de fase larval. Al final del experimento ninguna diferencia significativa se observó entre el mando y el tratamiento del probiótico (el H-prueba = 17.0, $p = 0.8857$, $p = 4$). Se observaron las diferencias Significantes durante las fases de misis cuando los tratamientos del probiótico tenían las supervivencias superiores: en la fase de M2-3 (el t-prueba = 4.172, $p = 0.0059$), M3 (la t = 4.189, $p = 0.0058$) y al M3-PL1 (la t = 6.562, $p = 0.006$).

Capítulo 6

Ningún dato se obtuvo en el número de larvas que mudó a postlarvas al final del experimento la carga bacteriana.

6.4.1.7 EXPERIMENTO 7.

En este experimento se abasteció con el nauplios 2-3 y se obtuvo postlarvas en 14 días. Se administraron 5 inoculaciones del potencial probiótico cada 48 hrs a una densidad de 4 ml de CFU.

Se dirigieron tres estimaciones de la población (Fig. 6.8b) y ninguna diferencia significativa se obtuvo entre el tratamiento y el mando (el t-prueba > 0.05). Se obtuvo la supervivencia Aceptable al final del experimento, 36.7% en el promedio para el mando y 24.3% para el tratamiento.

Ningún dato se obtuvo en el número de larvas que mudaron a postlarvas al final del experimento o la carga bacteriana.

Figura 6.5.El porcentaje de supervivencia de la larva de Penaeus que inoculó con las bacterias del potencial probiótico. Nivel de confianza +/- 95 %.

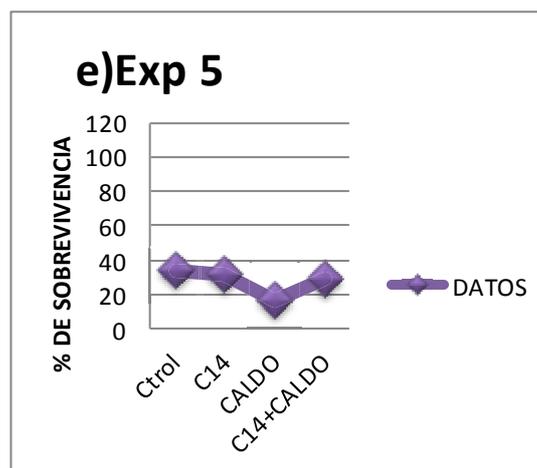
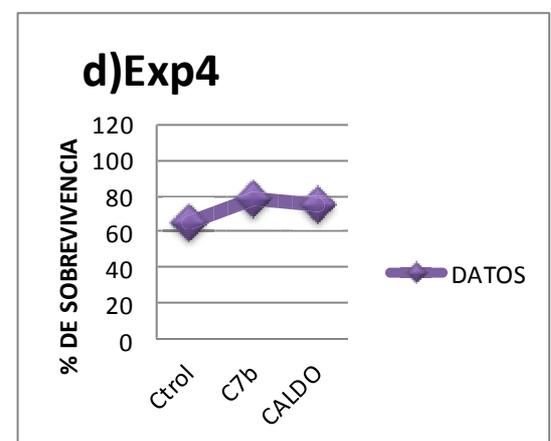
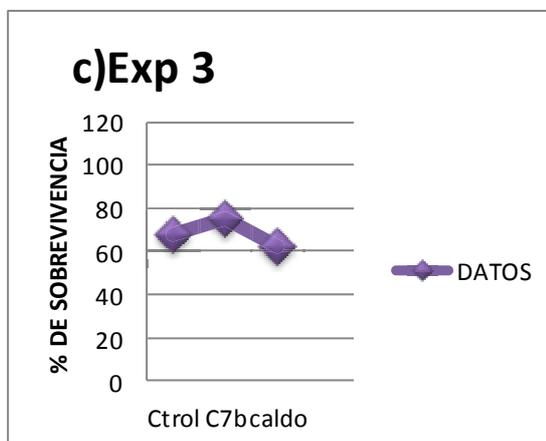
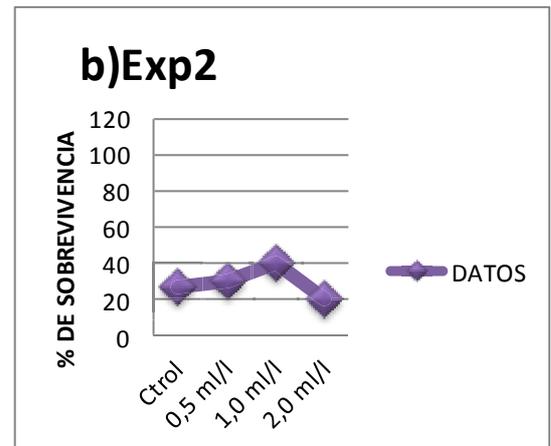
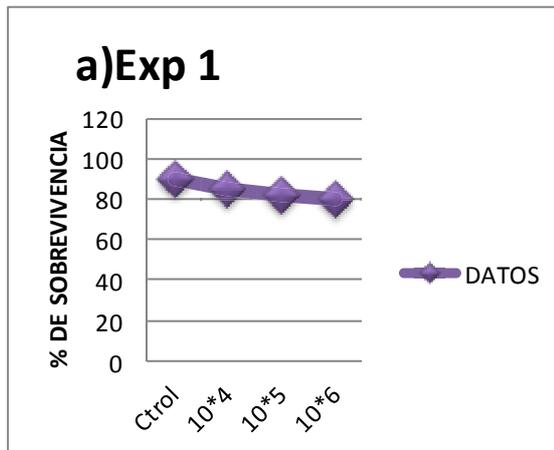


Figura 6.6. El Porcentaje de larvas al final del experimento que mudó a postlarvas con las bacterias del potencial probiótico. Significó un nivel de confianza de $\pm 95\%$.

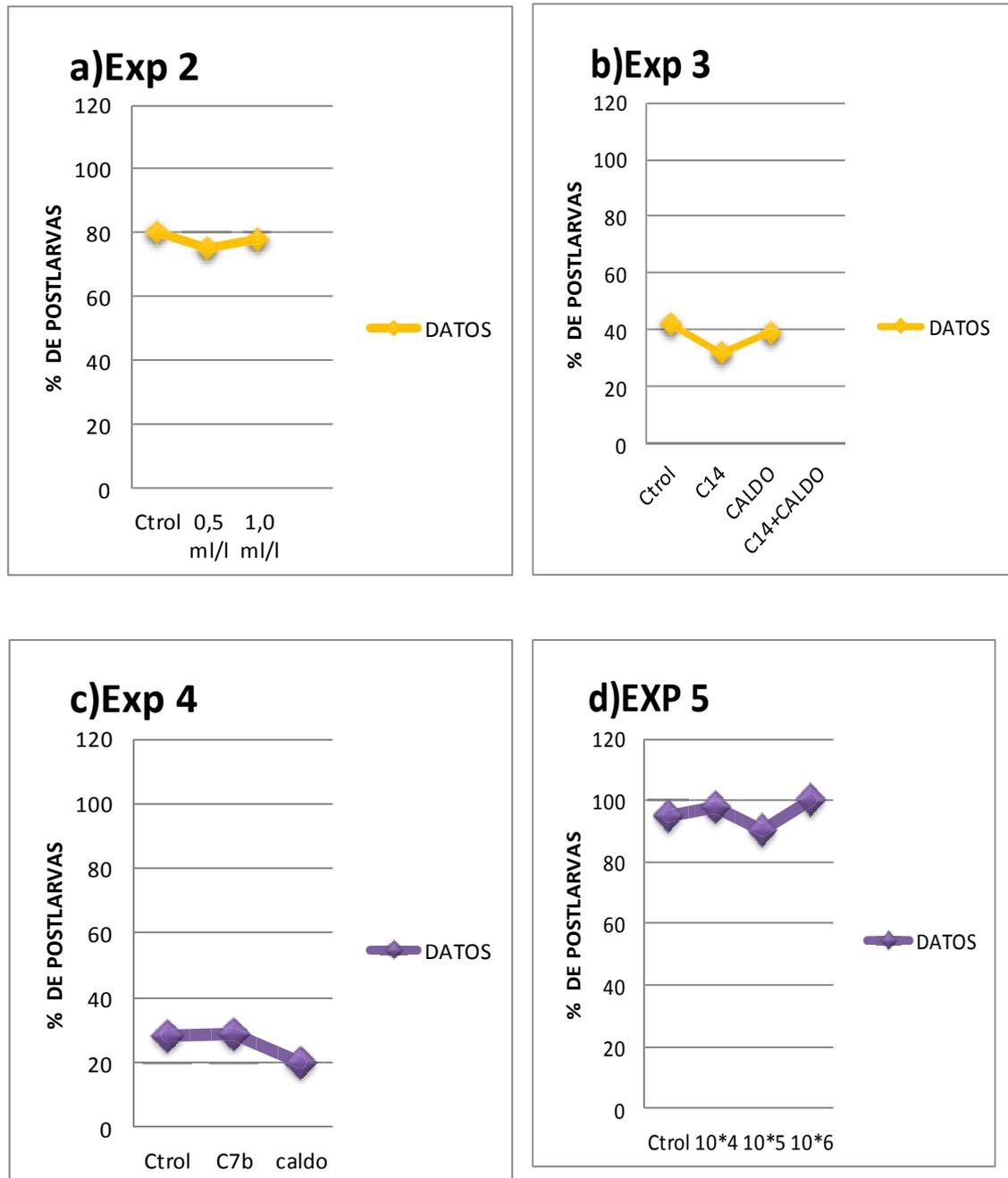


Figura 6.7. La cantidad de CFU por postlarvas inoculadas con bacterias del potencial probiótico. Significó $\pm 95\%$ nivel de confianza. Se los Cuenta en la gelosa de TCBS.

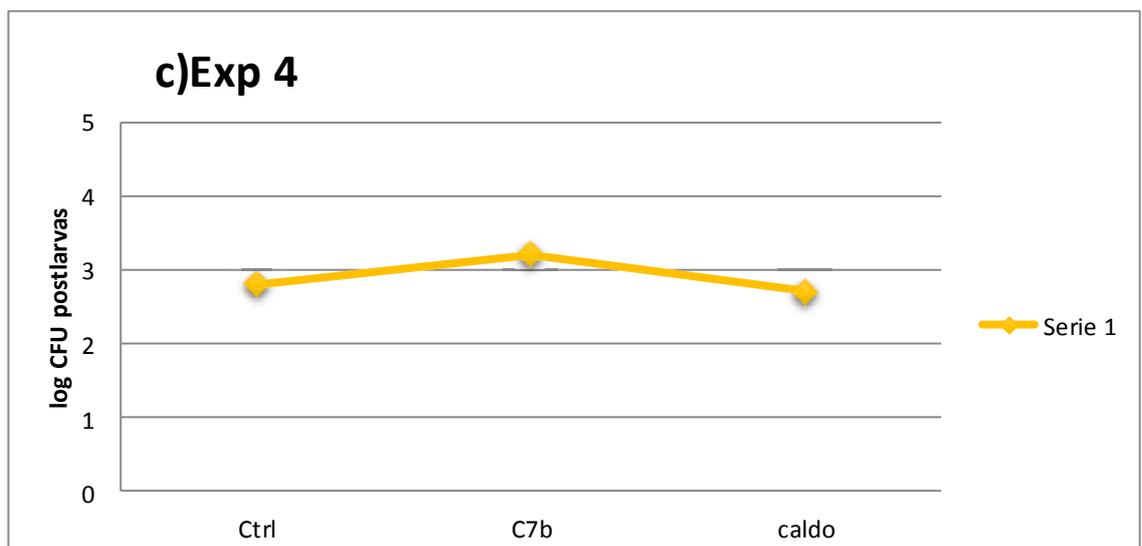
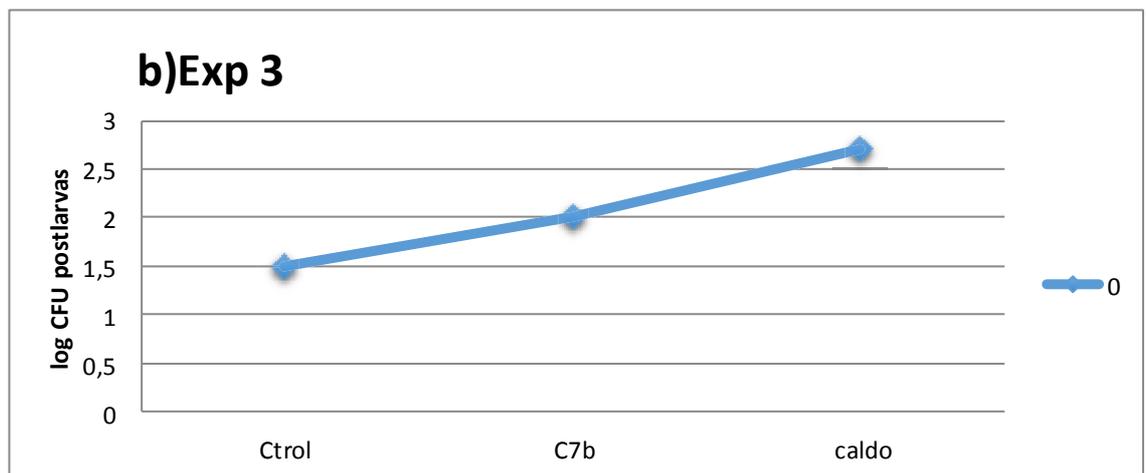
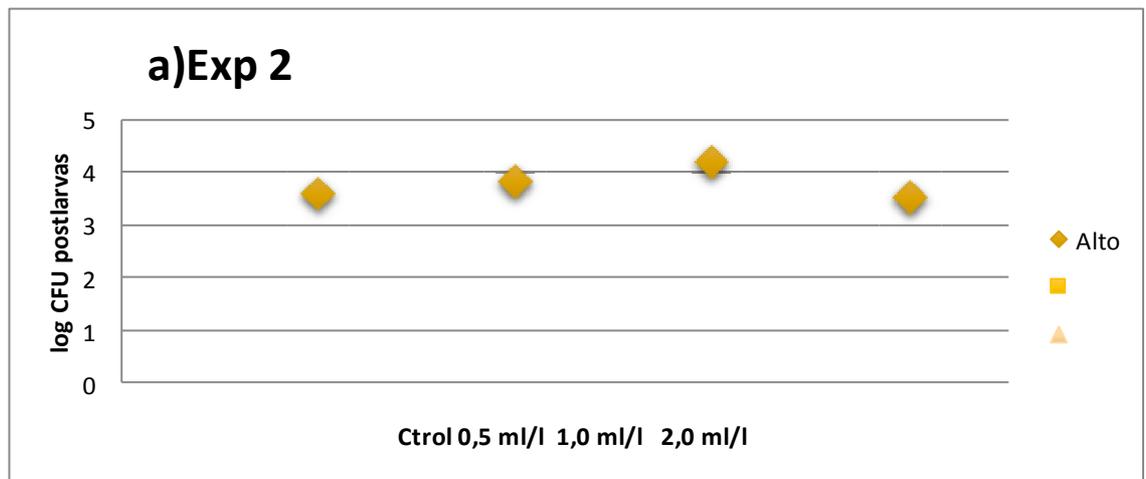
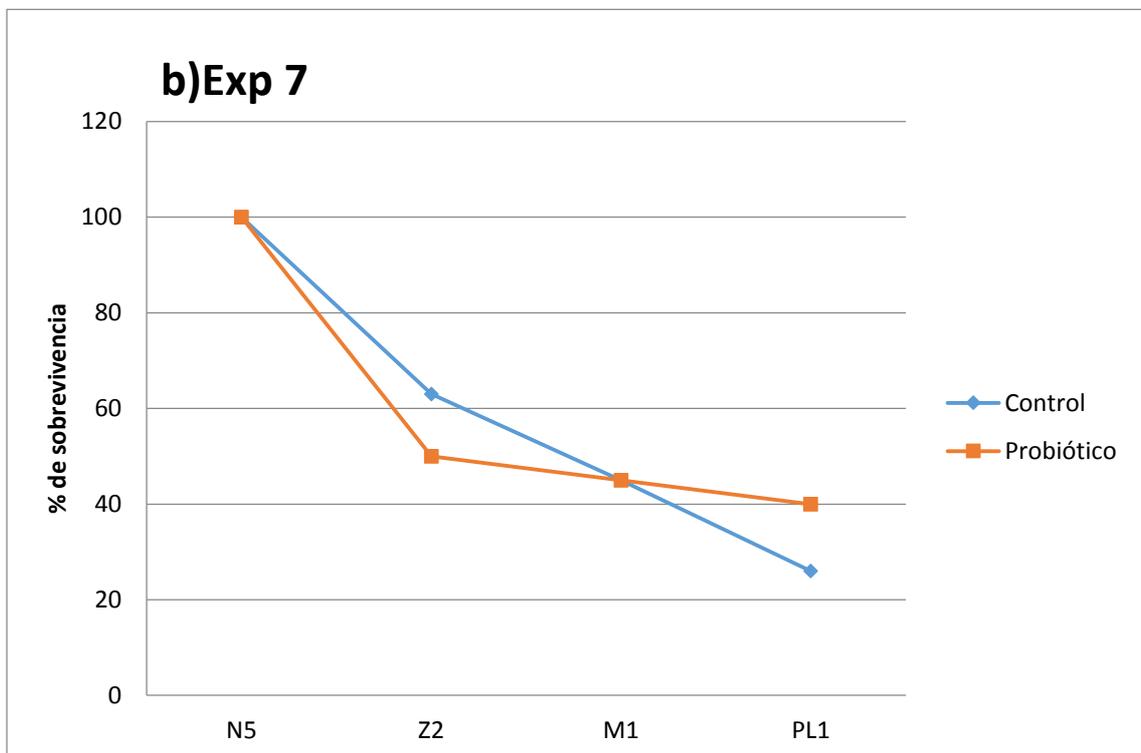
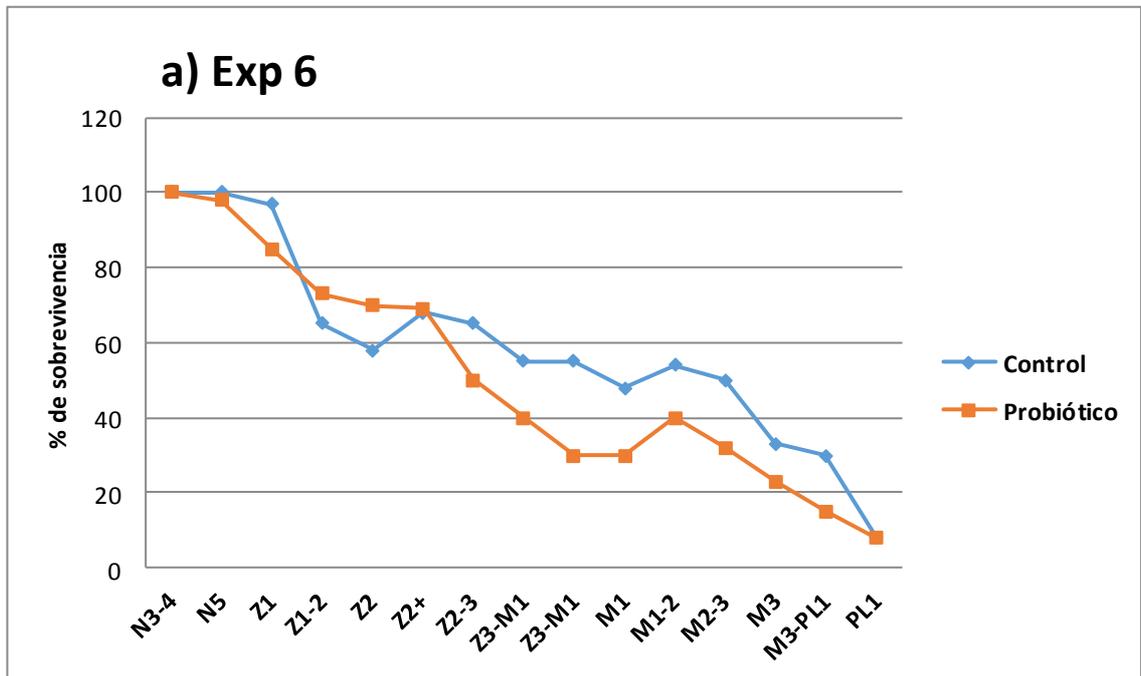


