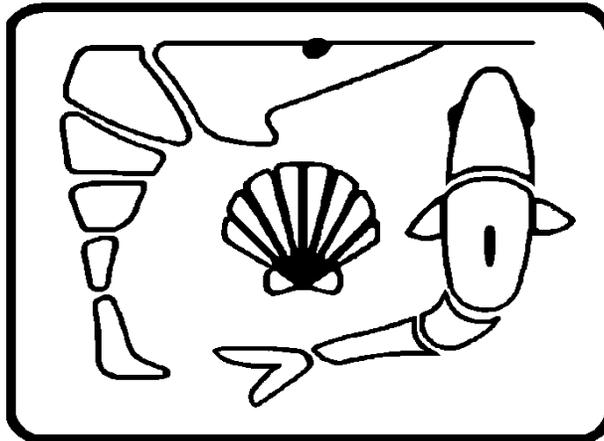




EL SABER DE MIS HIJOS
HARA MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN ACUACULTURA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



**CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO
AISLADOS DEL INTESTINO DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* Y LA
GLÁNDULA DIGESTIVA DEL OSTION DE PLACER *Crassostrea corteziensis*.**

TESIS

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
presenta:**

**ALUMNO:
IRASEMA ELIZABETH LUIS VILLASEÑOR**

HERMOSILLO, SONORA

JUNIO DEL 2007

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura.

Irasema Elizabeth Luis Villaseñor

Comité Tutorial y Evaluador.

Director de Tesis: M. C. Nolberta Huerta Aldaz

Co-Director: Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Comisión Revisora.

M. C. Nolberta Huerta Aldaz
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. José Antonio López Elías
M. C. Eduardo Aguirre Hinojosa

Miembros del Jurado de Examen

M. C. Nolberta Huerta Aldaz
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. José Antonio López Elías
M. C. Eduardo Aguirre Hinojosa

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO AISLADOS DEL INTESTINO DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* Y LA GLÄNDULA DIGESTIVA DEL OSTIÖN DE PLACER *Crassostrea corteziensis*, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

M. en C. Nolberta Huerta Aldaz

Director de Tesis

Dr. Ángel Isidro Campa Córdoba

Co Director de Tesis

Dr. José Antonio López Elías

Sinodal Secretario

M. en C. Eduardo Aguirre Hinojosa

Sinodal

DEDICATORIA

A mis padres Guillermo y Margarita por su apoyo y amor.

A mis hermanos por darme ánimos cuando más lo necesitaba

A mi amigo, compañero, amante, a ti esposo mío, por tu ayuda y consejo y por todo el amor que te tengo, te dedico este escrito.

A mi hermoso bebé Nestor, quien es la luz de mi vida y por quien sigo adelante.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por darme vida, salud y paciencia para la realización y culminación de este trabajo.

A CONACYT por otorgarme una beca con número de registro 181745 para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

A mis directores de tesis M. C. Nolberta Huerta Aldaz y Dr. Ángel Isidro Campa Córdova por sus consejos y sugerencias que hicieron posible la realización de este trabajo, pero en especial por el gran cariño que nos brindan a nosotros los estudiantes.

Al Dr. Domenico Voltolina por todo su apoyo incondicional durante el inicio de mis estudios de maestría.

Al comité revisor Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, M. en C. Nolberta Huerta Aldaz, Dr. José Antonio López Elías y M. en C. Eduardo Aguirre Hinojosa, por sus atinadas sugerencias y tiempo dedicado para la revisión de este documento.

A mis compañeros de maestría generación 2004 y 2005.

A mi gordo hermoso Francisco Antonio Flores Higuera por su ayuda durante la realización de los bioensayos.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, por el espacio y las facilidades que me brindaron para realizar mi tesis bajo la supervisión del Dr. Ángel Isidro Campa Córdova.

A la empresa Productora de Larvas de camarón Acuacultores de la Paz, S. A. de C. V. en especial al Biólogo Ricardo Dubouse, Dr. Soto y Martín por sus consejos, espacio y tiempo en sus instalaciones así como por el aporte de larvas que tan amablemente fueron suministradas para la realización de los experimentos.

RESUMEN

Dentro del cultivo del camarón, la utilización de antibióticos es de uso común para el control de las enfermedades. La tendencia actual es restringir el uso de drogas, evitando los efectos secundarios como son aparición de cepas bacterianas resistentes debido al uso indiscriminado de éstos. Por ello el uso de probióticos es una alternativa potencial en la prevención de las enfermedades bacterianas que afectan a los organismos de cultivo. El presente trabajo tuvo por objetivo obtener de camarones adultos y de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* cepas bacterianas con características probióticas y ver su efecto en la supervivencia larval de *L. vannamei*. Se aislaron 44 cepas de intestinos y glándulas digestivas de organismos sanos que fueron probadas mediante la técnica de inhibición *in vitro*, de las cuales solo cuatro aislamientos bacterianos mostraron tener un efecto inhibitorio sobre *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Para observar el efecto de las 4 cepas seleccionadas en la supervivencia larval de *L. vannamei*, se realizaron bioensayos en unidades experimentales de 3 L (150 nauplios/litro) con nauplios no tratados como control. Las cepas bacterianas fueron inoculadas a una concentración de 10^5 UFC/mL obteniéndose mejores porcentajes de supervivencia con 3 cepas codificadas como YO-I-2-1, YC5-8 y YPD10⁴-1. De éstas se seleccionaron las dos primeras para probar su efecto protector en nauplios y la última se descartó por ocasionar deformidades en las larvas. Para ello se realizaron bioensayos con las mismas unidades experimentales y número de organismos/L y se utilizaron 3 diferentes concentraciones de cada una de las bacterias seleccionadas, así como dos mezclas de ambas cepas, a diferentes concentraciones (M1 y M2: 10^4 y 10^5 UFC/mL, respectivamente), además de un tratamiento adicional de oxitetraciclina y un cultivo control al cual no se le adicionó bacterias. Los mejores porcentajes de supervivencia larval fueron obtenidos con los tratamientos con las mezclas bacterianas, lo que atribuye una posible complementación para maximizar el efecto positivo en los organismos en cultivo. De acuerdo al sistema BIOLOG la cepa YO-I-2-1 fue identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. En lo que respecta a la cepa YC5-8, los datos indican similitud con la cepa *Burkholderia cepacia*. De acuerdo a los resultados obtenidos ambas bacterias se perfilan como buenas candidatas a probióticos para ser utilizadas en el cultivo larvario de camarón blanco.

ABSTRACT

Using antibiotics in the shrimp culture is a common activity to control diseases. The actual tendency is to restrain the use of drugs, to avoid secondary effects like apparition of resisting bacterial strains due for an indiscriminate use of this. For there, the use of probiotics is a potential alternative to prevent the bacterial diseases that affect the organisms of a culture. The aim of this study was obtaining from adult shrimps and cortex oyster *Crassostrea corteziensis* bacterial strains with probiotic characteristics and to see the effect on the larval survival of *L. vannamei*. A total of 44 strains of guts and digestive glands were isolated from healthy organisms which were tested in technical inhibition *in vitro*, from which ones of the only four of the isolated bacteria showed inhibitory effect in *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. The effect of the four selected strains on the survival larval of *L. vannamei* was evaluated in experimental tanks of 3L (150 org/L). Nauplii without treatment were used as a control. Bacterial strains were inoculated at a concentration of 10^5 UFC/mL improving the survival percentages with 3 code strains like YO-I-2-1, YC5-8 y YPD10⁴. From these, the first 2 were selected to evaluate their protector effect in nauplii and the last was discarded for it caused deformities in the larvae. So, bioassays were made with the same experimental units and number of organisms/L and it was used 3 different concentrations for each selected bacteria, so as 2 mixes of both strains, at different concentrations (M1 y M2: 10^4 y 10^5 UFC/mL, respectively), moreover of an additional treatment of oxitetracilin and control culture which no counting bacteria was added. The best percentage of larval survival was obtained from the treatments with the bacteria mixes, attributed at possible complementation to increment the positive effect in the culture organisms. The identification was realized with BIOLOG system, which indicated strain YO-I-2-1 as *Pseudomonas aeruginosa*. Strain YC5-8 indicated a similarity with *Burkholderia cepacia*. From the results obtained, both bacteria are profiled as good candidates for probiotics to be used in the larvae culture of white shrimp.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
II. HIPÓTESIS	12
III. OBJETIVOS.	12
III.1. Objetivo general.	12
III.2. Objetivos específicos.	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
IV.1. Material Biológico.	13
IV.1.1. Organismos.	13
IV.2. Aislamiento bacteriano.	13
IV.3. Actividad inhibitoria de las cepas aisladas.	13
IV.4. Identificación de las cepas candidatas a probióticos con la utilización del sistema BIOLOG.	14
IV.5. Actividad citotóxica.	14
IV.6. Cultivo bacteriano.	15
IV.7. Preparación de cepas patógenas <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> .	15
IV.8. Efecto de las cepas aisladas en la supervivencia larvaria de <i>L. vannamei</i> .	16
IV.9. Análisis estadísticos	17
V. RESULTADOS	18
V.1. Aislamiento bacteriano.	18