Figura 6.8. Supervivencia de larvas inoculadas con bacterias del potencial probiótico en un Sistema con tanques con 400ml. Significó +/-95% nivel de confianza



6.4.2 DESARROLLO DE UN MÉTODO EXPERIMENTAL PARA PROBAR EL PROBIÓTICO EFECTUADO DE UNA TINSIÓN BACTERIANA EN EL SPP DE ARTEMIA.

Para los tratamientos dónde los datos estaban disponible, ninguna correlación se observó entre la densidad de bacterias inoculada y la cantidad de bioencapsulados de la bacteria por el nauplio para tinsión C14 (la correlación del Pearson = -0.4778, $p = 0.5222$, $n = 4$) y HL58 (la correlación del Pearson = 0.4909, $p = 0.5091$, $n = 4$). Ninguno estaba allí cualquier diferencia significativa entre la captación del nauplio (el porcentaje de bioencapsulación de la bacteria) de tratamientos C14 y HL58 (el t-prueba = 25.00, $p = 0.0571$, $n = 4$). Sin embargo, el número de bacterias tendió a aumentar hacia el extremo del experimento.

6.4.2.1 EXPERIMENTO 1

Las tinsiones se inocularon a las siguiente densidades, muestra C14 a 5.66×10^6 ml de CFU y tinsión HL58 a 6.0×10^6 ml de CFU. Al final del experimento los nauplios desafiaron a la tinsión que se agruparon HL58 sumergido y estaban totalmente muertos. Podría haber ningún dato sobre la supervivencia.

6.4.2.2 EXPERIMENTO 2

Se inocularon ambas tinsiones a 0.5 ml de CFU. Desde que los tratamientos podrían analizarse duplicado el rodamiento antifricción, sólo media, máximo y mínimo. Aun así, los nauplios sumergieron en un caldo con la tinsión HL58 mostró la mortalidad superior en tinsión C14 (Fig. 6.9) 22.38 y 54.25% supervivencia respectivamente mala. Los nauplios trataron primero con C14 y después con HL58 tenían una supervivencia mala de 31.47%; el sólo trató con 014, tenía 56.67% y el mando 73.33% supervivencia mala.

6.4.2.3 EXPERIMENTO 3

La densidad de bacterias obtenida son 10^{-6} ml de CFU para C14 y 1.43×10^6 ml de CFU para HL58: Al final del experimento ninguna agrupación se observó.

Se grabaron las diferencias significantes entre los tratamientos (el H-prueba de Kruskal-Wallis:

10.28, $p = 0.0163$, $n = 4$). El tratamiento dónde HL58 fue inoculado era significativamente diferente que el resto (tabla 6.9 y Fig. 6.9). El inoculum de tinsión de C14 al desafío con la tinsión HL58 no produjo ninguna diferencia estadística con él tratamiento dónde la muestra C14 fue inoculado exclusivamente con el mando.

Al final del experimento los nauplios tenían una carga bacteriana considerable (Tabla 6.9), el tratamiento C14 tenía sólo colonias amarillas, el mismo color como tinsión C14 cuando crecía en la gelosa de TCBS. Las colonias del tratamiento HL58 eran verde como el mismo color de la tinsión

HL58. Cuando los nauplios se trataron con tinsión C14, se lavaron y entonces se pusieron en una suspensión de HL58, se observaron ambos tipos de colonias al final del experimento, aunque las colonias amarillas (C14) eran ligeramente menos abundantes que las colonias verdes (HL58).

Tabla 6.9 diferencia en la supervivencia y el contenido Bacteriano de los nauplios entre los tratamientos de experimentos 3.				
Tratamiento	Control	C14	HL58	C14-HL58
% supervivencia	55.00	37.50	12.50	45.00
Desviación estándar	17.32	9.57	5.00	12.91
N	4	4	4	4
Diferencia significativa	a	a	b	A
CFU nauplios al final del experimento	0(2*)	2.75×10^4	2.46×10^4	9.46×10^3 1.48×10^4
Color en TCBS	-	amarillo	verde	Amarillo verde
*Crecido en agar marino.				

6.4.2.4 EXPERIMENTO 4

La densidad de los nauplios fueron desafiados con 3.20×10^6 ml de CFU de C14 y 1.05×10^6 de HL58.

Se observaron las diferencias significantes en la supervivencia de los nauplios entre los tratamientos (el H-prueba = 13.96, $p = 0.0074$, $n = 5$; Fig. 6.9; tabla 6.10). No se observaron las diferencias entre los tratamientos HL58 y C14-*HL58 ($p = 0.314$), aunque una tendencia hacia una supervivencia superior se observó en el último (malo 78% contra 62% respectivamente). La tinsión de HL58 se inoculó antes de las C14, había una tendencia hacia una supervivencia superior en el tratamiento dónde C14 fue inoculado comparó el tratamiento dónde HL58 fue inoculado exclusivamente.

La densidad de bioencapsulación de la bacteria aumentó al final del experimento (Tabla 6.10). En el tratamiento de C14 la densidad observada era casi 10 veces más bajo que al principio. En los otros tratamientos la densidad aumentó 100 veces, con los números del igual de colonias amarillas y verdes.

Tabla 6.10 diferencia en la supervivencia y el contenido Bacteriano de los nauplios entre los tratamientos de experimentos 4. Los tratamientos con la misma carta no son significativamente diferentes (el método de SNK. <0.05).					
Tratamiento	Control	C14	HL58	C14-HL58	HL58-C14
% supervivencia	80.00	78.00	46.00	62.00	62.00
Desviación estándar	12.25	4.47	15.17	14.83	8.37
N	5	5	5	5	5
Diferencia Significativa	A	a	B	b	ab
CFU nauplios antes de la Inoculación	0	5.16×10^4	7.80×10^2	4.4×10^2 2.2×10^2	-
Color en TCBS	-	amarillo	verde	Amarillo verde	-
CFU nauplios Al final del Experimento	0	7.67×10^3	1.99×10^4	1.59×10^4	9.33×10^3
Color en TCBS	-	amarillo	verde	Amarillo verde	Amarillo verde

6.4.2.5 EXPERIMENTO 5

Se inocularon las densidades bacterianas bajas, 7.0×10^5 ml de CFU para C14 y 6.5×10^5 ml de CFU para HL58.

También se observaron las diferencias significantes en la supervivencia de los nauplios entre los tratamientos (el H-prueba = 16.35, $p = 0.0026$, $n = 5$; Fig. 6.9; tabla 6.11). El tratamiento dónde se inocularon 014 anterior a HL58 produjo la supervivencia superior significativa que HL58 exclusivamente. La inoculación de HL58 a C14 no causó ninguna diferencia significativa exclusivamente a HL58.

El proceso de la desinfección no era eficaz desde que el crecimiento bacteriano grabó en el nauplio del mando (tabla 6.11). La densidad bacteriana aumentó después de la inoculación casi 100 veces más alto.

6.4.2.6 EXPERIMENTO 6

Las densidades inoculadas eran 5.0×10^5 ml de CFU para 014 y 1.2×10^6 ml de CFU para HL58.

El tratamiento C14-HL58 produjo una tendencia a supervivencia superior comparada con HL58, aunque la diferencia no era significativa; ninguno estaba allí cuando se inocularon C14 exclusivamente (Fig. 6.9; Tabla 6.12).

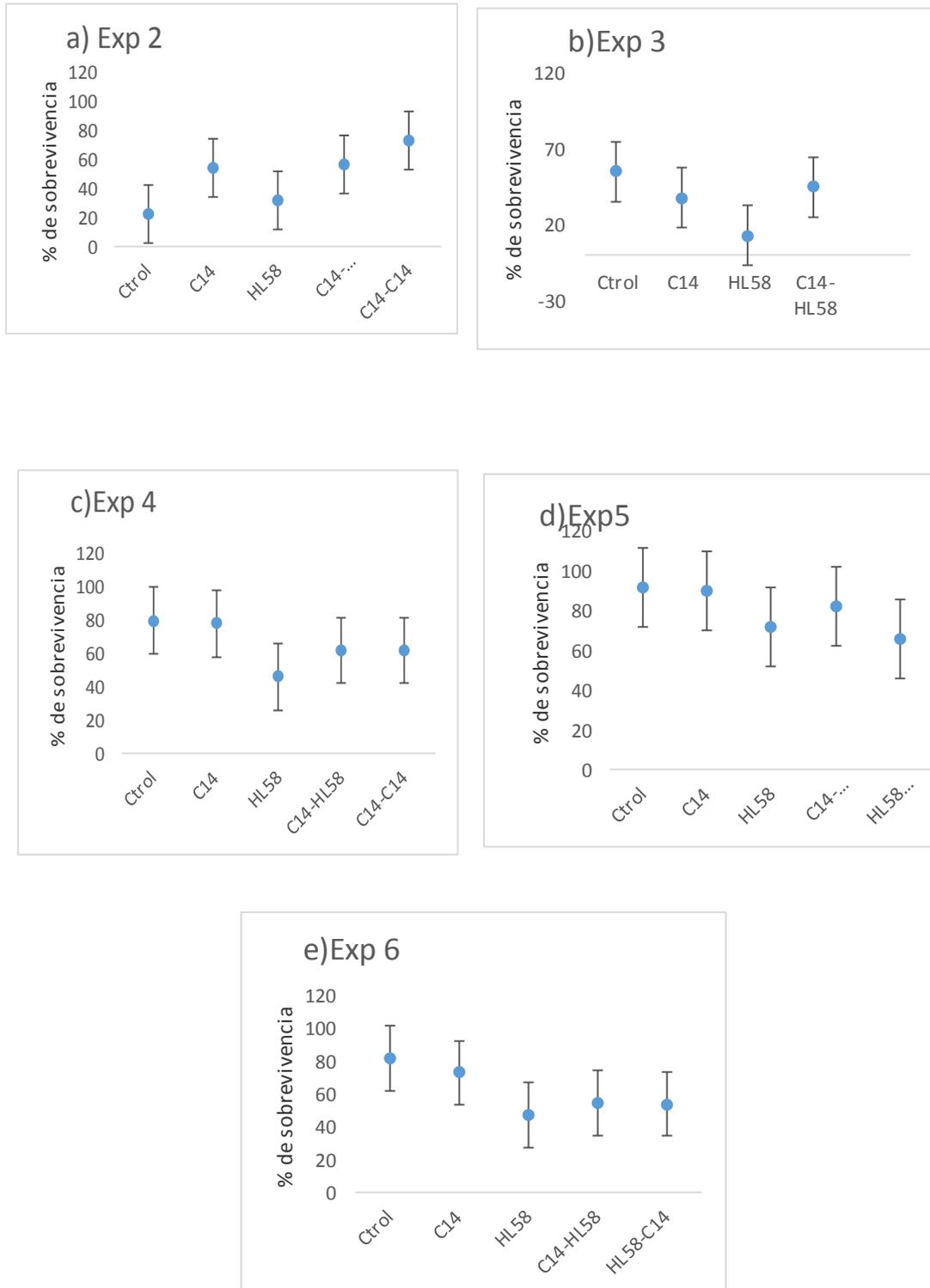
La supervivencia más baja estaba en el tratamiento era sólo HL58 fue inoculado en el mando.

El proceso de la desinfección era eficaz pero una contaminación se grabó para todos los tratamientos era HL58 fue usado, una colonia amarilla distintiva en la gelosa de TCBS fue observada. Aun así, un aumento en las bacterias se observó a finales del experimento.

Tabla 6.11 diferencia en la supervivencia y el contenido Bacteriano de los nauplios entre los tratamientos de experimentos 5. Los tratamientos con la misma carta no son significativamente diferentes (el método de SNK. <0.05).					
Tratamiento	Control	C14	HL58	C14-HL58	HL58-C14
% supervivencia	92.00	90.00	72.00	82.00	66.00
Desviación estándar	8.37	7.07	8.37	10.95	5.48
N	5	5	5	5	5
Diferencia Significativa	a	A	B	b	B
CFU nauplios antes de la inoculación	8.8×10^1	6.1×10^3	4.0×10^3	1.9×10^3 8.0×10^2	2.0×10^2 2.4×10^3
Color en TCBS	-	amarillo	verde	Amarillo o verde	Amarillo Verde
CFU nauplios Al final del experimento	incontable	8.8×10^5	2.2×10^5	5.7×10^4 8.0×10^2	2.0×10^2 2.4×10^3
Color en TCBS	-	amarillo	verde	Amarillo verde	Amarillo Verde

Tabla 6.12 diferencia en la supervivencia y el contenido Bacteriano de los nauplios entre los tratamientos de experimentos 6. Los tratamientos con la misma carta no son significativamente diferentes (el método de SNK. <0.05).					
Tratamiento	Control	C14	HL58	C14-HL58	HL58-C14
% sobrevivencia	82.00	73.00	47.00	55.00	54.00
Desviación estándar	11.51	5.70	24.39	9.35	17.46
N	5	5	5	5	5
Diferencia Significativa	A	Ab	bc	C	Bc
CFU nauplios antes de la inoculación	0*	1.4×10^5	1.0×10^4	6.0×10^4 1.0×10^4	0 7.1×10^4
Color en TCBS	-	amarillo	Verde amarillo	Amarillo verde	Amarillo Verde
CFU nauplios Al final del experimento	0*	2.4×10^5	1.2×10^5 1.2×10^4	4.0×10^5 5.0×10^4	4.2×10^4 1.2×10^5
Color en TCBS	-	amarillo	Verde amarillo	Amarillo verde	Amarillo Verde

Figura 6.9. La Supervivencia de los nauplios de Artemia desafió con un potencial probiótico y bacterias patógenas. Significativamente 95% dando intervalo de confianza, excepto Exp. 2.



6.5 DISCUSIÓN

6.5.1 INOCULACIÓN DE LAS LARVAS DE CAMARON EN SISTEMA DE CRÍA CON LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIOTICO.

Debido a los constantes cambios económicos y presiones de la institución del fondo y presión de la industria de apoyo, algunos ensayos tuvieron que ser dirigidos antes a los experimentos de la selección bacterianos. Por consiguiente, tinsión C7b se seleccionó como un probiótico potencial primarios y probó en muchos de los experimentos de esta sección.

Las camaronas que se van a utilizar para este trabajo fueron escogidas de una maduración de la Península del Guayas. Ellas fueron aclimatadas, se desinfectaron y se desovaron al criadero y el gerente no guardó ningún archivo de su historia. Los huevos de desove del día eran mixtos y salió del cascarón, era imposible tener un lote genéticamente uniforme. Las larvas sólo estaban disponibles después de 24-48 hrs como nauplio 2-5.

La mezcla completa de los huevos aseguró una muestra homogénea de una población de larvas de camarón que ocurre en un criadero comercial normal. Algún esfuerzo fue hecho obviar este problema, una selección del nauplio se realizó en la llegada al laboratorio: una fuente de iluminación fue situada casi que a un lado del recipiente del nauplio y sólo los primeros organismos que nadaron a la luz son reunido para el uso en los experimentos. Por aquí, estaba seguro que los nauplios en buena salud en el lote eran empleado.

Sin embargo, larvas obtenidas por aquí todavía podrían tener una variabilidad alta en su actuación, como se observó en la supervivencia en estos experimentos y aquéllos de capítulo 5. Algunos lotes produjeron las supervivencias subidas a mil en los mandos, alrededor de 90%, mientras otros sólo pudieran producir menos de 30%. Esta variación lo hizo muy difícil comparar los experimentos y obtener los resultados reproducibles. Más aun dramático era los resultados obtenidos con el sistema de cría diferente. En la botella y sistema del frasco, se observaron las postlarvas más atrás simplemente 8-9 días de cría, mientras en el sistema del tanque, ellos se encontraron 14-15 días más atrás. En las condiciones óptimas (27 °C) normalmente deben obtenerse más atrás las postlarvas en 10 días (Wyban y Sweeny, 1991,; Garriques y Wyban, 1993).

En los experimentos realizados en el sistema de la botella, un porcentaje alto de larvas que mudaron a postlarvas al final del experimento se relacionó a una 10 de supervivencia, y viceversa. En los ensayos dónde una supervivencia alta fue obtenida (Fig. 6.5c y d), un número bajo de postlarvas son reunido (Fig. 6.6b y c, respectivamente). La explicación para esto podría ser la disponibilidad de más espacio y comida para las larvas. Más comida porque las larvas recuperan las piezas aprovechables y las larvas pueden morir. También ninguna modificación a la cantidad de microalgas o Artemia proporcionada era hecha durante el curso del experimento, sin tener en cuenta la supervivencia.

La tinsión inoculada de las células de C7b (centrifugó y lavó) no tenía el efecto en la supervivencia (Fig. 6.5a) comparó al mando (Fig. 4.6b). El Análisis de centrifugado y lavado de una suspensión bacteriana es un procedimiento que exige mucho tiempo que sólo requiere técnico experimentado y el equipo caro accesible a los criaderos grandes en el Ecuador. Las tinsiones del probiótico son crecidas y centrifugadas para obtener una pasta libre del caldo y los productos celulares extras, una ventaja de esta pasta es que puede helarse por congelación para el uso posterior (Krauss, 1996) inoculando el caldo bacteriano completo (las células más el caldo) podría reducir el trabajo e incluso refuerce la supervivencia de las tinsiones deseadas en el ambiente de cría. También puede disminuir la calidad de agua y puede dañar el comportamiento de las larvas. Garriques y Arevalo (1995) se inoculó de 0.2 a 0.8 ml de caldo del probiótico por litro de agua con los resultados buenos aclamados. En este estudio, la tinsión se inoculó a las 0.5, 1.0 y 2.0 ml (Fig. 6.5b y 4.7). La supervivencia más baja fue observada cuando se agregaron 2.0 ml del inoculum, quizás debido a la alta densidad de bacterias, observada como el agua muy turbia e infringiendo las reglas consecuente de las larvas. La turbiedad permanecía para 48 hrs hasta que la densidad bacteriana disminuyera a los niveles normales (Fig. 4.7). La variabilidad alta de los resultados entre las copias no permitió observación de diferencias significantes en la supervivencia, el porcentaje de postlarvas o la densidad bacteriana en las postlarvas, aunque una tendencia se observó hacia una actuación buena de las larvas inoculada con 1.0 ml de el caldo de las bacterias. Con la más baja densidad inoculada por Garriques y Arevalo (1995). Aunque ningún datos fue presentado, ellos deben de haber inoculado alrededor de 0.4 ml de células.

Una densidad de 1 ml de las células del potencial probiótico CA2 en el agua se encuentre óptima para el perfeccionamiento crecimiento de crías larvales (Douillet y Langdon, 1993, 1994). Esta misma tinsión proporcionó al 104, el 105 y 106 ml de las células no afectaron la supervivencia larval. Para el cangrejo el *Portunus trituberculatus* larvas, 100 ml de las células mejoraron y reprimieron el crecimiento de *Vibrios anguillarum*. (Nogami y Maeda, 1992). En este estudio la densidad obtenida en el agua de cría era el 104 ml de células, diez veces más bajo que el otro por el Zherdmant et al. (1997) para la zoea. Para alcanzar una densidad de células de un vibrio fermentado de sacarosa (el vibrio amarillo en la gelosa de TCBS), incluso el caldo, por el ml de crías en el agua (como el Zherdmant et al. propuesto., 1997), casi 10 ml por litro de agua tuvieron que ser inoculados a los tanques de crías larvales. Esta cantidad de caldo causaría la infracción de las reglas de las larvas y la muerte consecuente, como demostrado aquí. Este análisis sugiere que, o los autores lograron una densidad bacteriana superior en sus culturas, o su estimación de las bacterias o la densidad estaba equivocada. En los siguiente experimentos, se probaron dos tratamientos, los potenciales probióticos exclusivamente y el caldo estéril. Como en los experimentos anteriores, ninguna diferencia significativa se observó en la supervivencia de las larvas. De nuevo, sólo una tendencia hacia la supervivencia superior con el tratamiento del probiótico era nombrada. En los experimentos 2, 3 y 4, un incremento en la media Supervivencia de 12.5, se obtuvieron 5.8 y 13.7%. Estos números no son significativamente diferentes de la 15.2% media mejora obtenida por Garriques y Arevalo (1995); ellos también obtuvieron en un

experimento una mejora de sólo 2.4%. Krauss (1996) obtuvo los resultados más llamativos, una diferencia máxima de 35.7% entre una mezcla microbiana (ningún dato en las Tinsiones fue presentado) y el mando se observó en un criadero

Ecuatoriano. Su Mando tenía una media supervivencia de 39.2% (± 8.1 , $n = 4$), una mezcla del probiótico informó 74.9% (± 6.3) y otra mezcla produjo 50.7% (± 12.1) de supervivencia.

En estos experimentos, una bacteria superior a la densidad en las postlarvas se observó en los tratamientos donde sólo el caldo fue inoculado o donde el caldo se inoculó a la dosis más alta. El medio inoculado servido como una fuente de nutriente para cualquier bacteria que ya en el sistema tenía la sacarosa, los vibrios que crecen como las Colonias amarillas en la gelosa de TCBS eran los favorables. En el experimento 3, más bacterias la diversidad colonial se observó en los tratamientos que en el mando donde menos diversidad y más verde los vibrios eran nombrados. En el experimento 4, las colonias más amarillas en la gelosa de TCBS estaban también observadas en los tratamientos que en el mando. La mayoría de estas colonias amarillas era similar al inoculado que podría indicar una colonización de las larvas por la tinsión del potencial probiótico. Krauss (1996) no encuentra las diferencias en las colonias bacterianas en las larvas entre el mando y tratamientos del probiótico.

Una " prueba de colonia-borrón " preparada de los anticuerpos monoclonales se ha usado para seguir la colonización de larvas de *P. vannamei* para el potencial probiótico y bacterias patógena con los resultados muy favorables (el eta de Zherdmant. 1997). Ellos encontraron la larva en zoea ya organizada 1 y 2 tenía el tracto digestivo colonizado por las bacterias medioambientales. Ellos abastecieron un sistema de cría con nauplio 5 y los inocularon el sistema con 103 ml de células del potencial probióticos y resultaron buenos para superar este experimento y poder colonizar el intestino larval con las bacterias del probiótico deseados. En algunos experimentos aquí (5, 6 y 7) las larvas se desafiaron con las bacterias del potencial probiótico como nauplio 4-5, pero no se observó ninguna diferencia significativa a los mandos.

Los sistemas del tanque se parecieron a la situación más estrechamente comercial en un criadero debido al volumen usado y el manejo de la larva. Ninguna diferencia se observó en la supervivencia de las larvas al final del experimento, aunque las diferencias eran principalmente las fases de misis.

No se observaron diferencia en la supervivencia de las larvas tratada con las bacterias del potencial probiótico y los mandos sin tratar se observó. Una posible explicación a este resultado podría ser las diferencias evidentes entre el sistema empleado en el laboratorio y los funcionamientos del criadero reales. Aunque la mayoría de los parámetros y funcionamientos se pareció aquéllos de un criadero, la diferencia grande en el volumen y manejo deben tener un impacto mayor. Los gerentes aseguraron que cuando ellos ejecutaron los ensayos lado a lado en 20 recipientes con sus 20 toneladas por tanques, ellos no podrían conseguir las mortalidades de larvas como ocurrido en los tanques. Bolitas enfermas y aparece el síndrome de Zoea. El normalmente sea causa de pérdidas grandes en el criadero que proporcionó las larvas para esta tesis, pero esas mismas larvas realizaron bien en el laboratorio.

Un mecanismo para que las bacterias del probiótico protejan al organismo, está impidiendo el patógeno la colonización (el Fuller, 1989a, 1989b). En el orden demostrado este modo de acción es necesario poder causar una infección con una bacteria patógena, y entonces proteger al organizador inoculando el potencial probiótico y observar una diferencia en la actuación del organismo. Desgraciadamente ningún éxito se logró con la infección de la larva con las bacterias patógenas del potencial probiótico, para que pueda observar si los probióticos seleccionados pudieran proteger a la larva penaeidae contra el ataque de esos patógenos.

La mejora en la actuación de las larvas a menos que el desafío del patógeno Podría estar indicando simplemente una función de suplemento de alimento.

6.5.2 Desarrollo de un método experimental para probar el probiótico en una tinción bacteriana con el spp de Artemia.

La inoculación de tinción HL58, identificó como el *Vibrio parahaemolyticus*. (Tabla 3.10), redujo significativamente la supervivencia de nauplio de Artemia que todos los experimentos compararon al mando. 1 su tinción era claramente el patógeno del nauplio cuando ellos eran expuestos para 1 hr a una densidad de 6.5×10^5 ml de CFU.