V.2. Pruebas de inhibición.	18
V.3. Morfología colonial.	19
V.4. Selección de cepas bacterianas.	20
V.5. Efecto de las cepas seleccionadas en la supervivencia larval.	20
V.6. Efecto de la concentración de las cepas probióticas en la supervivencia larvaria.	22
V.7. Identificación de cepas probióticas.	26
VI. DISCUSIÓN	28
VII. CONCLUSIONES	33
VIII. RECOMENDACIONES	34
IX. BIBLIOGRAFÍA	35
X. ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Clasificación tentativa de tratamientos microbianos usados en acuicultura.	4
2	Halos de inhibición utilizando el método de Dopazo <i>et al.</i> (1988).	18
3	Porcentaje de supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculado con 4 bacterias diferentes (YO-I-2-1 (◊), YPD10 ⁴ (Δ), YC5-1 (◇), YC5-8 (○) y control (■)) a una concentración de 10 ⁵ UFC/mL.	21
4	Porcentaje de supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculados con la bacteria YO-I-2-1 a diferentes concentraciones (10 ⁴ (□), 10 ⁵ (Δ) y 10 ⁶ (◇)UFC/mL y control (○)).	23
5	Porcentaje de supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculados con la bacteria YC5-8 a diferentes concentraciones (10 ⁴ (□), 10 ⁵ (Δ) y 10 ⁶ (◇)UFC/mL y control (○)).	24
6	Porcentaje de supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculados con mezclas bacterianas a diferentes concentraciones (mezcla 1(□): YO-I-2-1y YC5-8 a una concentración de 10 ⁴ UFC/mL, mezcla 2 (Δ): YO-I-2-1y YC5-8 a una concentración de 10 ⁵ UFC/ml) y un tratamiento con oxitetraciclina (◇) así como el control (○).	25
7	Microplaca ilustrada con los resultados de las reacciones bioquímicas de cada una de las fuentes de carbono para la identificación de la cepa catalogada como YO-I-2-1.	26
8	Microplaca ilustrada con los resultados de las reacciones bioquímicas de cada una de las fuentes de carbono para la identificación de la cepa catalogada como YC5-8.	26
9	Dendograma que muestra las distancias filogenéticas y la similitud de la cepa seleccionada YO-I-2-1 aislada de camarón blanco del Pacífico <i>L. vannamei</i> con especies bacterianas.	27
10	Dendograma que muestra las distancias filogenéticas y la similitud de la cepa seleccionada YC5-8 aislada de ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> con especies bacterianas.	27

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
I Mecanismo de acción de bacterias con potencial probiótico.	8
II Posibles resultados de hemólisis bacteriana.	15
III Morfología colonial de cepas bacterianas aisladas de organismos adultos de camarón blanco <i>L. vannamei</i> y del ostión <i>C. corteziensis</i> .	19
IV Diámetro de los halos de inhibición y tipo de hemólisis de las cepas candidatas a probióticos.	20
V Listado de las 95 fuentes de carbono empleadas en el sistema en la identificación bioquímica de las especies bacterianas enumeradas de acuerdo a su posición en la microplaca.	43
VI Análisis de varianza de una vía practicado a los arcosenos de la supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculados con los tratamientos (YO-I-2-1, YPD10-4, YC5-1, YC5-8 y CONTROL).	44
VII Prueba de rangos múltiples de Tuckey para definir diferencias en base al arco seno de los porcentajes de supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculados con los diferentes tratamientos bacterianos ($p < 0.05$).	44
VIII Análisis de varianza de una vía practicado a los arcosenos de la supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculados con todos los tratamientos (YO-I-2-1, YC5-8, MEZCLA 1, MEZCLA 2, OXI y CONTROL).	44
IX Prueba de rangos múltiples de Tuckey para definir diferencias en base al arco seno de los porcentajes de supervivencia larval de <i>Litopenaeus vannamei</i> inoculados con los diferentes tratamientos bacterianos ($p > 0.05$).	45

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

La acuicultura se ha consolidado como una actividad industrial de gran importancia económica debido a la gran cantidad de divisas que genera. El rápido crecimiento de esta actividad es debido al incremento en el consumo *per capita* de proteínas animales a nivel mundial durante los últimos 15 años y a la domesticación de la mayor parte de las especies de cultivo, que ha permitido cerrar su ciclo biológico en cautiverio y por lo tanto producir en ambientes controlados los juveniles necesarios para su siembra en los sistemas de engorda (De Silva, 2000). De igual forma, la camaronicultura alcanza cada vez niveles de mayor importancia, destacándose como una de las actividades de más rápido crecimiento y expansión a nivel mundial (Martínez-Córdova, 2002). Esto ha causado un rápido desarrollo en la producción de postlarvas de camarón para el abastecimiento de los sistemas de cultivo. Sin embargo, el desarrollo de la industria camaronera alrededor del mundo también ha sido caracterizado por el reconocimiento de muchas restricciones en la producción, tales como las enfermedades (Jory, 1998).

Los microorganismos son de mucha importancia en acuicultura, ellos se desarrollan en sedimentos y en aguas de cultivo afectando muchos aspectos de la vida en el ambiente acuático; ya sea produciendo o consumiendo oxígeno, como alimento para organismos de mayor tamaño, como recicladores de nutrientes y como patógenos potenciales para los organismos en cultivo (Gatesoupe, 1999). Dentro del mundo de los microorganismos se pueden mencionar a las bacterias, hongos, algas, protozoarios y virus. Dentro de éstos, las bacterias pueden tener un efecto positivo o negativo en los sistemas de cultivo debido a su habilidad de multiplicarse rápidamente y a sus tiempos de generación que son muy cortos y van de pocos minutos a horas (Gatesoupe, 1999).

La actividad bacteriana positiva incluye degradación de materia orgánica, eliminación de materiales tóxicos tales como amonio, nitritos y sulfatos de hidrógeno, alimento para animales acuáticos y producción de sustancias inhibitorias.

La aplicación de inóculos bacterianos a los organismos de cultivo filtroalimentadores tales como rotíferos, bivalvos y crustáceos, ya sea en larvas o adultos, puede resultar como un alimento complementario o contribuir a la buena digestión del organismo que la consume, así

como ayudar en la supresión de patógenos en el agua de cultivo. Entre los principales géneros de bacterias benéficas presentes se pueden mencionar *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Cellulomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas* y *Acinetobacter*, de entre otras, que actúan beneficiando al organismo en si o a su entorno (calidad de agua). Observaciones obtenidas en experimentos con animales, indican que bacterias probióticas (ácido lácticas) administradas oralmente pueden inducir la resistencia a infecciones entéricas (Holzapfel *et al.*, 1998), de igual forma hay reportes que demuestran que algunos compuestos bacterianos actúan como un inmunoestimulantes en peces y crustáceos, pero sólo compuestos de células específicas o células no vivas fueron usados en estos estudios.

Dentro de los efectos negativos se puede incluir enfermedades causadas por microorganismos patógenos, jugando un papel crítico en la producción sustentable de la acuicultura; como principales géneros patógenos se pueden mencionar *Vibrio*, *Aeromonas*, *Lagenidium*, *Edwardsiella* (Gatesoupe, 1999). Cuando el ambiente acuático es enriquecido por la acumulación de materia orgánica, pueden crecer varias especies de bacterias de estos géneros. *Vibrio* spp. puede crecer rápidamente, no solo porque tiene una alta tasa de crecimiento, sino porque se adaptan a condiciones con deficiencia de oxígeno. Por tales razones, este género bacteriano es uno de los que más infectan a peces, crustáceos y moluscos en cultivo.

El cultivo de camarón es una actividad de alto riesgo donde la aparición y diseminación de enfermedades pueden afectar seriamente su producción (Vargas-Albores, 1995). En camarones peneidos se han aislado bacterias del género *Vibrio* como causantes de enfermedades, entre las que destacan principalmente *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* (Garriques y Arevalo, 1995) y *V. penaeicida* (Aguirre-Guzman y Ascencio-Valle, 2001).