Ellos grabaron casi un 100% de mortalidad de nauplios de Artemia cuando desafió con una tinción de *Vibrio parahaemolyticus*. También con una tinción de *Vibrio alginolyticus*. Dónde las mortalidades máximas se observaron a 48 hrs de desafío. En su experimento, sin embargo, la supervivencia baja de sus mandos cubrió con los tratamientos de *Vibrio*, pero su experimento duró para 96 hrs y las larvas del mando podrían haber estado con hambre. La mayoría de la mortalidad observada en este estudio en el primero y segundo experimento era agrupar los nauplios por un producto exógeno de tinción HL58 claramente visible en el microscopio. Los nauplios eran incapaces al movimiento se hundieron, y eran incapaz de respirar e infringir las reglas fuerte; Voltolina (la comunicación personal) observó un fenómeno similar. La solución a este problema era mantener el nauplio en la suspensión bacteriana para un periodo más corto, una hora se seleccionó según el hallazgo por (et de Gomez-gil. La prensa). Un enjuague completo del nauplio después de que el desafío previno la agrupación pero todavía permitió a las bacterias suficientes permanecer adjunto o ingerido y capaz para causar las mortalidades significantes. También se han identificado las substancias exógenas para ser la causa para las mortalidades en las larvas del camarón (Krauss, 1996). Las Mortalidades fueron observadas por (et de Gomez-gil. La prensa) después de 24 hr de ser en la suspensión del inoculum y los nauplios eran expuestos simplemente 30 mn a una tinción muy similar (HL57) como el empleado en este estudio. Ellos notaron una reducción significativa de la carga bacteriana cuando los nauplios fueron enjuagados y una reducción significativa extensa que alcanza la densidad más baja a 8 hr después del inoculum (5.5×10^1 nauplios ml de CFU). Después de 24 hr la densidad bacteriana aumentó dramáticamente, probablemente debido a la disponibilidad de nutriente generada por el nauplio. El aumento en la densidad bacteriana al final del experimento observado en este estudio (10 a 100 veces) también podría haber sido debido a las mortalidades del nauplio causadas por la tinción HL58. Ningún aumento fue observado cuando C14

fue inoculado y una supervivencia alta del nauplio fue obtenida. El (et de Gomez-gil.La prensa) también observó el aumento significativo entre la densidad más baja (8 hrs) y después de 24 hrs con la tinsión C7b.

La inoculación era de 1.86 x10⁶ ml de CFU para la tinsión C14 y 1.74 x10⁶ ml de CFU para la tinsión HL58. La eta de la silla. (1994a, 1994b) usó 100 veces la densidad superior a la bioencapsulación y. el *V. anguillarum*: se usaron las densidades similares con la bacteria del *anguillarum* (el eta de Joosten. 1995), y con y el *parahaemolyticus* (el eta del Gomez-gil. en la prensa). El eta de Campbell! (1993) no podría descubrir ninguna captación bacteriana por el nauplio cuándo una densidad de 1.5 x 10⁶ ml de CFU era empleado después de 30 mn pero a 60 mn una densidad alta se observó. El estudio de una densidad de 10⁶ ml de CFU se encontró adecuado para observar mortalidades y efectos del probiótico. En este estudio, en 60 mn se encontró adecuado para incorporar las bacterias suficientes en el nauplio para lograr los objetivos deseados. El et del Gomez-gil (sometido) demostrado eso entre 45 y 60 mn es el tiempo mínimo requerido al bioencapsulado un número máximo de células de *Vibrio*, un periodo también observado por el eta de Campbel (1993) y usó para el eta de la Silla (1994a). La captación de bacterias para el nauplio, estan expresado como el porcentaje de bacterias del inoculum realmente el bioencapsulado, era inconstante y ninguna correlación se estableció entre la cantidad de bacterias inoculada y el bioencapsuladas.

Por término medio los nauplios pudieron captar sólo 10.27% de las C14 células disponible por el ml agua, y 0.88% de tinsión HL58. Una densidad de 7.0 ml de CFU x nauplio para la tinsión C14 y 1.1 ml CFU x nauplio, HL58 se obtuvo por término medio después de 1 hr de exposición. El et de silla. (1994a) con una densidad de inoculación superior (5 ml de bacterias x10⁸) se obtuvo sólo 8.0 x10⁶ de CFU x nauplios. Los resultados presentados aquí podrían sugerir que los nauplios de *Artemia* bioencapsulada pudiera ser eficazmente el potencial probiótico C14 sin ocasionar daño al nauplio. El patógeno HL58 al contrario, si contaminó a las larvas.

Como se explicó antes un mecanismo de las bacterias del probiótico protegen a la colonización del patógeno (el Fuller, 1989a, 1989b). Los resultados con el nauplio de *artemia* con la inoculación del probiotico tinsión 014 antes de contaminar el nauplio con el patógeno HL58 que previno la mortalidad de los nauplios. Pero si la tinsión HL58 se inoculó antes C14, sólo uno de los tres experimentoC produjo las mortalidades iguales cuando 014 fué agregado. La tinsión C14 realmente protegió al nauplio de la acción del patógeno de HL58.

La colonización del nauplio con 014 se observó en los resultados de los análisis bacteriológicos del nauplio al final de los experimentos (Tablas 6.8-11). Los nauplios tenían por término medio, 1.21 x10⁵ colonias amarillas que forman las unidades por los nauplios contra 5.27 x10⁴ CFU verde para los nauplios. Los nauplios de *Artemia* son capaces de ingerir las bacterias, algunos que permanecen vivo y capaz de infectar otros organismos que hay en el nauplio (eta de Grisez 1996): mientras se usan otras bacterias ingeridas como una fuente de comida para los nauplios (el eta de Gorosope 1996). Por consiguiente los nauplios de *Artemia* pueden usarse para entregar las bacterias del probiótico con éxito en el tracto digestivo de organismos designados (el eta de Grisez, 1996, eta de la Silla 1994a).

6.6 CONCLUSIONES

La diferencia se observó en el comportamiento de la larva de camarón que se trató con el potencial probiótico C7b o C14, pero una tendencia era nombrada hacia la supervivencia superior con la presencia de estas tinsiones.

Demostrar la acción de una bacteria probiótica desafiando la larva con una bacteria patógena observando entonces si la supervivencia es buena en las larvas. Desde que ningún éxito se obtuvo en los desafíos del patógeno con larvas penaeidae (capítulo 5), era difícil demostrar la prevención de una infección por las tinsiones del probiótico analizado.

Inoculando un volumen alto del caldo bacteriano produjo la turbiedad del agua donde estaban las larvas donde se infringió las reglas donde disminuyó la supervivencia.

Se obtuvo la variabilidad alta en los parámetros analizados en las larvas del camarón. Aunque a veces el número de copias era como ocho, todavía la variación disimuló los resultados y no hubo ninguna diferencia significativa. Es esencial reducir esta variación, y una manera de lograr esto es empleando larvas genéticamente uniforme.

Demostraron diferencias Significantes en la supervivencia en los desafíos de infección con los nauplios de Artemia estéril y el patógeno HL58. C14 impidió al naupllio de Artemia teñir cuando se inoculó antes del desafío con HL58. El papel como una bacteria probiótica se estableció bajo algunas condiciones.

Los nauplios de Artemia fueron colonizados con éxito por la tinsión del probiótico C14, aunque HL58 se descubrió en los números similares en el nauplio.

6.6.1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO EXTENSO.

En el orden de demostrar la eficacia de un potencial probiótico con larvas penaeidae, es aconsejable poder infectarlos y observar si los probióticos protegen las larvas, como el caso con los nauplios de Artemia. Muchas variables se controlan antes de esta meta, entre ellos, es esencial tener un lote homogéneo de larvas y poder desinfectarlos.

El modelo de Artemia puede trabajar muy bien pero más atención tiene que ser usada al mando de una contaminación. Un número superior de larvas para el tratamiento podría reducir la variabilidad de los resultados. Más tinsiones pueden probarse para observar las diferencias en la protección contra la infección. También un análisis de histología podrían revelar los sitios de la atadura de las bacterias y el efecto de la barrera teórico. Este análisis podría ayudar establecer una ruta de infección de bacterias patógenas en las larvas con el alimento no filtrado.

CAPITULO VII

7 DISCUSIÓN GENERAL

7.1 SELECCIÓN DE UN ORGANISMO DE POTENCIAL PROBIÓTICO-

La selección de bacterias probióticas normalmente ha sido un proceso empírico basado en la evidencia científica limitada. Muchos de los fracasos en la investigación del probiótico podrían atribuirse a la selección de microorganismos impropios.

Un ejemplo es con toda seguridad el uso extendido de especies de *Lactobacillus* como " probiótico " los mamíferos, se han demostrado subsecuentemente tantos de estas especies es incapaz de colonizar el tracto intestinal de estos (Daly, 1991,; Millar, 1993), una habilidad esencial para un organismo probiótico (el Mariscal, 1991). El spp de *Lactobacillus*. También se ha usado para inocular a organismos como el pez marino que son completamente diferente a aquéllos que fueron aislados originalmente (Gatesoupe, 1990 y 1991a).

Es esencial entender los mecanismos de acción del probiótico y definir el criterio de la selección para el potencial probiótico (Huis Veid et al., 1994). Se han definido los pasos de la Selección, pero ellos necesitan que se adapten las especies a un ambiente óptimo.

El criterio de la selección General es principalmente determinado por los aspectos del bioensayo, métodos de producción y procesos, de método de administración del probiótico y la situación en el cuerpo dónde se espera que los microorganismos sean activos (Huis et de Veid 1994).

7.1.1 PASOS PARA SELECCIONAR LOS MICROORGANISMOS DEL PROBIÓTICO.

7.1.1.1 SEGURIDAD DEL MICROORGANISMO.

El primer paso en la selección del probiótico para humano o el uso veterinario, es Generalmente escoger un microorganismo Reconocido como la Caja fuerte (GRAS) y aislar las mismas especies y apuntar en una tarjeta organizada (el Havenaar et al., 1992). Para las especies acuáticas el concepto que GRAS no se define bien como la investigación insuficiente se ha dirigido en la flora bacteriana normal.

Se han usado dos fuentes de bacterias en la industria de larvicultura del camarón, a) emplean aislamiento de los tanques de crías exitosamente y b) usando tinsiones aisladas de una fuente de agua de mar limpias (los Daniel, 1993,; Garriques y Wyban, 1993,; Garriques y Arevalo, 1995,; El eta de Zherdmant!., 1997). La primera fuente tiene la tierra común con la selección de organismos de GRAS; lo racional es que un ambiente exitoso podría

albergar los microorganismos y capaz de promover refuerzo a la actuación de la larva. Esta fuente también cumple las otras dos recomendaciones arriba expresado; aislado de las mismas especies y de la misma situación. No tiene ningún efecto la pregunta de situación dentro del organizador dónde se espera que las bacterias sean activas. El agua de mar aísla también y podría esperarse que tenga menos resistencia al componente antimicrobiano, y comparó con el criadero aislado, eso podrían haber adquirido la resistencia a través de la exposición frecuente.

7.1.1.2 ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN

Para la supervivencia prolongada de tinsiones del probiótico en el cuerpo del organizador, los microorganismos tienen un tiempo de generación corto y/o la habilidad de colonizar el interior (y externo) el cuerpo aparece (el Havenaar et al., 1992). La Adhesión puede ser considerada el primer estado de colonización.

La colonización se ha demostrado para algún potencial probiótico. Las tinsiones que se utilizaron (el limada de Limada) se adherieron al intestino y se ha mostrado para tener la capacidad para adherir y crecer en la mucosidad intestinal del rodaballo (el maximus de Scophtalmus), y para tener la acción inhibitoria contra el patógeno y. el anguillarum (el Olsson et al., 1992). Estas tinsiones tenían una capacidad de adherencia buena que aísla de la piel. Patógeno el Vibrio anguillarum, sin embargo, también tiene la habilidad de adherir al intestino de trucha del arco iris (el mykiss de Oncorhynchus) como un primer estado a la infección (Horne y Baxendale, 1983). La Colonización del tracto intestinal de la larva del camarón por el probiótico se ha sugerido como el mecanismo responsable de la prevención de infecciones por una tinsión del patógeno (el Zherdmant et al., 1997), pero los datos disponible es escaso sin el detalle del proyecto experimental o los resultados. En el estudio presente, el modelo de Artemia demostró esa inoculación de una tinsión del probiótico (C14) previno mortalidades causadas por una tinsión del patógeno (HL58). Era supuesto que tinsión 014 colonizó el nauplio de Artemia, internamente y/o externamente y por consiguiente confirió protección.

7.1.1.3 PRODUCCIÓN DE SUBSTANCIAS ANTAGÓNICAS

Los microorganismos con habilidad para competir con otros microorganismos por la producción de sustancias antimicrobiana tienen una ventaja al colonizar el ecosistema. Cuando un probiótico se exige reprimir potenciales probiótico u otros microorganismos desventajosos en el organizador, sería de beneficio si la tinsión poseía las propiedades antagonicas (el Havenaar et al., 1992). UNA revisión comprensiva en la investigación hecha para las tinsiones importante en acuicultura se presentó en capítulo 4. Se han producido Muchos registros oficiales de pleitos en las propiedades de las tinsiones antimicrobianas, pero las metodologías varían y es difícil determinar la validez de algunos de los datos publicada. La mayoría del trabajo se ha realizado en el vitro y casi ningún trabajo se ha hecho en el vivo. Una correlación alta entre los resultados in vitro y en el vivo, sin embargo, se ha obtenido en el humano y se ha cultivado los animales (el

Havenaar et al., 1992). Por consiguiente un resultado similar podría esperarse en las especies acuáticas. No obstante, es importante que una selección racional de prometer las tinsiones microbianas y se obtuvo a través de modelos del vitro en organismos vivos (el Havenaar et al., 1992; Huis etal de Veld., 1994).

7.1 .1.4 RESISTENCIA A PROCESAR

Finalmente, la viabilidad y resistencia a procesar son los pasos firmes en la selección de tinsiones del potencial probiótico. Porque las propiedades de las bacterias probióticas deseables son principalmente dependientes en su habilidad de permanecer viable y colonizar, en el momento de la inoculación (Lee y Salminen, 1995). En el probiótico que se estudia en la acuicultura, crecimiento en caldo, cría en tanque. En algunas ocasiones, las células fueron segadas por el Análisis centrífugo y con el almacenamiento helado (Zherdmant, 1997). Si la conservación por el frío se piensa, deben realizarse los estudios para investigar la disminución asociada en la viabilidad. Si el probiótico será helado, entonces un preservante debe ser incluido y sus efectos evaluados.

7.1.1.5 PROCEDIMIENTO DE LA SELECCIÓN SUGERIDO EN LA LITERATURA.

Se han sugerido los pasos en la literatura para la selección in vitro de un probiótico potencial (después del Havenaar et al., 1992), con las adaptaciones para la aplicación más allá del uso con humanos y animales cultivados). Es considerado que los pasos son necesarios, y una propuesta para la selección del probiótico para los camarones en larvicultura se propone en sección 8.2.

1. el potencial de Probiótico informo en la literatura
2. la disponibilidad aislamiento, su viabilidad y probabilidad de contaminación
3. la viabilidad durante el almacenamiento (el estante vive)
4. la tolerancia para los aditivos comida-alimentación
5. la estabilidad durante el proceso (el análisis centrífugo, helando, deshidratando por congelación, etc.)
6. la estabilidad durante el almacenamiento (la humedad, helando, etc.)
7. la tolerancia al ambiente en el organizador (el pH, la salinidad, las sustancias)
8. La resistencia a los antibióticos deseable si se piensa que un tratamiento que combata los patógenos)
9. la adhesión para organizar los tejidos (la colonización de tejidos intestinales)
10. La actividad Antimicrobial (la producción de antibióticos, u otras sustancias antimicrobial)

7.2 PROPOSICIÓN DE UN ESQUEMA DE LA SELECCIÓN PARA LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA EL USO EN CRIA DE LARVAS DE CAMARON.

Un diagrama de circulación se propone para la selección de bacterias probióticas para el uso en el sistema de cría de larvas acuáticas (Fig. 7.1). Se presentan Los pasos básicos sugeridos para seleccionar una bacteria probiótica en las siguientes secciones.

7.2.1 INFORMACIÓN SOBRE LOS ANTECEDENTES

Los primeros dos pasos para la selección de bacterias del potencial probiótico con una revisión crítica de la literatura disponible y la práctica en los criaderos. El último paso todavía es la deuda bastante difícil al sujeto involucrado en la dirección de la producción, aunque una tendencia hacia la Franqueza se ha observado entre gerentes del criadero.

7.2.2 ADQUISICIÓN DE BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO.

La adquisición de tinsiones debe realizarse considerado los pasos expresados antes (sección 7.1.1.1). Los datos disponible en la literatura se ha tratado de tinsiones aisladas del agua de mar limpia pero la identificación ha estado incompleta. Algunos autores han identificado las tinsiones como v. alginolyticus o por lo menos una sacarosa positivo (amarillo) la colonia en la gelosa de TCBS

(Los Daniel, 1993,; Garriques y Wyban, 1993,; Garriques y Arevalo, 1995,; El Zherdmant et al., 1997).

Para los propósitos prácticos de la identificación de las bacterias probióticas potenciales no es su principal objetivo. Aunque una identificación apropiada se requiere para el control de calidad de la producción y patentando para proteger el interés comercial. Los aspectos importantes son la viabilidad de la tinsión, la resistencia a los antibióticos y su habilidad para-competir con otras tinsiones. La identificación debe realizarse con un sistema que asegura un resultado válido. Los sistemas del API ofrecen - el método primario que, en algunos casos puede identificar al género pero raramente a las especies. Ninguno es el sistema de Biología más extenso un método definitivo, como él identificar un número similar se encontró el sistema de API 20NE. Una combinación de ambos sistemas más la suma de otra prueba se requiere para la identificación más fiable. El capítulo 3 trató con el asunto en más detalle.

7.2.3 EVALUACIÓN DE HABILIDAD DE LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO PARA COMPETIR CON LAS TINSIONES DEL PATÓGENO.

El paso crucial para seleccionar una bacteria del potencial probiótico puede ser su habilidad para competir las tinsiones del patógeno potencialmente. Esto involucra la viabilidad de la tinsión del probiótico dentro de la larva o en su ambiente, la adhesión a las superficies del organizador, la habilidad para colonizar y prevenir el establecimiento de bacterias potencialmente patógenas. Si cualquiera de éstos, están ausente es difícil para el probiótico beneficiar al organizador para un periodo razonable.

El único experimento que puede rendir los resultados rápidos es la competición de tinsiones en los medios de comunicación sólidos. Esto puede ceder los resultados significantes en menos de 48 hr y permitiría las propiedades competitivas de la tinsión seleccionada contra potencialmente patógeno para ser demostrado. Un resultado positivo haría pensar en una bacteria capaz de inhibir el crecimiento de otros.

Observando el crecimiento de un potencial probiótico seleccionados en un medio similar como el ambiente de cría de larvas puede servir para predecir su viabilidad. Otras variables tienen que ser consideradas pero esto serviría como una base para justificar la investigación extensa.

7.2.4 EVALUACIÓN DEL PATÓGENO EN LAS TINSIONES SELECCIONADAS.

El próximo paso sería evaluar el patógeno de la tinsión para las larvas. Un desafío del baño con las larvas sería preferibles, pero tales no son reproductibles. Métodos alternativos que pueden proporcionar los resultados aceptables son el desafío inyección de camarones juveniles o un desafío del baño de nauplios de Artemia desinfectado. Las tinsiones del patógeno probaron en este estudio, HL57 y HL58 produjeron las mortalidades altas en los experimentos con ambos métodos.

Si pudieran obtenerse los resultados fiables de un desafío larval y si una correlación muy positiva se establece entre las mortalidades observadas en los nauplios de artemia en los ensayos y resultados con larvas de camarón, entonces los nauplios de Artemia podrían usarse como un método práctico para evaluar el patógeno de tinsiones del candidato.

Pero uno tiene que ser consciente que nada puede reemplazar el desafío real con los organismos designados deseados.

7.2.5 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS DEL POTENCIAL PROBIÓTICO SELECCIONADO CON LAS LARVAS.

Un probiótico seleccionado debe probarse con las larvas del camarón. Las pruebas pueden llevarse a cabo en un criadero al ambiente, pero es primero aconsejable realizar los ensayos del laboratorio. Positivo los resultados podrían ser una mejora en la actuación de las larvas, no sólo se evalúa la supervivencia superior, pero también el desarrollo más rápido,

ganancias de peso superiores, tinsión de resistencia mejorada y más bajo la incidencia del potencial de la bacteria patógena.

7.2.6 EVALUACIÓN ECONÓMICA

Finalmente es necesario para realizar un análisis económico para determinar que la aplicación del probiótico es el trabajo la inversión. El análisis presentado aquí demuestra que una inversión muy baja es necesaria llevar a cabo una producción máxima de bacterias del probiótico, y la ganancia económica, aun cuando una mejora muy baja en la supervivencia se obtiene, lejos excede el gasto. Para un funcionamiento del criadero real un análisis económico más detallado sería aconsejable.

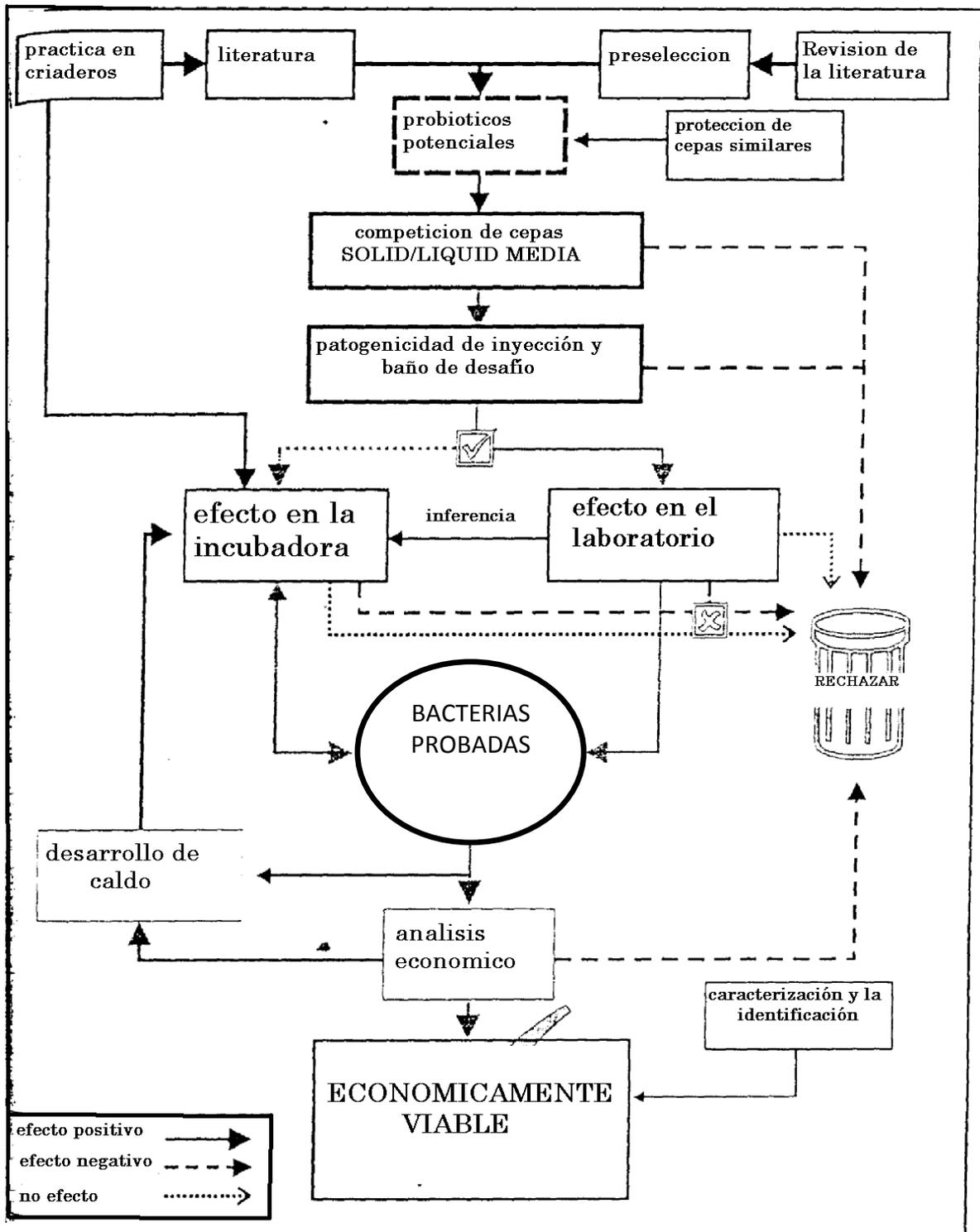
7.3 RECOMENDACIONES Y CONCLUSIONES

La investigación del probiótico en acuicultura está en una fase temprana de desarrollo, mucho trabajo todavía se necesita. El trabajo disponible está inconcluso, cuando pocos experimentos se han hecho con un plan suficientemente robustos permite la evaluación crítica. La mayoría del trabajo es descriptivo de investigaciones del criadero en lugar de cuidados y un buen diseño de investigación científica empírica.

El objetivo de este estudio era desarrollar una metodología para seleccionar el probiótico para el uso en criaderos de larvas de camarón, y para demostrar su viabilidad por la prueba de las tinsiones seleccionadas para las larvas. Desgraciadamente era difícil dado inventar un método para infectar la larva de camarón para demostrar la eficacia del probiótico seleccionado. En cambio, el modelo de Artemia fue inventado y se mostró esa tinsión C14 y pudo conferir protección contra el ataque de una bacteria patógena.

Varios temas están abiertos para la investigación, pero es importante que deben llevarse a cabo las metodologías básicas antes del trabajo extenso se intente. Algunas de estas metodologías deben incluir un método fiable para evaluar la habilidad de las bacterias para competir, y reproducir los patógenos que van a desafiar a las larvas del camarón.

Figura 7.1. Diagrama de circulación para seleccionar los microorganismos probióticos para el uso en los criaderos de larvas de organismos acuáticos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F., N. EL AMD DE ISHIBASHI S. SHIMAMURA 1995. El efecto de la administración de bifidobacteria y bacterias del láctico-ácido a los terneros recién nacidos y cochinitos. El periódico de Lechería Science78:2838-2846.

Abraham, T.J., R. Palaniappan and K. Dhevendaran 1977. La infestación de Epibiotic de bacterias luminosas en los camarones del peneid el ndicus de Penaeus (H. Mimo Edwards) el larvae. El Periódico indio de Ciencia 26:209-212 Marina.

Alday-Sanz V. 1994. Los estudios en la patogénesis de spp de Vibrio. la infección en el monodon de Penaeus Fabricius. La tesis de PhD, Universfty de Stirling, Escocia,

Amy, P.S., D.L. Haldeman, D. Ringelberg, D.H. Hall and O. Russell 1992. La comparación de sistemas de identificación para la clasificación de bacterias aislada del agua y hábitat del endolithic dentro del subterráneo profundo. Aplicado y la Microbiología 58:3367-3373 Medioambiental.

ANDERSON, I.G., M.N., SHAMSUDIN, M. SHARIFFAND G. NASH 1988. Septicemia bacteriano en la Gamba del Tigre Juvenil, monodon de Penaeus, Culto en los Estanques del agua salobre malasio. Las Pesquerías asiáticas Ciencia 2:93-1 08

Anónimo 1991. el mando de la Enfermedad en el criadero por las técnicas del microbiological. Las Noticias de la Gamba asiáticas, 4 cuarto (8):4.

ARUME, C. 1989. Determinando la dosis letal (LD50) de Vibrio y bacterias de Pseudomonas para la gamba marina. La Ciencia 43:186 Pacífica.

El atlas, R.M. 1988. La microbiología, Principios y Aplicaciones. 2 revisan. MacMillan Pubi. La Cía., Nueva York. 807pp.

Austin, B. 1982. La taxonomía de bacterias aisló de un marino costero pez-reáring la unidad. El periódico de Bacteriología 53:253-268 Aplicada.

Austin, B. 1988. Los métodos en la Microbiología Acuática. John Wiley & los Hijos, Chichister, REINO UNIDO. 425pp.

Austin, B. Y J.G. Día 1990. La inhibición de pathogenic del langostino el spp de Vibrio. por una preparación rocío-seca comercial de suecica de Tetraselmis. Aquaculture 90:389-392.

Austin, B. y J.V. Lee 1992. Aeromonaceae y Vibrionaceae. el In: R.G. la Junta, D. Jones y F.A. Skinner (el eds) los Métodos de Identificación en la Microbiología Aplicada y Medioambiental. Blackwell las Publicaciones Científicas, Oxford, REINO UNIDO. 163-182.

Austin, B., E. Baudet y M. Stobie 1992. el Inhibition de patógenos del pez bacterianos por el Tet rase/mis suecica. El periódico de Eish Enfermedades 15:55-61.

Austin, B., L.E. Stuckey, P.A. Robertson, 1. Efendi y D.R. W. Griffith 1995. Una tinsión del probiótico de alginolyticus de Vibrio eficaz reduciendo enfermedades causadas por el salmonicida de Aeromonas, anguillarum de Vbrio y ordalii de Vibrio. El periódico de Pez Enfermedades 1 8:93

La parihuela, G.I. y R.K.A. Feltham, 1993. Cowan y el Manual de Acero para el Identific las Bacterias Médicas. La Cambridge Universidad Prensa, Cambridge, REINO UNIDO.

La parihuela, P.A. 1992. Probiotics para los pollos. En: El Fuller, R. (el ed) Probiotics. Th el pter de Cha Vendedor ambulante de X. & el Vestíbulo, Nueva York.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris y M. Turck 1966. El testing de susceptibilidad de antibióticos por un solo método del disco regularizado. El Periódico americano de Patología 45:493-496 Clínica.

Bauman, L, P. Baumann, M. Mandel y R.D. Allen 1972. La taxonomía de eubacteria marino aerobio. El periódico de Bacteriología 110:401-429.

Baumann, P. y 1. Baumann 1977. La biología del enterobacteria marino: el genera Beneckea y Photobacterium. Las Revisiones anuales en Microbiología 31:39-61.

Baumann, P. y R.H.W. Schubert 1983. Vibrionaceae. En: N.R. Krieg y J.G. el Bosque (el eds) el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore. 5 16-550.

Bengmark, S. y B. Jeppsson 1995. Protección de la superficie gastrointestinal y rectificación de la mucosa. El periódico de Parenteral y Enteral Nutrición 19:410-415.