En los laboratorios de producción larvaria, el único método practicado para el manejo de poblaciones bacterianas indeseables ha sido el uso de compuestos quimioterapéuticos, sin embargo, éstos afectan tanto a las bacterias indeseables como a las benéficas (Balcazar, 2002). Con ello, el uso excesivo e inapropiado de antimicrobianos ha favorecido la presencia de cepas resistentes a bacterias; a pesar de esto, muy pocos métodos alternativos de control de

enfermedades han sido encontrados, por lo que es esencial que nuevos métodos sean adoptados como el uso de bacterias en donde el antagonismo que generan ciertas sustancias producidas por algunas poblaciones bacterianas, pueda ser usado para inhibir el crecimiento de patógenos como una medida potencialmente factible para ser considerada como beneficio específico de los organismos en cultivo (Ringo y Gatesoupe, 1998; Maeda, 2002). Bajo este principio ha surgido el empleo de microorganismos benéficos llamados probióticos, los cuales son utilizados como control biológico en la prevención de ataques bacterianos (Balcazar, 2002).

El término probiótico fue usado por primera vez por Lilly y Stillwell (1965), quienes propusieron la definición “sustancias producidas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro”. Después, Parker (1974) definió a los probióticos como “organismos y sustancias los cuales contribuyen al balance intestinal”; pero dado que esta definición incluía antibióticos y ácidos grasos de cadenas cortas, Fuller (1989) propuso una definición más precisa: “suplemento alimenticio de microorganismos vivos que al ser consumidos afectan benéficamente al consumidor al mantener un balance adecuado de la microflora intestinal”. En este mismo sentido, Tannock (1997) sugirió una definición alternativa de probióticos como: células microbianas que son administradas a un organismo por una vía para entrar al tracto gastrointestinal que pueden ser retenidas y permanecer con vida con el fin de proveer salud al organismo hospedero. Basado en la observación de que los organismos son capaces de modificar la composición bacteriana de agua y sedimentos, Moriarty (1999) sugirió que la definición de un probiótico en acuicultura debería incluir la adición de las bacterias vivas a los tanques o estanques en los cuales los animales se cultivan.

Actualmente en acuicultura, el término probiótico usualmente se refiere a un suplemento bacteriano de un cultivo o la mezcla de cultivos de bacterias seleccionadas. Estas bacterias son adicionadas a los sistemas de producción acuícola para modificar o manipular las comunidades microbianas en el agua y sedimento, para reducir o eliminar a las especies patógenas seleccionadas, y para mejorar el crecimiento y supervivencia de las especies acuáticas en cultivo (Jory, 1998).

Entonces los tratamientos con probióticos pueden ser considerados como métodos de control biológicos y por ello se les ha llamado organismos de biocontrol, los cuales limitan o

eliminan plagas por la introducción de organismos adversos, parásitos libres o patógenos específicos. Maeda *et al.*, (1997) proponen como métodos de biocontrol, tratamientos usando "el antagonismo entre microbios" a través de los cuales los patógenos pueden ser eliminados o reducidos en número en los tanques o estanques de cultivo. En otra clasificación aparte, debería considerarse las aplicaciones de bacterias nitrificantes que están relacionadas con el concepto de bioremediación (Moriarty, 1997, 1998). Así, Gatesoupe (1999) propone una clasificación tentativa de tratamientos microbianos usados en acuicultura (Figura 1).



Figura 1. Clasificación tentativa de tratamientos microbianos usados en acuicultura, de acuerdo a la siguiente terminología. El término "Probióticos" es reservado a cepas transitorias o residentes en el tracto gastrointestinal (Tannock, 1997), "biocontrol" implica solamente que la cepa es antagónica a patógenos (Maeda *et al.*, 1997) y "bioremediación" se refiere a la eliminación de residuos contaminantes por los microbios (Moriarty, 1997, 1998).

En la actualidad se ha incrementado la búsqueda de microorganismos probióticos con fines de mejorar los rendimientos en el cultivo de organismos acuáticos, bajo el término de “cultivos amigables” con el ambiente (Gatesoupe, 1999). Los diversos probióticos examinados para uso en acuicultura han abarcado tanto bacterias gram-negativas como bacterias gram-positivas, bacteriófagos, levaduras y algas unicelulares. En particular, los probióticos se han utilizados con éxito en un amplio número de invertebrados (Riquelme *et al.*, 1997; Araya *et al.*, 1999; Ruiz-Ponte *et al.*, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2000).

Bajo tales consideraciones, se han iniciado numerosos estudios enfocados en el uso de probióticos en acuicultura, por ejemplo, Maeda y Liao (1992) aislaron una cepa de larvas de *Penaeus monodon*, identificada como *Thalassobacter utilis* (Nogami *et al.*, 1997), la cual fue usada para el biocontrol de larvas de *Penaeus monodon* y *Portunus trituberculatus*. Este biocontrol incrementó la supervivencia de las larvas y reprimió el crecimiento de *V. anguillarum* (Nogami y Maeda, 1992).

Por otro lado, Garriques y Arévalo (1995), observaron el efecto antagónico de *V. alginolyticus*, el cual fue seleccionado basándose en su aparente falta de patogenicidad y fue inoculado en tanques que contenían postlarvas de *L. vannamei*. Al final del cultivo el promedio de supervivencia y ganancia en peso de los organismos fue mayor en los tanques que contenían el inóculo bacteriano y no se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* comparado con los que recibieron la dosis profiláctica de oxitetraciclina donde aproximadamente el 10 % de las muestras presentó *V. parahaemolyticus*.

De igual forma, Rengpipat *et al.* (1998), reportaron el uso de *Bacillus* S11 como un probiótico administrado en *Artemia* sp. enriquecida utilizadas como alimento para larvas del camarón tigre *Penaeus monodon*, encontrando que las larvas alimentadas con *Artemia* sp. fortificada con el *Bacillus* sp. tuvieron significativamente menor tiempo de desarrollo y menos problemas de enfermedades que las larvas que no recibieron el bacilo. Después de 100 días, las larvas fueron probadas por inmersión contra *V. harveyi*, y al paso de 10 días todos los grupos tratados con el *Bacillus* S11 mostraron 100% de supervivencia en comparación con el grupo control que tuvo el 26%.

Así mismo, Vaseeharan y Pamasamy (2003), evaluaron el efecto antagónico *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus subtilis* (cepa BT23) en larvas de *Penaeus monodon*. El extracto libre de células de *Bacillus subtilis* mostró un amplio efecto inhibitorio para *Vibrio harveyi* aislado de camarones de *Penaeus monodon* que presentaban la enfermedad de branquias negras. El efecto probiótico de *Bacillus* fue probado exponiendo larvas a la bacteria a concentraciones de 10^6 - 10^8 UFC/mL por 6 días retándolas después con *V. harveyi* a 10^3 - 10^4 UFC/mL en un período de 1 hora de infección. Los resultados combinados del tratamiento probiótico a corto y largo plazo mostraron un 90% de reducción en la mortalidad acumulada, concluyendo que las especies de vibrios patógenos fueron controladas por *B. subtilis* bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Así mismo, Himabindu-Venkat *et al.* (2004), estudiaron 4 tratamientos probióticos en dietas de postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii*. Los experimentos fueron conducidos durante 60 días, todas las dietas fueron idénticas con la única variación del linaje probiótico. Los grupos T1 y T2 fueron alimentados con *Lactobacillus acidophilus* (140×10^{11} UFC/100 g) y *L. sporogenes* (24×10^7 UFC/100 g), respectivamente.

Los organismos del grupo T3 fueron alimentados con *L. sporogenes* bioencapsulado en nauplios de *Artemia*. Los grupos T4 y T5, fueron alimentados con *Artemia* sp. Al final del estudio se encontró que con todos los tratamientos se observó un mayor crecimiento que en el grupo control y que la supervivencia no fue afectada por los probióticos en la dieta.

Por otra parte, Rodríguez *et al.* (2004), probaron el efecto inmunoestimulador en camarones *P. vannamei*, utilizando tres cepas identificadas como *Vibrio* sp. P62, *Vibrio* sp. P63 y *Bacillus* sp. P64 con efecto inhibitorio *in vitro* contra *V. harveyi* (S2). Los resultados obtenidos indicaron que la cepa *Bacillus* sp. P64 mostró características inmunoestimuladoras y que las otras dos cepas solo mostraron buenas propiedades probióticas como son antagonismo y colonización del tracto digestivo.

En lo que respecta a bacteriófagos, Park *et al.* (2000) trabajaron con dos cultivos de bacteriófagos, los cuales fueron obtenidos de peces Ayus enfermos, *Plecoglossus altivelis*, pertenecientes a las familias *Myoviridae* y *Podoviridae*. Por administración oral (en alimentos), los bacteriófagos los protegieron contra la infección ocasionada por *Pseudomonas plecoglossicida*, el cual es un patógeno para el cultivo del Ayu. El efecto de los bacteriófagos

en poblaciones de *P. plecoglossicida* y se concluyó que hubo una rápida disminución en el número de células bacterianas de los peces y en el agua.

Por otra parte, Mohanty *et al.* (1996) demostraron que las levaduras tienen un buen efecto probiótico. Estos autores utilizaron a la carpa Catla (*Catla catla*), para evaluar el potencial de bacterias y levaduras, demostrando exitosamente que ambos candidatos incrementaron la supervivencia y biomasa de los organismos en cultivo. De igual forma Naik *et al.* (1999), usaron una premezcla comercial G-PROBIOTIC en tilapia, *Oreochromis mossambicus*, y determinaron que la conversión alimenticia y eficiencia proteica fueron mejores con una dosis de 7.5 g de G-PROBIOTIC/kg de dieta.

En un trabajo realizado por Scholz, *et al.*, 1999, demostraron que las células y β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*, un aislado de *S. exiguus* conteniendo zeaxantinas (HPPRI) y *Phaffia rhodozima* incrementaron la resistencia contra vibriosis en juveniles de peneidos, ofreciendo los siguientes beneficios: fueron capaces de adherirse al intestino, seguido de un realce en la secreción de amilasas y una estimulación de las enzimas de las membranas en larvas de 27 días de edad.

En general algunos investigadores citan que el efecto antibacteriano es debido a los siguientes factores, uno u otro en forma individual o en combinación: producción de antibióticos (Williams y Vickers, 1986), bacteriocinas (Bruno y Montville, 1993; Vanderbergh, 1993; Pybus *et al.*, 1994) lisozimas, proteasas, y/o peróxido de hidrógeno y la alteración de los valores de pH por la producción de ácidos orgánicos, etc. (Sugita *et al.*, 1997).

El criterio para la selección de bacterias probióticas debería incluir la evaluación de los métodos de colonización, habilidad competitiva contra patógenos y los efectos inmunoestimulatorios, así como de crecimiento en los organismos de cultivo (Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000).

La colonización de la cepa del probiótico en el huésped está basada en la capacidad de ésta para adherirse a la superficie de la mucosa o al epitelio intestinal y de ese modo permanecer en el sistema, producir metabolitos que inhiban o antagonicen con la flora nativa, además de inducir una posterior colonización y proliferación, y sobrevivir a los rigores del tránsito a través del tracto intestinal hasta el lugar de colonización (Aguirre-Guzman, 1993).

Los mecanismos tuvieron que ser sugeridos como modo de acción de bacterias probióticas. En resumen, los mecanismos de acción que se han sugerido para los probióticos se resumen en la tabla I.

Tabla I. Mecanismos de acción de bacterias con potencial probiótico.

Microorganismo		
Lactobacilos/Estreptococos	Levaduras	Microorganismo en general (Fuller, 1989)
Cambio en la flora bacteriana y reducción de microorganismos patógenos.	Fuente de nutrientes indispensables: aminoácidos, vitaminas, oligoelementos.	Estimulación de la respuesta inmune humoral y/o celular.
Producción de ácido láctico, con lo que se reduce el pH en el sistema digestivo del animal.	Optimización en el proceso de absorción de minerales, especialmente de zinc, potasio y cobre.	Alteración del metabolismo microbiano por el incremento o decremento de los niveles de enzimas relevantes
Adhesión y/o colonización de los microorganismos seleccionados al sistema digestivo.	Propiedades absorbentes, lo que las convierte en fuentes de nutrientes, y además actúan como amortiguadores de pH.	Exclusión competitiva en los cuales el probiótico antagoniza al patógeno potencial por la producción de compuestos inhibitorios o por la competencia por nutrientes, espacio (sitios de adhesión en el tracto digestivo) u oxígeno.
Prevención por los microorganismos de la síntesis de toxinas.	Propician condiciones de una mayor anaerobiosis, lo que estimula el desarrollo de microorganismos anaerobios estrictos.	
Producción de antibióticos.	Actúan como atractantes naturales, incrementando el consumo por parte del animal.	

Entre las especies probióticas utilizadas como agentes de control biológico en acuicultura se pueden mencionar las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, etc), los géneros *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, etc), *Bacillus* y *Pseudomonas*, además de levaduras (Balcazar, 2002).

Las *Pseudomonas* son bacterias Gram-negativas, bacilos rectos o ligeramente curvos, no helicoidales, móviles con flagelos polares monotricos y multitricos, no esporulados, citocromo oxidasa positiva, catalasa positivos. La detección del pigmento piocianina en el medio de cultivo es virtualmente diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa*. La mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* producen también el pigmento fluoresceína y se desarrollan bien a 42°C, con una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C. La mayor parte de las especies de *Pseudomonas* oxidan hidratos de carbono, produciendo ácido (color amarillo) solo en el tubo de prueba oxidación-fermentación (O-F) expuesto al aire, siendo esta prueba un mecanismo para determinar el metabolismo oxidativo, característica importante de bacterias Gram-negativas no fermentadoras (MacFaddin, 2003).

A través de la evolución, los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente. Por ejemplo, algunos han mejorado sus sistemas de quimiotaxis (Muñoz-Aguilar *et al.*, 1988; De Weert *et al.*, 2002) y otros han elaborado compuestos antimicrobianos para inhibir a otros miembros del ambiente (Jack *et al.*, 1995; Sahl, y Bierbaum, 1998; Riley y Wertz, 2002). Diversas son las sustancias antagónicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat, por ejemplo los antibióticos de amplio espectro (Saadoun *et al.*, 1999), productos del metabolismo como ácidos orgánicos (Lavermicocca, *et al.*, 2000; Lavermicocca *et al.*, 2003), moléculas quelantes de hierro (sideróforos) (Mirleau *et al.*, 2000) y bacteriocinas (Tagg, *et al.*, 1976).

Las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora (Tagg *et al.*, 1976, Klaenhammer, 1988,).

Chythanya *et al.* (2002), demostraron que el linaje marino *Pseudomonas* I-2 produce compuestos inhibitorios contra vibrios patógenos del camarón entre los que incluye *Vibrio harveyi*, *V. fluviales*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* y *V. vulnificus*, mostrando gran potencial de aplicación para el control de vibrios patógenos en sistemas acuícolas.

Lodeiros *et al.* (1998), en una revisión taxonómica de bacterias productoras de sustancias antimicrobianas demostraron que los géneros *Alteromonas* y *Pseudomonas* son los principales productores de sustancias antimicrobianas (52%) en comparación con vibrios que representan solo 8.3%.

Numerosos estudios demostraron la producción de sustancias bacteriostáticas siderofóricas por las bacterias *Pseudomonas* spp., *Alteromonas* spp., *Bacillus* spp. y *Vibrio* spp. (Galvez *et al.*, 1993; Gram, 1993; Guerinot, 1994; McCarthy *et al.*, 1994; Frey *et al.*, 1996; Gatesoupe, 1997).

Gram *et al.* (1999), examinaron la producción de sideróforos aislados de *Pseudomonas fluorescens* aislada de peces de agua dulce. Este linaje es inhibitorio contra diversas bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas principalmente cuando la disponibilidad de hierro es limitada. Pruebas *in vitro* demostraron que el crecimiento de *V. anguillarum* fue inhibido por el sobrenadante previamente esterilizado por medio de filtración de un cultivo de *P. fluorescens* limitado en hierro. Las pruebas *in vitro* fueron confirmadas por una prueba de antagonismo *in vivo* en los cuales la mortalidad de juveniles de trucha arco iris infectadas con *V. anguillarum* fue decreciendo en un 46% cuando el cultivo fue tratado con *P. fluorescens*.

Varios linajes de *Pseudomonas fluorescens* productoras de sideróforos fueron exitosamente aplicados como agentes de control biológico, siendo capaces de excluir la cepa patógena *Aeromonas salmonicida*, aislada del salmón del atlántico con estrés inducido por una infección de furunculosis (Smith, y Davey 1993), así como para disminuir la mortalidad de la trucha arco iris (40 g) infectada con *V. anguillarum* (Gram *et al.*, 1999). Ya sea en una corta o larga exposición, en ambos estudios se obtuvo una buena correlación entre la producción de sideróforos y la acción protectora de *P. fluorescens*, lo que sugirió que la competencia del hierro libre está involucrado en el modo de acción de la bacteria.