Berthe, F., el Ph. Haffner, M. Weppe y Aquacop 1992. El concepto de Nuevo de la bacteriología de crías larvianas: la estructura la dinámica y de poblaciones bacterianas. El In: Memorias 1 Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 197-202.

POR EJEMPLO, Biosca O. Esteve, E. Garay y C. Amaro 1993. La evaluación del API 20E sistema para la identificación y discriminación de *Vibrio vulnificus* biotypes 1 y 2. El Periódico de Pez Enfermedades 16:79-82.

Bogaert, P., M. Dehasque y P. Sorgeloos 1993. Bacterias probióticos en el crecimiento de rotíferos del ht el pilcatiis de *Brachionus* en la cultura. Inédito.

Bohnhoff, N., B.L. Drake and C.P. Placa 1954. El efecto de estreptomycin en la susceptibilidad del tracto intestinal a la infección de las salmonellas experimental. Los procedimientos de la Sociedad de Biología Experimental y Medicina 86:132-137.

Bridson, E.Y. y À. Brecker, 1970. El plan y Formulación de Medios de comunicación de la Cultura Microbianos: J.R. Norris y D.W. las Cintas (el eds) los Métodos en la Microbiología, Vol. 3A. La Prensa académica, Londres. 229-295.

BROCK, J. À. 1992. Currenf los Métodos Diagnóstico para Agentes y Enfermedades de Gamba Marina Cultivada. Las enfermedades de Gamba de *Penaeid* Culta en Asia y los Estados Unidos. El pp. 209 - 231. W. Fulks y K.L. Principal. Los procedimientos de un Taller en Honolulu, Hawaii, 1992. El Institute Oceánico.

Bronce, B.J. y L.G. Leff 1996. Comparación de ácido graso Metilo Ester análisis con el useof API 20E y NFT despojamiento para la identificación de bacterias acuáticas. Aplicado y

- La Microbiología 62:2183-2185 medioambiental.
- Bronce, J.H. 1989. Los antibióticos: su uso y abuso en la acuicultura. *Acuicultura Mundial* 20:34 - 43.
- Bungay, H.R. y M.L. Bungay 1968. La interacción microbiana en la Cultura Continua. En:
- Umbreit, W.W. y D. Perlman (el eds) los Adelantos en la Microbiología Aplicada, Vol. 10. La Prensa académica, Nueva York. 269-290 pp.
- Chung, H.Y. y G.H. Kou 1994. La evaluación de la identificación microbiana empaquetó el sistema del equipo para el diagnóstico rutinario común acuático y el aislamiento de bacterias del nonfermentative. *Las Pesquerías de COA Servicio* 47:69-79.
- DALY, C. 1991. Las bacterias del ácido láctico y fermentaciones de leche. *El periódico de Tecnología Química y Biotecnología* 51:544-548.
- Danek, P. y J. Novak 1992. La influencia de microflora intestinal en cochinillos que aplican el *Lactobacillus casei*. *CCM-4160. Zivocisna Vyroba* 37(2):155-13.
- El Daniel, H.V. 1993. El mando de la enfermedad en los estanques del camarón y criaderos en Ecuador. IV brasileiro del simpósio el cultivo sobrio del camarao. 175-184.
- De la Peña L.D., T. Tamaki, K. Momoyama, T. Nakai y K. el i993 de Muroga. Características de la bacteria causativa de vibriosis en el langostino de Kuruma, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 115:1-12.
- Debach, P. y D. Rosen, 1991. El Mando biológico por los Enemigos Naturales. La Cambridge Universidad Prensa, Cambridge. 440pp.
- Desimone, C., R. Vesefy, B.S. Bianchi y E. Jirillo 1993. El papel de probioticos en el Sistema inmunológico de la modulación el hombre y animales. *El Periódico Internacional de Inmunotherapy* 9:23-28.
- Desmidt, M., R. Ducatelle y F. Haesebrouck 1994. Las infecciones de enteridits de salmonellas La pollería - la enfermedad, diagnostico y control. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 63:33-138.
- Dhert, P., P. Lavens, M. Duray y P. Sorgeloos. 1990. La supervivencia larval mejorada a el metamórfosis de mero asiático (el calcarifer de Lates) usando omega 3-HUFA-enriquecido en la comida. *Aquaculture* 90:63-74.
- Dixon, B. À., S. O. Van Poucke, M. Chair, M. Dehasque, H. J. Nelis, P. Sorgeloos, y À. P. De Leenheer. 1995. Bioencapsulation del sarafloxacin de droga antibacteriano en el nauplii de la Salmuera *Shrim he franciscana* de *Artemia*. *El periódico de sanidad animal* 7:42-45 Acuática.
- Dopazo, C.P., M.L. Lemas, C. Lodeiros, J. Bolinches, J.L. Barja y A.E. Toranzo 1988. La actividad inhibitoria de bacterias marinas antibiótico-productores contra los patógenos del pez. *El periódico de Bacteriología* 65:97-101 Aplicada.
- Douillet, P. y C.J. Langdon 1993. Los efectos de bacterias marinas en la cultura de *Ostra axénica el gigas de Crassostrea (Thunberg) larvae*. *El Boletín* 184:36-51 biológico.

Doufflet, P.A. y C.J. Langdon 1994. El uso de un probiótico para la cultura de larvas de la ostra de Pacífico (las gigas de *Crassostrea Thunberg*). *Aquaculture* 119:25-40.

Duis, K., O. Hammer, M. C. Beveridge, V. Inglis, y E. Braum. 1995. La entrega de quinilone antibacteriano al rodaballo, *maximus* de *Scophthalmus* (L.), vía bioencapsulación. -

La cuantificación y ensayo de eficacia. *El periódico de Pez Enfermedades* 18:29-238.

Ebringer, L., M. Ferencik, N. Lahitova, L. Kacani y D. Michalkova 1995. Antimutación y propiedades de inmunostimulación de bacterias del ácido láctico. *El Periódico Mundial de Microbiología y Biotecnología* 11:294-298.

Elmer, G.W., C.M. Surawicz y L.V. McFartand 1996. Agentes de Bioterapéuticos - una modalidad abandonada para el tratamiento y prevención de infecciones intestinales y vaginales seleccionadas *JAMA* 275:870-876.

Elston, R., L. Leibovitz, D. Reiyea y J. Zatlá 1981. El diagnóstico de vibriosis en ostra con criadero epizótico: las herramientas diagnósticas y rasgos de dirección. *Aquaculture* 24:53-62.

Ellinger, D.K., L.D. el Placa y P.J. Glantz 1978. La influencia de alimentar colostrum fermentado y *acidophilus* de *Lactobacillus* en la flora fecal y los parámetros de sangres seleccionadas de terneros jóvenes. *El periódico de Lechería Ciencia* 61:126.

Esteve, M. y R. Quijada 1995. La evaluación de tres técnicas de infección experimentales con el anguillarum de *Vibrio* en el *brasiliensis* de *Penaeus* Latreille, 1817. *Memorias II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura: 2005-2008*.

Cace zorras, S.M. 1988. Probiotics: La inoculación intestinal para los animales de la producción. *La Medicina* 83:806-830 veterinaria

FREDRICKSON, A.G. 1977. El Behaviour de culturas mixtas de microorganismos. *Las Revisiones anuales en Microbiología* 31:63-87.

Freter. El acots 'icng' 'fcoec.olog'y o e r: 'FUJET, EL OOKCS DE R. El fl'e La Base científica. El capítulo VI. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.

El Fuller, R. 1989b. Probióticos en el hombre y animales, una revisión. *El periódico de Bacteriología* 66:365-378 Aplicada.

El Fuller, R. 1992. Probiotics. *La Base Científica. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.* 398 pp.

García-de-la-Banda, I., O. Chereguini, y I. Rasines. 1992. La influencia de aditivos bacterianos lácticos en el rodaballo (el *maximus* de *Scophthalmus* L.) la cultura de las larvas. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 8:247-254.

Garriques, D. y G. Arevalo 1995. Una evaluación de la producción y uso de una bacteria aislada para manipular la flora microbiana en la producción comercial de postlarvas

de *Penaeus vannamei* en Ecuador. P.53-59. En: *Nadando a través de problemas*

Rieque, *Procedimientos de la Sesión Especial en la Gamba Cultivada, Aquaculture '95*. C. L.

Browdy y J. S. Hopkins (Eds.) *el Mundo la Sociedad de Acuicultura, el Colorete del Bastón, Louisiana, EE.UU.*

Garriques, D. y J. Wyban 1993. Actualizado los adelantos en los *Penaeus vannamei* maduración, nauplios y producción de postlarvas. IV Simpósio Brasileiro Cultivo sobrio de Camarao: 217-235.

GATESOUBE, F.J. 1989. Los adelantos extensos en el tratamiento nutritivo y antibacteriano de rotíferos como la comida *turbot larvae, maximus* de *Scophtalmus el In de L.*: N. de Pauw, et. el al, (Eds.) *Aquaculture - UNA Biotecnología en marcha*. La Sociedad de Aquaculture europea, Bredene, Bélgica. 721-730

GATESOUBE, F.J. 1990. El alimento continuo de larvas de rodaballo, *Scopht a/mus maximus*, y mando del ambiente bacteriano de rotiferos. *Aquaculture* 89:139-148.

Gatesoupe, F.J. 1991 un. El efecto de tres tinsiones de bacterias lácticas en el tracto de la producción de rotiferos, *Brachionuplicatilis*, y su valor dietético para la larva del rodaballo, *maximus* de *Scophtalmus*. *Aquaculture* 96:335-342.

Gatesoupe, F.J. 1991 b. el sp del Bacilo. Las esporas: una nueva herramienta contra la infección bacteriana temprana en las larvas del rodaballo. *El LarvV9l-pep & el Crustáceo Larviculture Symposium*: 409-41 1

GERHARDT, P. 1994. Los métodos General y la Bacteriología Molecular. La Sociedad americana para la Microbiología, Washington, D.C. 791 pp.

GHERNA, L. R. 1994. La Preservación de la cultura, pág. 278-292. En P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. À. Madera, y N. R. Krieg (el ed.), *Métodos General y la Bacteriología Molecular*.

La Sociedad americana para la Microbiología, Washington, D.C.,

Gibson, G.R. y M.B. Roberfroid 1995. La modulación dietética del microbiota colónico humano: introduciendo. *El periódico de Nutrición* 125:1401-1412

GIARDI, G.L. 1985. *Nonfermentative las Varas Gramo-negativas*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EE.UU. 362pp.

Goldin, B.R. y S.L. Gorbach 1992. Probióticos en los Humanos. En: El Fuller, R. Probióticos. La Base Científica. El capítulo XIII. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.

Gomez-Gil, B., L. Tron-Myen, J.F. Turnbull, Inglis de V. y A.L. Guerra-Flores (en la prensa). El *Species* de spp de *Vibrio*. Aislado del hepatopancreas, hemolinfa y tracto digestivo de una población de *vannamel* de *Penaeus* juvenil saludable. *Aquaculture*.

El Gomez-gil, B., M.A. Herrera-Vega, À. Abreu-Grobois y Roque de À. (en la prensa).

Bioencapsulation de dos especies de *Vibrio* en los nauplios de *Artemia*. Aplicado a

La Microbiología medioambiental.

Gonzalez, S.N., R. Cardozo, M.C. Apella y G. Oliver 1995. El papel de Bioterapia de leche fermentada. *Biotherapy* 8:129-134.

Goodenough, E.R. y D.H. Kleyn 1976. La influencia de microflora del yogur viable en la digestión de lactosa por la rata. *El periódico de Lechería Ciencia* 59:601-606.

Gorosope, J.N., K. Nakamura, M. Abe y S. Higashi 1996. La contribución nutritiva de sp de *Pseudomonas*. En la cultura de *Artemia*. *Las pesquerías Ciencia* 62:914-918.

- GRIFFITH, D.R.W. 1995. La microbiología y el papel de probióticos en los camarones en el Ecuador. Los criaderos. En: Lavens, P., Jaspes de E. y 1 Roelands (Eds). Larvi ' 95 Peces & Marisco
- Larviculture Sympósium. La Sociedad de Acuaculture europea, la Publicación No. 24 Especial, El señor, Bélgica. 478.
- Grisez, L., M. Chair, P. Sorgeloos y F. Ollevier 1996. El modo de infección y cobertor de anguillarum de Vibrio en el rodaballo el maximus de Scophtaimus larvae después del desafío oral a través del alimento. Las enfermedades de Organismo 26:181-187 Acuático.
- Guerra-Flores, A.L. y B. Gomez-gil 1996. Patógeno de una bacteria heterotróficas gramnegativas en los galancetes del Pacífico la gamba blanca, el Penaeus vannamei. Segunda Conferencia Internacional en la Cultura de Langostinos Penaeidae y Gambas Filipinas.
- Hameed¹ A.S., P.V. Rao, J.J. Granjero, F.W. Hickman-Brenner y G.R. Abanicando 1996. Las características y patógeno de un Vibrio campbelli-like bacteria que afecta el indicus de Penaeus criadero- (mimo Edwards, 1837) larvas. Aquaculture Research 27:853-863. Hameed, A.S.S. 1993. Un estudio de heterótrofos aeróbicos de la flora bacteriana de los huevos criados, larvas y póstlarvas de Penaeus indicus. Aquaculture 117:195-204
- Hansen, G. y R. Sorheim 1991. El método mejorado para la caracterización de bacterias marinas. El periódico de Microbiological Métodos 13:231-241
- Harty, D.W.S., H.J. Oakey, M. Patrikakis, E.B.H. Hume y K.W. Knox 1994. Patógeno potencial de Lactobacilos. El Periódico Internacional de Comida Microbiología 24:179-189
- Haskell, S.T., Sizemore, R.K. y Colwell, R.R. 1975. La flora bacteriana de la hemolinfa del cangrejo azul, el sapidus de Callinectes; la mayoría de los números probables. La Microbiología aplicada 29:388 - 392
- La incubadora, G.E. y R.S. Lambrecht 1993. El aumento de actividad de fagocitos de macrófago por células los extractos libres de bacterias del ácido láctico seleccionadas. El periódico de Ciencia de la Lechería 76:2485 - 492
- Havenaar, R., B. Diez Borde y J.H.J. Huis n ' el T Veld 1992. La selección de Tinsiones para el uso de Probióticos. En: El Fuller, R. Probiotics. La Base científica. El capítulo IX. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.
- HENTGES, D.J., 1992. Gut Flora y Resistencia de la Enfermedad. En: El Fuller, R. Probiotics. La Base de Scientiflc. El capítulo Vendedor ambulante de V. & el Vestíbulo, Nueva York.
- Horne, M.T. y À. Baxedale 1983. La adherencia de Vibrio anguillarum para organizar tejidos y papel de tes en los patogénesis. El periódico de Pez Enfermedades 6:461-471
- La manga, H. y T. Sozzi, 1991. Probióticos, la ficción de factor. El periódico de Tecnología Química y Biotecnología 51:540-541.
- Hoyt, P.R. y R.K. Sizemore 1982. La dominación competitiva por un Vibrio harvelli tinsión bactericida productor. Aplicado y la Microbiología 44:653-658 Medioambiental.
- El i de Huís no Veid, J.H.J., R. Havenaar y Ph. Marteau 1994. Estableciendo una base científica para el probiótico R&D. Tibtech 12:6-8.

Issac, S. y D. Jennings, 1995. La Cultura microbiana. Bios las Publicaciones Científicas. Oxford, REINO UNIDO. 133 pp.

Lssarasak N., J. Tangtrongpiros, W. Koeypuksa y À. Ponpornpisit (el unplashied) la flora Bacteriana en el Penaeus monodon broodstock normal

Jernigan, M.A., R.D. las Millas y A.S. Arafa 1985. Probióticos en la nutrición de la pollería - una revisión. La Ciencia de Pollería de Mundos Periódico 41: 99-107

Jiravanichpaisal P., T. Miyazaki, O. Limsuwan y À. Somjetlerdchalern 1994. Histopatología comparativa de vibriosis en el langostino del tigre negro, de Penaeus monodon. En: La Fishe ríes Sociedad asiática (el ed) Segundo Simposio las Enfermedades en la Acuicultura de Asia. La Sociedad de Pesquerías de Asia, p 14,

Jonecova, Z., R. Nemcova y y. Kmet 1992. El efecto de células de levadura y administración de Lactobacillus en la fermentación de rumen de oveja. Zivocisna Vyroba 37:771 -776

Jonsson, E. y P. Conway 1992. Probióticos para los Cerdos, p 260-316. En el Fuller de R. (Ed.) Probiotics. La Base Científica. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.

Joosten, P. H. M., M. Aviles-Trigueros, P. Sorgeloos y J. H. W. M. Rombout 1995. La vacunación oral de la carpa juvenil (el carpio de Cyprinus) y besugo del gilthead (Sparus el aurata) con la bioencapsulación del Vibrio anguillarum bacterin. El pez y la Inmunología 5:289-99 de Marisco

Karthiayani, T.C. y KM. Iyer 1975. La flora bacteriana de cierta pesca y langostinos en las aguas marinas de Cochin respecto a su contorno. El periódico de la Asociación de Biology Marina de India 17:96-100

Kent, M.L. 1982. Las características e identificación de Pasteure/la y especies de Vibrio

Patógeno a peces .using API-20E (los productos de Analytab). CanadiaR El periódico de Pesquerías y las Ciencias 39:1725-1729 Acuáticas

Kishi, À., K. Uno, Y. Matsubara, C. Okuda y T. Kishida 1996. El efecto oral y

la administración de Lactobacillus brevis subsp. El coagulante en la nterferencia alfa la capacidad productora en los humanos. El periódico de la Escuela americana de Nutrición 15:408 - 412

Klinger, J.M., R.P. Stowe, D.C. Obenhuber, T.O. los Bosquecillos, S.K. Mishra y D.L. Pierson 1992. La evaluación Biológica automatizó el sistema de identificación microbiano.

La Microbiología 58:2089-2092 medioambiental

Koudela, K., J. Holoubek, M. Tylter, M. Buresova, D. Vomelova, M. Dvorak, D. Sanchez, K. Siama y P. Mican 1996. Los efectos nutritivos en la actuación y excreción de nitrógeno en las gallinas de laying dominante D-102. Zivocisna Vyroba 41: 75-81

Kovacszomborszky, M., F. Kreizinger, S. Gombos y Z. Zomborszky 1994. Los datos y el efecto del probiótico Láctico SACC. Acta Veterinaria Hungarica 42:3-14

KRAUSS, E. 1996. Experiencias en aprovechamiento de postlarvas salvajes y de laboratorios en Ecuador. Presentado a Camarocultores ' 96, Foro Internacional. 1-3 Agst.

LAVILLA-PITOGO C.R. 1993. Las enfermedades bacterianas de gambas del penaeidae: una vista asiática. En: La sociedad de las pesquerías asiática

(el ed.) Segundo Simposio en las Enfermedades en Acuicultura asiático. La Sociedad de las Pesquerías asiática, p 13.

Lavilla-Pitogo, C.R., Ma.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda y L. D. del la Pena, 1990. La ocurrencia de enfermedad bacteriana luminosa en larvas de *Penaeus monodon* en

Filipinas. *Aquaculture* 91:1-13

Lee, Y.K. y S. Salminen 1995. La próxima edad de probióticos. Las tendencias en la Ciencia de Comida y Technolgy. 6:241445

Le-Groumel ec, M., P. Haffner, B. Martin y C. Martin, 1993. El estudio comparativo de infecciones bacterianas y la mortalidad masiva responsable en los cultivos de camarones de penaeidae de la zona del Pacífico. Segundo congreso en las Enfermedades en Aquaculture asiático, octubre, Thailandia. Las Pesquerías asiáticas Society: 1 2.

Le-Groumellec, M., P. Haffner, B. Martin, O. Martin y Aquacop. Inédito. El estudio comparativo de infecciones bacteriano y la mortalidad masiva responsable en los criaderos de gamba de penaeidae de la zona del Pacífico. El Centro Oceanologique de Pacifique, IFREMER BP. 7004, Taravao, Tahiti, Polynesie Francaise.

Lemos, M.L., C.P. Dopazo, A.E. Toranzo y J.L. Barja 1991. La dominación competitiva de bacterias marinas antibiótico-productores en las culturas mixtas. El periódico de Bacteriología 71:228-232 Aplicada

Leong, J.K. y C.T. Fontaine 1979. La valoración experimental de la virulencia de cuatro especies de bacterias de *Vibrio* en la gamba del penaeid. Proceda. Segundo Biennal Crustáceo Salud Taller. Texas A&M Univ. TAMU-SG-79-1 14.

Leong, J.K. y D. Hanrahan 1980. Los preliminares estudios y efectos de las toxinas de *Vibrio* en la supervivencia y coagulación de la hemolinfa en la gamba blanca el setiferus de *Penaeus* (Linnaeus). 6 ' el simposio " de Ciencia de FDA americano *Aquaculture*: la higiene pública, Regulador y Aspectos de Gestión. Nuevo Orleans, Louisiana.

Lewis, D.H. y A.L. Lawrnce 1983. Immunoprophylaxis al sp de *Vibrio*. El Simposio de los procedimientos en el Agua Calurosa *Aquaculture-Crustacea*. Brigham Univ Joven. Laie Hawaii.

Liao, 1.0., M.S. Su y C.F. Chang. 1992. Las enfermedades de *Penaeus monodon* en Taiwán: Una Revisión de 1977 a 1991. Las enfermedades de Gamba *Penaeidae* Culta en Asia.

Estados Unidos. p.p. 113-137. W.Fulks y K.L.Main. Los Procedimientos de un Taller Honolulu, Hawaii, 1992. El Instituto Oceánico.

LIGHTNER, D.V. 1993. Las enfermedades de Gambas de *Penaeid* Cultas. P.393-486. En: McVey, J.P. (el ed.). El Manual de ORO de Maricultura. Vol.1. CRC Press, Boca Raton.

LIGHTNER, D.V. 1996. Un Manual de Patología de la Gamba y Procedimientos de Diagnóstico para las Enfermedades de Gamba de *Penaeid* Culta. El Mundo la Sociedad de Aquaculture, el Colorete del Bastón, el La.

Lightner, D.V. y D.H. Lewis 1975. Una septicemia el síndrome de la enfermedad bacteriano de gamba del penaeidae. La Revisión de las Pesquerías marina. 37:25-28.

Lodeiros, C., À. Espin, Y. Ordaz y O. Gonzalez 1989. El antibiótico en Actividad de los puertos deportivos de las bacterias ante el patógeno de

- puertos deportivos de bacterias en humanos. *Acta Científica Venezolana* 40:254-256.
- El Lloyd-Evans, L.P.M. 1989. Probiotics. PJB PUBI. S.A., Richmond.
- MacDonell, M.T., F.L. el Semifallo y M.A. Capucha 1982. La composición del diluyente para el uso de API 20E caracterizando marino y la bacteria estuarina. Aplicado a la Microbiología 44:423-427 Medioambiental.
- MAEDA, M. 1988. Los microorganismos y protozoarios como el alimento en la maricultura. *Progrese en la Oceanografía*. 21:201-206.
- MAEDA, M. 1992A. Fría la producción con el biocontrol. *El Periódico israelita de Aquaculture-Bamidgeh* 44:142-143.
- MAEDA, M. 1992B. El efecto de población bacteriana en el crecimiento de larvas de langostino, de *Penaeus monodon*. *Boletín de el Instituto de la Investigación Nacional de Aquacultura* 21:25-29.
- MAEDA, M. 1994. El boletín del Instituto de la Investigación Nacional en Acuicultura, Complemente 1:71-74.
- Maeda, M., K. Nogami y N. Ishibashi, 1992. La utilidad de reuniones de comida microbianas por cultivar el cangrejo, *tritubercuiatus* de *Portunus*. El boletín del Instituto de la Investigación Nacional en Aquaculture 21:31-38.
- El mariscal, V.M. 1991. Los intestinos de organismos para las fermentaciones de leche. *El periódico de Tecnología Química y Biotecnología* 51:548-553.
- MARTEAU, P.; P. POCHART; Y. BOUHNİK; S. ZIDI; 1. GODEREL & J. C. RAMBAUD. 1992. La supervivencia de acidophilus de *Lactobacillus* y sp de *Bifidobacterium*. Ingerido en una leche fermentada en el pequeño intestino - una base racional para el uso de probióticos en el hombre. *Gastroenterologie el et de Clinique Biologique* 16:25-28.
- McVey, J.P. y J.M. Zorro 1983. Las Técnicas del criadero para Gamba de *Penaeid* Utilizada por Texas A&M-NMFS el Galveston Laboratorio Programa. En: J.P. MacVey (el ed) el Manual de CRC de Mariculture, Vol. 1 Crustáceo Aquaculture. CRC Press, Boca Raton, Florida. 129-167.
- Meurman, J.H., H. Antila y S. Salminen, 1994. La recuperación de tinsión de *Lactobacillus GG* (ATCC 53103) de la saliva de voluntarios saludables después de que el consumo de yogur preparó con la bacteria. *La Ecología microbiana y la Salud Enferma* 7(6):295-298.
- MILLAR, M.R., 1993. ¡Entera! alimentando de infantes prematuros con *Lactobacillus GG*. Los archivos en las Enfermedades de Niñez 69:483-487.
- Molinero, J.M. y D.L. Rhoden 1991. La evaluación preliminar del Biolog, un método de fuente de carbono para la identificación de bacterias. *Jouranl de Microbiología* 29:1143-1147 Clínica.
- MOHAN, B.; R. KADIRVEL; À. NATARAJAN & M. BHASKARAN. 1996. El efecto de suplementación del probiótico en el crecimiento, utilización de nitrógeno y colesterol de suero en las parrillas. *La Pollería británica Ciencia* 37:395-401.
- Mohney, L. L., D. V. Lightner, y R. R. Williams. 1990. Bioencapsulación de cantidades terapéuticas del Romet-30 antibacteriano en el nauplio de la Gamba de la Salmuera *Artemia* y el nematodo el redivivus de *Panagrellus*. *Jouranl del Mundo la Sociedad de Aquaculture* 21:186 - 191.
- Mohney, L.L., Lightner, D.G y Beil, T.A. 1994. An Epizootia de Vibriosis en el ecuatoriano Estanque-crió el *vannamei* de *Penaeus Boone* (Crustacea: Decapoda). *El Periódico del Mundo Aquaculture Sociedad* 25,1:116-125

MONTOYA, L.R. 1992. Caracterización la identificación del género de bacterias el *Vibrio* en sistemas de acuicultura en Ensenada A.C. el establecimiento mediante el mínimo de conjunto de una prueba taxonómica. B.Sc. la Tesis ICMYL-UNAM. México.

Moore, W.E. y L.V. Holdemann, 1974. La flora fecal humana: la flora normal de 20 Hawaiiano japoneses. *La Microbiología* 27:961-979 aplicada.

MUNRO, P.D., À. BARBOURAND T.H. BIRKBECK 1994. ¡La comparación de las bacterias del intestino! la flora de salida de la larva del rodaballo criado bajo condiciones diferentes. *El periódico de Bacteriología* 77:560-566 Aplicada.

Nedoluha, P.C. y D. Westhoff 1997. La microbiología en cría en tres sistemas de la acuicultura. *La comida Microbiología* 14:255-264.

NEUMANN, E. & O. L. FERREIRA. 1995. El acidophllus de *Lactobacillus* como la susceptibilidad del en-vitro adjunta dietética al jugo gástrico, sales de la bilis, lisozimo y agentes quimioterapéuticas. *Revista de Microbiología* 26:59-65.

Neut, C., Romond, C. y Beerens, H.A. 1980. Una contribución al estudio de la distribución de especies de *Bifidobacterium* en la flora fecal de pecho-alimentó a los bebés. *La reproducción, Nutrición y Desarrollo* 20:1679-1684.

NEWBOLD, C. J.; R. J. WALLACE; R. J. CHEN & F. M. MCLINTOSH. 1995. Las tinsiones diferentes de cerevisiae de *Saccharomyces* difieren en sus efectos en el ruminal bacteriano numera el vitro de n y en la oveja. *El periódico de Ciencia* 73:1811-1818 Animal.

Newbold, C.J., R.J. Wallace y F.M. McIntosh, 1996. El modo de acción de la levadura el cerevisiae de *Saccharomyces* como un aditivo del alimento para el rumiante. *El Periódico británico de Nutrición* 76(2):249-26 1.

Nicolás, J.L., Despepitador de S., G. Gauthier, R. Robert y D. Ansquer 1996. Los problemas bacterianos asociaron con el vieira el maximus de *Pecten* la cultura larval. *Las enfermedades de Organismos Acuáticos* 27:67-76.

Nicolás, J.L., Despepitador de S., G. Gauthier, R. Robert y D. Ansquer 1996. Los problemas bacterianos asociaron con el vieira el maximus de *Pecten* la cultura larval. *Las enfermedades de Organismos* 27:67-76 Acuáticos.

Nicholls, K.M., J.V. Lee y T.J. Donovan 1976. Una evaluación de bilis de citrato de tiosulfato comercial la gelosa de sacarosa de sal (TCBS). *El Periódico de Applied Bacteriología* 41:265-269.

Nogami, K. y M. Maeda, 1992. Las bacterias como agentes del biocontrol pora crias de larvas del cangrejo el trituberculatus de *Portunus*. *El Periódico canadiense de Pesquerías y la Ciencia Acuática* 49:2373 - 2376.

Oliver, J.D. 1982. Taxonomía y planes para la identificación de bacterias marinas. *El profundo-mar Investigación* 29:795-798.

Olsson, J.C., À. Westerdahl, P.L. Conway y S. Kjelleberg 1992. La colonización intestinal potencial de rodaballo (el maximus de *Scophthalmus*) - y Golpecito (el limada de *Limada*) - las bacterias asociadas con los efectos inhibitorios contra el anguillarum de *Vibrio*. *Aplicado a la Microbiología* 58:551-556 Medioambiental.

Parker, R.B. 1974. Probioticos, la historia antibiótica. *La Nutrición animal y Salud* 29:4-8.

Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero y N. Gobbato, 1995. El simposio las bacterias de Probióticos para los humanos - el sistema Clínico para la evaluación de estímulo de sistema inmunológico de efectividad para los probióticos. El periódico de Lechería Ciencia 78:1597-1606.

Pizarro, F. y Alfaro, J. 1994. La Actuación reproductor de *Penaeus stylirostris* Hembras Inyectó con el alginolyticus de *Vibrio* Calor-frío. El periódico del Mundo Aquaculture Sociedad 25:576-578.

PORUBCAN, R. S. 1990. Probióticos en los 1 990s. El compendio en la educación continúa para el veterinario en práctica. 12:1353-1 359.

Power, R. y E. Moore, 1994. Las culturas vivas: su uso en la biotecnología industrial. La biotecnología Adelanta 12:687-692.

Prayitno, S.B. y J.W. Latchford 1995. Las infecciones experimentales de crustáceos con bacterias luminosas relacionadas a *Photobacterium* y *Vibrio*. El efecto de salinidad y pH la infecciones. Aquaculture 132:105-112.

Sacerdote F. y B. Austin. 1993. La Taxonomía Bacteriana moderna. 2 Edición. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Londres. 228 pp.

La viga, J.J., 1995. El papel de bacterias del ácido láctico en la prevención de cáncer de colon. El Periódico escandinavo de Gastroenterology 30:497-502.

RAIBAUD, P. 1992. La interacción bacteriano en el Intestino. el In: El Fuller, R. Probiotics. La Base Científica. El capítulo III. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.

RHEINHEIMER, G. 1991. La Microbiología acuática. Wiley e Hijos, Chichester. 257 pp.

La Rico-mora, R. y D. Voltolina 1995 Efectos de bacterias aislada del costado de *Skeletonema* cultivada en la supervivencia de los nauplios de *Artemia franciscana*. El periódico de Invertebrados Patología 66:203-204.

Roberts, R.J., 1993. La introducción. En: Inglis, y., R.J. Roberts y N.R. Bromage (Eds.) las Enfermedades Bacterianas de Pez. Blackwell las Publicaciones Científicas, Londres.

El Roque, À. 1995. La inducción experimental de spp de *Vibrio*. La infección en el monodon de *Penaeus* (Fabricius). Ph.D. la tesis, Univ. De Stirling, Escocia.

El Roque, À., J.F. Turnbull y M.V. Alday-Sanz 1993. El desarrollo inicial de un spp de *Vibrio*. El método de desafío de baño para la gamba marina el monodon de *Penaeus*. Segundo Simposio las Enfermedades en Acuicultura asiático, octubre, Thailandia. Las Pesquerías asiáticas Sociedad 10.

Rosenfeld, W.D. y C.E. Zobell 1947. La producción antibiótica por los microorganismos marinos. El periódico de Bacteriología 54:393-39.

Rowland, I.R. 1992. La interacción metabólico en el Intestino. El In: El Fuller, R. Probiotics. La Base Científica. El capítulo III. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.

ROWLAND, LR. y P. Grasso. 1975. La degradación de NO-nitrosamines por el intestino bacteriano. La Microbiología 29:7-12 aplicada.

Ruangpan L. y T. Kitao 1991. Las bacterias de *Vibrio* aisladas de la gamba del tigre negra, monodon de *Penaeus Fabricius*. El periódico de Pez Enfermedades 14:383-388.

Ruiz, C.M., Román de G. y J.L. Sánchez 1996. Una tinsión marina eficaz en los antagonismos productores de otras bacterias. Aquaculture International 4:289-291.

SAIMINEN, S.; E. ISOLAURI & T. ONNELA. 1995. Estirpación de la flora normal y desorden de los estadios. *Quimioterapia* 41:5-15.

Las lijadoras, J.E. y J.L. Sartén 1988. El Entorno especializado. En: B. Austin (ed) *los Métodos en la Microbiología Acuática*. John Wiley & los Hijos, Chichester, REINO UNIDO. 115-142.

Salvaje, D.C. 1979. La introducción a los mecanismos de asociación de microbios indígenas. *El Periódico americano de Nutrición* 32:113-118 Clínica

Saxelin, M., N.B. Chuang, B. Chassy, H. Rautelin, P.H. Makela, S. Saiminen y S.L. Gorbach, 1996. Lactobacilli y bacteremia en Finlandia del sur. *Las enfermedades infecciosas* 22(3):564-566 clínicas.

Saxelin, M., T. Pessi y S. Saiminen, 1995. La recuperación fecal la administración oral de tinción de Lactobacillus GG (ATOO 53103) en las cápsulas de gelatina a voluntarios del healthy. *El Periódico Internacional de Comida Microbiología* 25:199-203.

Scott, J.B. y Thune, R.L., 1986. La flora bacteriana de la hemolinfa del Pantano Rojo Orawfish, clarkii (Girard de Procamburus), de los estanques comerciales. *Aquaculture* 58:161-165.

Shariff M. y Subasinghe R.P., 1992. Comandante Diseases de Gamba de Cultured en Asia: Una Apreciación global. *Las enfermedades de Cultured Penaeid Shrimp en Asia y los Estados Unidos*.p.

37-46. En: W. Fulks y K.L. Principal. *Los procedimientos de un Taller en Honolulu, Hawaii, 1992*. El Instituto de Oceanic.

SISSONS, J.W., 1989. Organismos potenciales del probiótico para prevenir la diarrea y promover la digestión en los animales de la granja - una revisión. *Journal de Ciencia en la Comida y Agricultura*, 49:1 - 13.

Smith, H.S., 1919. Mando del insecto por el método biológico. *Journal de Entomology* 12:288-292 Económico

Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Bbuchowski, A., Boutard, A. y Dubeau, H. 1993. Les Probiotiques. *El Periódico canadiense de Microbiology* 39:1089-1095

Sneath, P.H.A. y R.R. Sokal 1973. *La Taxonomía de Numerical: el Principios y Practise de Numerica* (Olassif, catión. W.H. el Hombre libre, San Francisco, EE.UU.

La canción Y.L., W. Cheng y O.H. Wang 1993. El aislamiento y caracterización de *Vibrio damsela* infectado para la gamba culta en el Taiwán. *El periódico de Invertebrado Patología* 61:24-31.

Sorgeloos, P., E. Bossuyt, E. Laviña, el M. Baeza-colina ard G. Persoone 1977. Decapsulación de quistes de Artemia: una técnica simple para la mejora del uso de gamba de la salmuera en la acuaculture. *Aquaculture* 12:311.

Soto, O.O. 1992. El Incidencia bacteriana en un laboratorio comercial de cría larvaria en la producción del camarón. pág. 116-130. En: *Reunión Nutrición Sobrio y Biopatología Acuícola*. Ma.C. Báez, J.A. López y L.A. Pérez (Eds.) Universidad de Sonora, México.

Spencer, R.J. y A. Ohesson 1994. El efecto de spp de Lactobacillus. En la atadura de enterotoxigenic de *Escherichia coli* al enterocytes del porcine aislado. *El periódico de Bacteriology* 77:2 1 5-220 Aplicado.

Straub, D.V. y LICENCIADO EN FILOSOFÍA Y LETRAS Dixon 1993. La flora bacteriológica de la gamba de la Salmuera (la franciscana de Artemia) de

un estanque de alta salinidad en la bahía de San Francisco, California. *Aquaculture* 118:309-313.

Sugita, H., K. Shibuya, H. Hanada y Y. Degushi 1996. Las habilidades antibacterianas de microflora intestinal del pez del río. *Aquaculture* 145:1-4.

Suzuki, K., K. Muroga, K. Nogami y K. Maruyama 1990. La flora bacteriana de cangrejo que nada culto (el trituberculatus de Portunus) el larvae. *Pesque Patología* 25:29-36.

TAKAHASHI Y, Y. SHIMOYAMA, K. MOMOYAMA 1984. Patógeno y características de spp de Vibrio. El Langostino de Kuruma culto *Penaeus japonicus* Bate. El boletín de la Sociedad japonesa. de Pesquerías 51:721-730 Científicas.

Takahashi Y., Nagoya H., y Momoyama, K. 1984. Patógeno y Características de spp de Vibrio. Aislado de Postlarvas enfermas de Langostino de Kuruma, *Penaeus japonicus* Bate. El periódico de la Universidad de Shimonoseki de Pesquerías 32:23-31

Taylor, P.W., J.E. Crawford y E.B. Schotts 1995. La comparación de dos sistemas de la prueba bioquímicos con los métodos convencionales para la identificación de patógeno de la bacteria al warmwaterfish. El periódico la sanidad animal 7:312-317 Acuática.

Toranzo, A.E., Y. Santos, T.P. Nieto y J.L. Barja 1986. La evaluación de sistemas de ensayo diferente para la identificación de tinsiones de *Aeromonas* medioambientales. Aplicado a la Microbiología 51:652-656 Medioambiental.

TORTUERO, F., 1973. La influencia de implantación de acidoph/lus de *Lactobacillus* en los polluelos en el crecimiento, alimento conversión, el malabsrotion de síndrome de grasas y la flora intestinal. *Pouftry Ciencia* 52:197-203.

Tortuero, F., J. Rioperez, E. Fernandez y M.L. Rodriguez, 1995. La contestación de cochinitos a la administración oral de bacterias del ácido-láctico. El periódico de Comida Protección 58:1369-1374.

TOWNER, K.J. 1995. Las genéticas de resistencia, pp 159-167. En: D. Greenwood (el ed) la quimioterapia de Antimicrobial. Oxford Univ. Apriete, Oxford, REINO UNIDO.

Treece, G.D. y M.E. Yates 1990. El Manual del laboratorio para la Cultura de Gamba de *Penaeid Larvae*. La Texas A&M Universidad, la Estación de la Escuela, Texas. 95pp.

Van el der Waaij, D., J.M. Berghuis de Vries y J.E. el Lekkerkerk carro de mudanzas der Wees, 1971. La resistencia de la colonización del tracto digestivo en convencional y antibiótico-para los ratones. El periódico de Higiene 69:405-411.

Vandamme, P., 8. La Olla, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters y J. Swing, 1996. La taxonomía de Polyphasic, un acercamiento del acuerdo general al sistema bacteriano. *Microbiological repasa* 60:407-438.

EL LENGUAJE C de Vanderzant, Nickelson R, y J.C. Parker 1970. El aislamiento de parahaemolyticus de *Vibrio* de la gamba de costa de golfo. El periódico de Comida de Leche y Tecnología 33:161-1 62.

Vanderzant O, R. Nickelson, y P.W. Judkins 1971. La flora microbiana de gamba castaña estanque-criada (el aztecus de Periaeus). La Microbiología 21:915-921 Aplicada

Vera, P., J.I. Navas, y M.C. Quintero 1992. El Estudio experimental de la Virulencia de Tres Especies de Bacterias de Vibrio en Penaeus japonicus (Disminuya 1881) los Galancetes. Aquaculture 107:119-123.

Verdonck, L., L. Grisez, E. Sweetman, G. Minkoff, P. Sorgeloos, F. Ollevier y J. Swings 1997. Vibrios asoció con la producción rutinaria de plicatiis de Brachionus. Aquaculture 149:203-214.

Wallace, R.J. y C.J. Newbold, 1992. Probióticos para Rumiantes. En: El Fuller, R. Probiotics. La Base Científica. El capítulo XII. Vendedor ambulante & el Vestíbulo, Nueva York.

Guarde, N.R., R.L. Wolfe, C.A. la Justicia y B.H. Olson 1986. Las bacterias fermentativas del agua: los problemas y acercamientos de la alternativa a la identificación. Los adelantos en la Microbiología 31; 293-365 Aplicada.

Westerdahl, Å., J.C. Olsson, S. Kjelleberg y P.L. Conway 1991. El aislamiento y caracterización de rodaballo (Scophtalmus las bacterias maximus)-asociadas con los efectos inhibitorios contra el anguillarum de Vibrio. Aplicado a la Microbiología 57:2223 Medioambiental - 2228.

WESTON, D.P. 1996. Las Consideraciones medioambientales en el Uso de Drogas Antibacterianas en Acuicultura. En: Baird, D., M.C.M. Beveridge, L.A. el Kelly y J.F. Muir (Eds.)

Aquaculture y Gestión del recurso híbrico. La Ciencia de Blackwell S.A..., Oxford. 140 -

165 pp., etal

WILKENFELD, J.S. 1992. El Informe de Estado de Criadero comercial: un Punto de vista de Tablero de Industry. En: Wyban, J. (Ed) los Procedimientos de la Sesión Especial del Cultivo de la gamba. La Sociedad de Aquaculture Mundial, el Colorete del Bastón, LA, EE.UU. pp 71-86.

Williams, P.E.V., C.A.G. Tait, G.M. el nnes y C.J. Newbold, 1991. La inclusión de efectos de levadura el cerevisiae de Saccharomyces más el medio de crecimiento en la dieta de VACAS lecheras que ordeñan rinda y la degradación de forraje y modelos de fermentación en el volumen de novillos castrados. El periódico de Ciencia 69:3016-3026 Animal.

Williams. R.R., T.A. Beli y D.V. Lightner 1986. La degradación de trifluralin en el agua de mar controlaba la mycosis larval en la cultura de gamba de penaeidae. El periódico del Mundo Aquaculture Sociedad 17:1-4.

Williams, R.R., T.A. la Campanilla y D.V. Lightner 1992. El test de antimicrobial de gamba. II. El test de toxicidad y determinación de seguridad de doce antimicrobial con la gamba de larvas penaeidae. El periódico de sanidad animal 4:262-270 Acuática.

El lobo, B.W., K.A. Garleb, D.G. Ataya y I.A. Casas 199 &. La Seguridad y tolerancia de reuteri de Lactobacillus en los asuntos de adultos saludables. La Ecología microbiana y la Salud Enferma 8:41-50.

Wyban, J.A. y J.N. Sweeney 1991. La Intensidad de Producción Tecnologica de la Gamba. El Instituto Oceánico, Honolulu, Hawaii. 158 pp.

Yasuda, K. y T. Kitao 1980. La flora bacteriana en el tracto digestivo de langostinos los japonicus de Penaeus Disminuyen. Aquaculture 19:229-234.

Yukinori, T., H. Nagoya y K. Momoyama. 1984. Pathogenicity y Características de sp de Vibrio. Aislado de Postlarvas Enfermo de Langostino de Kuruma, *Penaeus japonicus* Bate. El periódico de la Universidad de Shimonoseki de Pesquerías 32:23-31.

ZAR, J. H. 1996. El Análisis de Biostatistical. El Vestíbulo de Prentice, New Jersey, EE.UU. 662pp. Zherdmant, M.T., L. San Miguel, J. Serrano, E. Donoso y E. Miahle 1997. Estudio y la utilización de probióticos en el Ecuador. El panorama Acuícola 2:28.

ZHERDMANT, V. MA.T. 1996. Caracterización de la cepa bacteriana del *Vibrio harveyi* considerada agente del Síndrome de Bolitas en larvas del *penaeus vannamei* el estudio de los vítro de la cepa del *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiotico. B.Sc. la Tesis, Escuela Politecnica del Litoral Superior, Ecuador.

Ziprin, R.L. y J.R: Deloach 1993. La comparación de probióticos mantenida a través de animales vivos como las gallinas y parrillas. La pollería Ciencia 72:628-635.