En una larga escala de investigación Spanggard *et al.* (2001), recabaron 1018 bacterias y levaduras aisladas de piel, branquias e intestinos de trucha arco iris. De éstas, 45 cepas tuvieron efectos inhibitorios contra *V. anguillarum* en pruebas de difusión en disco. Las antagonistas dominantes fueron las bacterias del género *Pseudomonas*, que mejoraron la supervivencia de la trucha arco iris contra la vibriosis seguido a la adición de la bacteria a las aguas de cultivo.

Por lo anterior y dado que algunos géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Bacillus*, son reconocidos como probióticos y que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza de forma ubicua y en organismos acuáticos, el presente estudio se orientó en el aislamiento y caracterización de cepas con potencial probiótico del intestino de

camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y de la glándula digestiva de *Crassostrea corteziensis* para evaluar su efecto protector *in vitro* ante *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, microorganismos reportados como patógenos que ocasionan grandes problemas de mortalidad en los diferentes organismos de cultivo, así como la evaluación *in vivo*, de las cepas probióticas seleccionadas, en el cultivo larvario del camarón blanco.

II. HIPÓTESIS.

Las cepas de bacterias aisladas del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei* y glándula digestiva del Ostión de placer *Crassostrea corteziensis* presentan actividad inhibitoria *in vitro* sobre *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* lo que favorecerá la supervivencia en cultivos larvarios del mismo organismo.

III. OBJETIVOS.

III.1. Objetivo general.

Determinar *in vitro* e *in vivo* las propiedades probióticas de bacterias aisladas del intestino de adultos de camarón blanco *L. vannamei* y glándula digestiva del Ostión de placer *Crassostrea corteziensis*.

III.2. Objetivos específicos.

1. Aislar y cultivar bacterias del intestino de adultos de *L. vannamei* y de la glándula digestiva del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* utilizando medios de cultivos selectivos.
2. Identificar las cepas probióticas que induzcan una mejor supervivencia larvaria en *L. vannamei*.
3. Determinar la actividad antagónica de las cepas aisladas contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.
4. Determinar la actividad hemolítica de las cepas seleccionadas del objetivo anterior.
5. Evaluar el efecto probiótico de las cepas seleccionadas en el cultivo larvario de *L. vannamei*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.1. Material Biológico

IV.1.1. Organismos

Para la obtención de las cepas bacterianas se utilizaron organismos adultos de *Litopenaeus vannamei* obtenidos de la empresa Acuacultores de la Paz (A.P.S.A.). Los reproductores de *Crassostrea corteziensis* se obtuvieron de la empresa Ostrícola Guevara S.A. y se mantuvieron hasta el momento de la extracción de los intestinos, en el Laboratorio de Larvicultura Experimental de Especies Marinas del CIBNOR (La Paz, B.C.S.), así como en la Unidad Experimental Kino, de la Universidad de Sonora (Bahía Kino, Sonora, México).

IV.2. Aislamiento bacteriano

De cada muestra de intestino se realizaron aislamientos bacterianos en agar Mann Rogosa y Sharp (agar MRS, DIFCO) y Agar Extracto de Levadura, Peptona, Dextrosa (agar YPD, DIFCO) mediante la utilización de la técnica de dilución seriada y extensión en superficie para aislar colonias de bacterias y levaduras. La incubación se realizó en jarras de anaerobiosis con el sistema GASPAC a 37°C por 24 h para bacterias anaeróbicas y bajo condiciones aeróbicas a 37°C por 24 h para bacterias aeróbicas y/o anaerobias facultativas.

Las colonias aisladas de los cultivos se observaron al microscopio mediante tinción Gram para observar la morfología de las colonias; se seleccionaron aquellas células con forma de bacilo que se resembraron en agar MRS utilizando la técnica de estría cruzada. Se incubaron bajo las mismas condiciones citadas anteriormente por un período de 24-48 h. Las cepas aisladas se transfirieron a caldo MRS y/o en caldo YPD con 15% de glicerol y se almacenaron a -85°C hasta el momento de su identificación y de su uso en los bioensayos.

IV.3. Actividad inhibitoria de las cepas aisladas

El efecto bactericida de cada cepa aislada se probó *in vitro* contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, usando el método de Dopazo *et al.* (1988), en el cual placas con agar soya triptica (AST) preparado con 3% de NaCl, fueron inoculadas puntualmente con 10 µl de un cultivo de 24 h de cada cepa bacteriana. Después de una incubación de 24 h a 37°C, las células

bacterianas se mataron con vapor de cloroformo durante 45 minutos. Las placas se recubrieron usando 6 mL de AST con 3% NaCl y 0.9% de agar, conteniendo 0.1 mL de una dilución 1/10 de un cultivo de 16 h de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Las placas fueron leídas a las 24 h de incubación a 37°C y cada cepa que mostró una zona de inhibición de al menos 5 mm se consideró con inhibición positiva para los patógenos probados.

IV.4. Identificación de las cepas candidatas a probióticos con la utilización del sistema BIOLOG

El Sistema BIOLOG en microplaca, es un método bioquímico automatizado que se emplea para la identificación de bacterias y levaduras, el cual tiene la capacidad de identificar alrededor de 1400 especies de bacterias aerobias, anaerobias y levaduras, presentando resultados que se interpretan y se registran automáticamente. El sistema comprende o incluye 95 pruebas bioquímicas que se utilizan para la identificación de las especies microbianas.

La especie identificada se exhibe en un monitor de la computadora junto con su patrón de la reacción, una lista de 10 especies con los patrones relacionados más cercanos y otra estadística útil. El software compensa automáticamente diversas intensidades de color/turbidez, eliminando la ambigüedad de la interpretación visual. Los resultados bioquímicos para el aislante en blanco se leen automáticamente y registran en segundos y después se comparan en una base de datos extensa para la identificación final (Tabla V. Anexos).

IV.5. Actividad citotóxica y tolerancia a la salinidad

Para determinar la actividad citotóxica de las cepas candidatas a probióticos se utilizó agar base sangre (DIFCO) al que se le adicionó 5% de sangre estéril defibrinada y 2.5% de Cloruro de Sodio (Koneman, 1985). Cada cepa bacteriana fue inoculada en cajas Petri preparadas con agar sangre y fueron incubadas a 37°C en condiciones anaerobias y aerobias de acuerdo a los requerimientos de cada bacteria. Los resultados fueron ordenados de acuerdo al patrón de hemólisis que se muestra en la tabla II.

Tabla II. Patrón de hemólisis bacteriana.

HEMÓLISIS	
Alfa (α)	Se deduce a partir de una zona parda a verdosa alrededor de las colonias
Beta (β)	Las bacterias sintetizan una hemolisina que origina una zona de lisis transparente alrededor de las mismas.
Gama (γ)	Algunas bacterias crecen en agar sangre sin producir ningún cambio en los glóbulos rojos. No hemólisis.
Sin crecimiento	Algunas especies bacterianas no son capaces de crecer en este medio enriquecido.

Para las pruebas de salinidad se utilizaron 10g de Triptona por cada litro de agua destilada adicionando 15% de agar y diferentes concentraciones de cloruro de sodio a probar 0%, 1%, 3%, 6%, 8% y 10% (Lightner, 1996).

IV.6. Cultivo bacteriano

Las cepas de prueba preservadas a -85°C fueron descongeladas y cultivadas en caldo YPD incubándolas a 37°C por 24 h. El cultivo se centrifugó a $5\ 000 \times g$ durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en una solución estéril de NaCl al 3%. Se determinó la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro, la cual se ajustó a 1.0 y se determinó su concentración bacteriana mediante conteo en placa con las condiciones de siembra descritas en la Sección IV.2. A partir de la concentración obtenida, se hicieron las diluciones requeridas para los bioensayos con las larvas de camarón.

IV.7. Preparación de cepas patógenas: *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*

Las cepas patógenas fueron obtenidas de la colección de Microorganismos de Importancia Acuática (C.A.I.M., siglas en ingles) pertenecientes al Centro de Investigación para la Nutrición y Desarrollo, Unidad Mazatlán para Acuicultura y Manejo Ambiental, las

cuales se almacenaron a -85°C en caldo de soya tripticasa (CST) con 3% de NaCl y 15% glicerol, hasta el momento de su utilización.

Para reactivar las cepas, se descongelaron y fueron cultivadas en CST con 3% de NaCl e incubadas a 37°C por 24 h. El cultivo se centrifugó a $5\ 000 \times g$ durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en una solución estéril de NaCl al 3%. Se determinó la densidad óptica y se ajustó a 1.0. Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes para el bioensayo con larvas. La densidad bacteriana en unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) se determinó mediante conteo en placa como en el Capítulo IV. 6.

IV.8 Efecto de las cepas aisladas en la supervivencia larvaria de *L. vannamei*

Los bioensayos se realizaron en las instalaciones del laboratorio comercial Acuacultores de La Paz, S.A. (APSA) ubicada en el Km. 10 de la carretera a Pichilingue en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México.

Los nauplios fueron mantenidos a $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en tanques con capacidad útil de 3L de agua de mar filtrada a $1\ \mu\text{m}$ y aireación constante con una densidad de siembra de 150 nauplios/L. Al momento de que los organismos se encontraron en el estadio de protozoa I, fueron alimentados con la microalga *Chaetoceros gracilis* manteniendo una concentración de 1.5×10^5 células/mL. Se realizaron recambios de agua del 50% antes de cada alimentación. Se realizó un bioensayo de 11 días con aquellas cepas bacterianas previamente seleccionadas *in vitro*. Las cuatro tratamientos fueron adicionados a una concentración de 10^5 UFC/mL cada 24 horas, después de realizado el recambio de agua. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Para observar el efecto de inclusión de las cepas probióticas, se realizó un segundo bioensayo colocando nauplios sanos (150 nauplios/L) en tanques de cultivo de 3 L con agua de mar filtrada ($1\ \mu\text{m}$). Cada una de las dos cepas seleccionadas se probaron en concentraciones de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 UFC/mL y con nauplios no tratados como control. Como tratamiento adicional se utilizó el antibiótico oxitetraciclina a una concentración de 4 ppm, adicionando la dosis después de cada recambio, así como dos mezclas de ambas cepas

bacterianas para obtener dos concentraciones, teniéndose que para la mezcla 1 se utilizaron las dos cepas a una concentración de 10^4 UFC/mL y para la mezcla 2 a una concentración de 10^5 UFC/mL. Se reinocularon dosis de bacterias diariamente después de los recambios de agua. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado y tuvieron una duración entre 8-11 días hasta el estadio postlarva 1. La supervivencia se determinó haciendo 3 conteos de larvas en un volumen de 50 mL y el promedio se extrapolo para obtener el número total de larvas en el recipiente; para el crecimiento de las larvas se utilizó una muestra representativa de 10 organismos y éstos fueron observados con un microscopio estereoscópico (10x).

IV.9. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos durante la realización de todos los bioensayos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y en caso de existir diferencias significativas ($p < 0.05$), se hizo una comparación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey.

V. RESULTADOS.

V.1. Aislamiento bacteriano

Se aislaron 44 cepas bacterianas del tracto digestivo de organismos adultos de camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* así como de ostión de plazer *Crassostrea corteziensis*. Fueron cultivadas en medio MRS (Mann Rogosa y Sharp) y YPD (1% Extracto de levadura, 2% Peptona y 2% dextrosa) tanto en ambientes anaeróbicos como aeróbicos y se catalogaron de acuerdo al medio de cultivo en que fueron aislados y al origen del organismo.

V.2. Pruebas de inhibición

De las 44 cepas bacterianas aisladas, 16 cepas codificadas como YO-I-1-1, YO-I-2-1, YC5-2, YC5-8, YC5-5, YC5-1, Y10²-1, Y10⁴-1, YC5-7, MC5-14, MC5-18, MC5-19, MC4-1-2, MO221, MO4-3 y MC5-15, presentaron efecto inhibitorio a las bacterias patógenas *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* mostrando zonas de inhibición bien definidas (Figura 2).

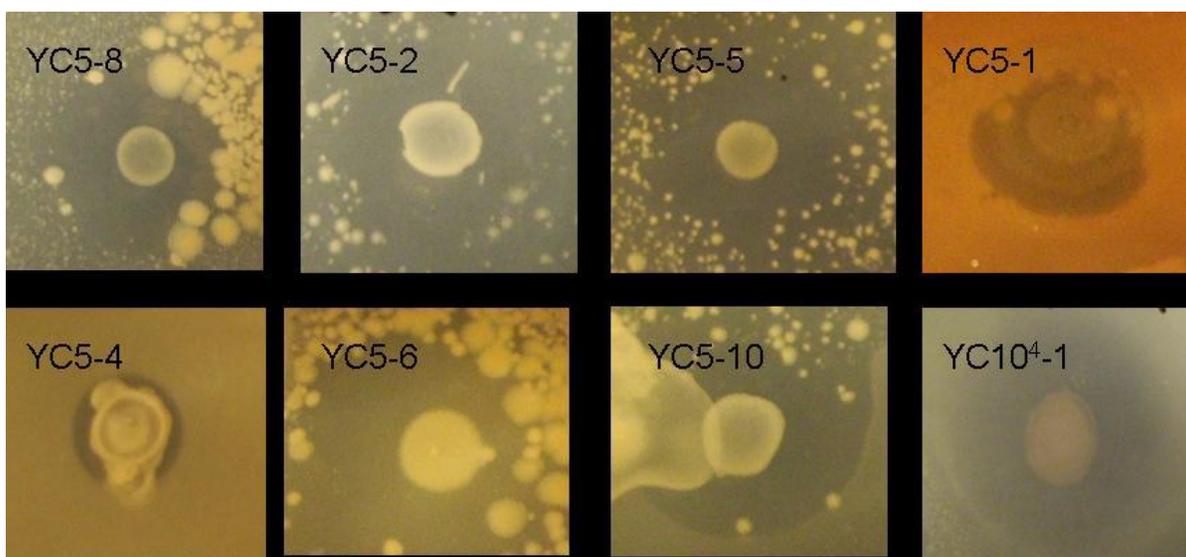


Figura 2. Halos de inhibición utilizando el método de Dopazo *et al.*, (1988).

V.3. Morfología colonial

A las 16 cepas que resultaron positivas en las pruebas de inhibición se les realizó un análisis morfológico de las colonias bacterianas para determinar forma, elevación, margen, coloración y tamaño a las 24 y/o 48 horas de incubación como primera identificación. De igual forma se determinó mediante tinción gram su morfología celular a partir de cultivos de 18-24 h (Tabla III).

Tabla III. Morfología colonial de cepas bacterianas aisladas de organismos adultos de camarón blanco *L. vannamei* y del ostión *C. corteziensis*.

Cepa (GRAM)	Origen	Forma Celular	Forma	Elevación	Margen	Coloración	Tamaño mm
YO-I-1-1 (-)	Ostión	Bacilos	Irregular	Convexa	Ondulado	Café	2 (24 Hr)
YC5-7 (+)	Camarón	Cocos	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	2 (48 Hr)
YO-I-2-1 (-)	Ostión	Bacilos	Irregular	Convexa	Ondulado	Café-Cremoso	2.5 (24 Hr)
YC5-2 (-)	Camarón	Cocobacilo	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	2 (48 Hr)
YC5-8 (-)	Camarón	Cocobacilo	Irregular	Umbilicada	Ondulado	Amarillo-Cremoso	2.5 (24 Hr)
YC5-5 (-)	Camarón	Bacilos	Circular	Convexa	Entero	Amarillo Claro	2 (48 Hr)
YC5-1 (-)	Camarón	Bacilos	Irregular	Umbeliforme	Lobulado	Amarillo-Cremoso	10 (24 Hr)
MC5-18 (-)	Camarón	Bacilos	Irregular	Monticular	Ondulado	Café-Anaranjado	
MC5-19 (-)	Camarón	Cocobacilo	Irregular	Monticular	Ondulado	Blanca	10 (24 Hr)
MC4-1-2 (+)	Camarón	Cocos	Circular	Convexa	Entero	Crema	2 (24 Hr)
MO221 (+)	Ostión	Diplococos	Circular	Convexa	Entero	Cremoso	2 (24 Hr)
MC5-14 (-)	Camarón	Cocobacilo	Irregular	Monticular	Ondulado	Blanca Seca	10 (24 Hr)
Y10 ² -1 (-)	Camarón	Bacilos	Circular	Convexa	Entero	Crema	1 (24 Hr)
Y10 ⁴ -1 (-)	Camarón	Bacilos					
MO4-3 (-)	Ostión	Cocos	Circular	Umbonada	Entero	Cremoso	1 (24 Hr)
MC5-15 (+)	Camarón	Bacilos	Irregular	Umbeliforme /Umbilicada	Ondulado	Blanca	10 (48 Hr)

V.4. Selección de cepas bacterianas

En el proceso de selección se descartaron aquellas cepas que presentaron halos de inhibición menores a 5 mm de diámetro (Luna-González *et al.*, 2001) y características citotóxicas severas como es presentar mayor cantidad de hemolisinas que afecten a las células, así como poca tolerancia a salinidad, quedando como resultado la selección de 3 cepas aisladas de camarón: YPD10-4, YC5-1 y YC5-8 y 1 cepa de ostión (YO-I-2-1). En la tabla IV, se muestra el diámetro de los halos de inhibición así como el tipo de hemólisis que presentaron las cepas seleccionadas. De estas, las cepas YC5-8 y YO-I-2-1 fueron las que presentaron mayor inhibición contra *V. alginolyticus*, mientras que YPD10-4 y YO-I-2-1 lo fueron contra *V. parahaemolyticus* (Tabla IV). Con respecto a la actividad citotóxica YC5-1 y YPD10-4 fueron las que presentaron mayor cantidad de hemolisinas (Tabla IV).

Tabla IV. Diámetro de los halos de inhibición y tipo de hemólisis de las cepas candidatas a probióticos.

Cepa	Diámetro de halos (cm)		Salinidad (%)						Hemólisis	Anaerobio
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	0	1	3	6	8	10		
YO-I-2-1	1.3	1.9	+	+	+	+			α (alfa)	Facultativo
YC5-1	1	0.9	+	+	+	+	+	+	β (beta)	Facultativo
YC5-8	2.1	0.9	+	+	+	+			No creció	Facultativo
YPD10-4	0.55	2	+	+	+				β (beta)	Facultativo

V.5. Efecto de las cepas seleccionadas en la supervivencia larval

Nauplios de *L. vannamei* fueron cultivados con una suspensión bacteriana de las cepas seleccionadas a una concentración de 10^5 UFC/mL durante todo el cultivo larvario, con organismos no tratados como control. Al momento de tener los organismos en estadio zoea I fueron alimentados con la microalga *Chaetoceros gracilis* a una concentración de 1×10^5 cél/mL así como con nauplios de *Artemia* sp. precocidos cuando alcanzaron el estadio mysis I, dando por concluido el bioensayo al momento de llegar al estadio de postlarvas.

En la figura 3 se observa la supervivencia larval de los organismos cultivados con los inóculos bacterianos. En esta se observó que los organismos tratados con la bacteria YO-I-2-1

presentaron un 30.35% de supervivencia, mientras que las larvas de camarón tratadas con las bacterias YC5-8 y YPD10-4 alcanzaron niveles de 20.32 y 27.8%, respectivamente. En cuanto al control y al tratamiento con la cepa YC5-1 se obtuvo supervivencias muy parecidas que fueron de 8.94 y 8.14%, respectivamente. Aunque las larvas tratadas con la cepa YPD10-4 tuvieron una buena supervivencia del 18.86% mas que el control, no se les consideró para ser utilizadas en los siguientes bioensayos debido a que las larvas de camarón presentaron algunas deformidades morfológicas, presumiblemente ocasionadas por el inóculo bacteriano.

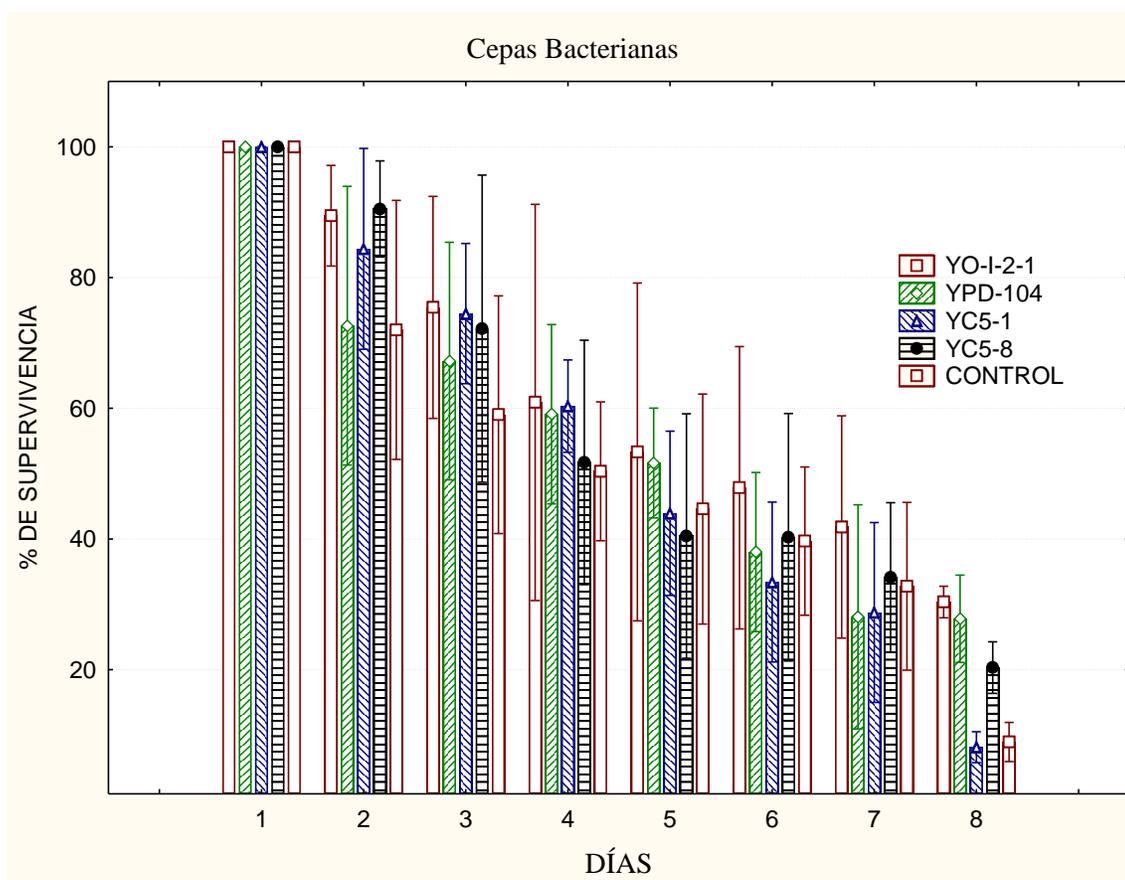


Figura 3. Supervivencia larvaria de *Litopenaeus vannamei* expuestos a 4 tratamientos (YO-I-2-1 (◻), YPD10⁴ (◊), YC5-1 (Δ), YC5-8 (◌) y control (◼)) a una concentración de 10⁵ UFC/mL.

El análisis de varianza (Tabla VI, Anexos) aplicado a los porcentajes de supervivencia convertidos a arcoseno indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). De

igual forma la prueba de rangos múltiples de Tuckey indicó diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos YO-I-2-1, YC5-8 y YPD10-4 respecto al control, mientras que los organismos tratados con la cepa YC5-1 se obtuvo un comportamiento similar al control ($p > 0.05$), por lo que no se le consideró para los bioensayos (Tabla VII, Anexos).

V.6.Efecto de la concentración de las cepas bacterianas en la supervivencia larvaria

Una vez seleccionadas las cepas YO-I-2-1 y YC5-8 del bioensayo anterior, se decidió utilizar tres diferentes concentraciones de ambas cepas para seleccionar aquella que mostrara mejoras en la supervivencia larvaria. Para esto, se cultivaron nauplios de *L. vannamei* exponiéndolos a 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC/mL cuyos resultados para cada uno de ellos se muestran a continuación.

Al final del bioensayo con la cepa YO-I-2-1 se obtuvieron porcentajes de supervivencia de 44.44, 18.59, 38.68 y 22.28% para las tres concentraciones probadas y el control, respectivamente (Figura 4).

En lo que respecta a la cepa YC5-8, al final del bioensayo se presentaron porcentajes de supervivencia de 32.63, 48.93, 40.90 y 22.28% para las tres concentraciones y el control, respectivamente (Figura 5).

Como bioensayo adicional, se mezclaron ambas cepas bacterianas para obtener dos concentraciones, teniéndose que en la mezcla 1 (MEZ 1) se utilizaron ambas cepas a una concentración de 10^4 UFC/mL y para la mezcla 2 (MEZ 2) a una concentración de 10^5 UFC/mL. El tercer tratamiento consistió en exponer a los organismos al antibiótico oxitetraciclina a una concentración de 4 mg/L y el control, dando los siguientes resultados en porcentaje de supervivencia final: 49.10, 50.15, 41.03 y 22.28%, respectivamente (Figura 6).

El análisis de varianza (Tabla VIII, Anexos) aplicado a los porcentajes de supervivencia convertidos a arcoseno indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). De igual forma la prueba de rangos múltiples de Tukey evidenció diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos MEZ 1, MEZ 2 y YC5-8 concentración 10^5 UFC/mL, con respecto al control, más no una diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla IX, Anexos).

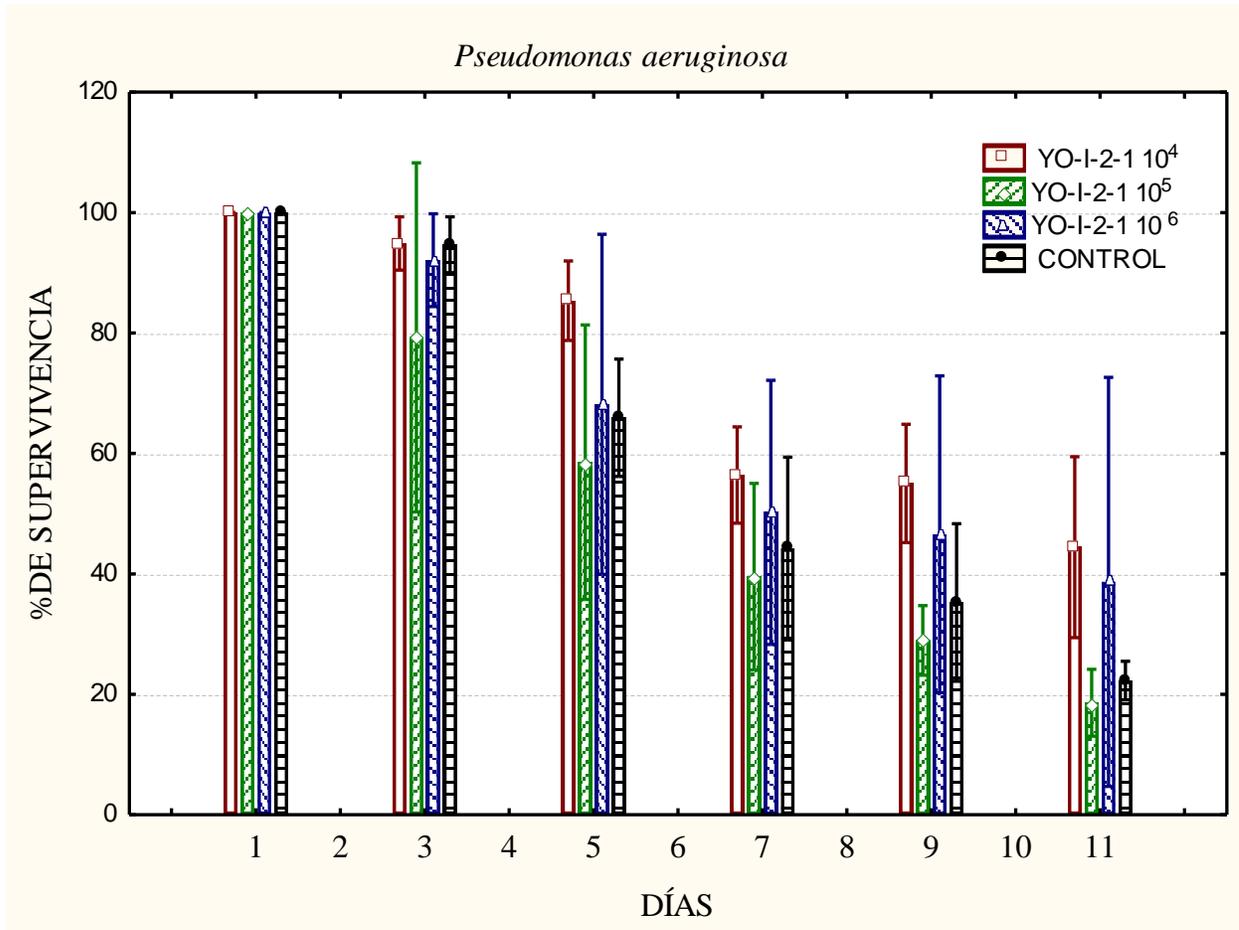


Figura 4. Supervivencia larvaria de *Litopenaeus vannamei* expuestos a la bacteria YO-I-2-1 a diferentes concentraciones (10^4 (□), 10^5 (◇) y 10^6 (Δ) UFC/mL y control (○)).

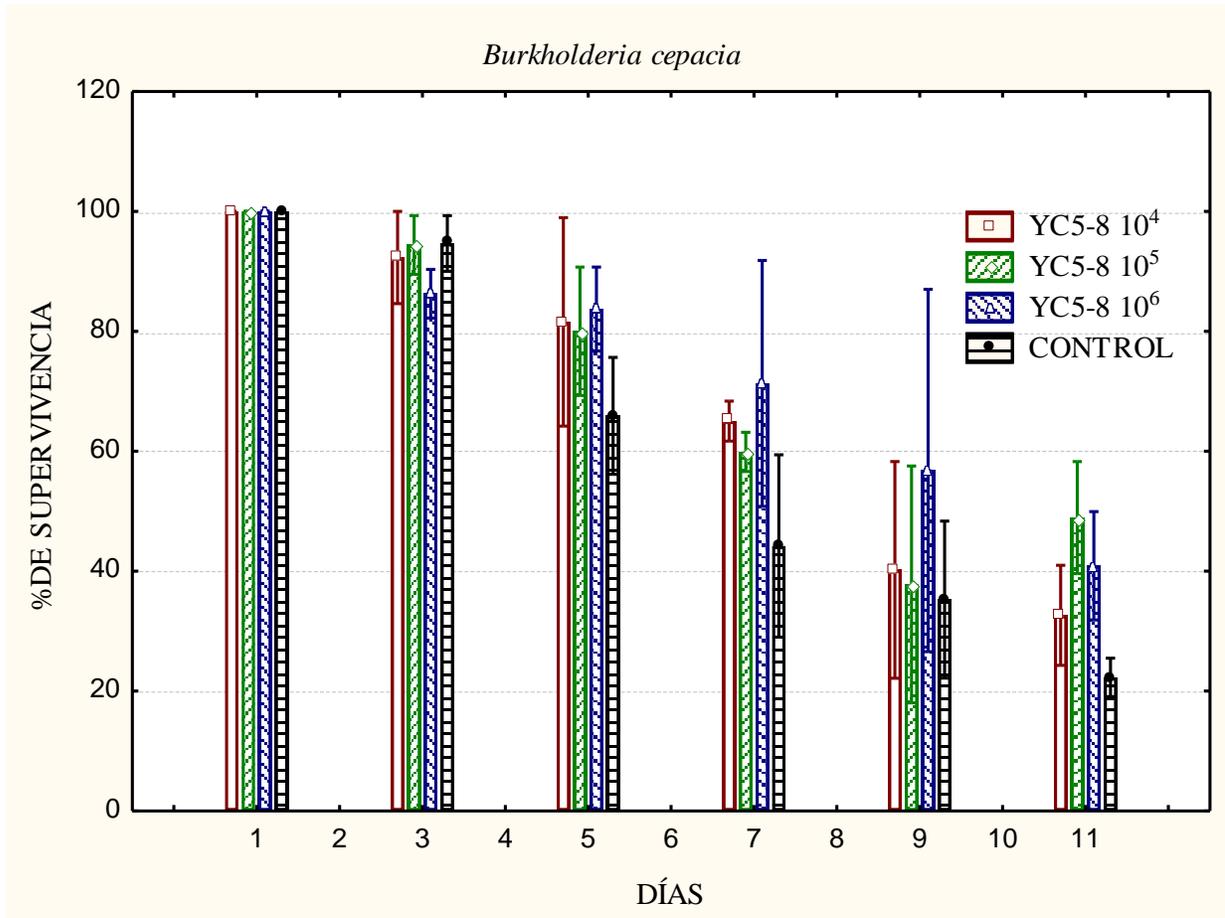


Figura 5. Supervivencia larvaria de *Litopenaeus vannamei* expuestos a la cepas YC5-8 a diferentes concentraciones (10^4 (□), 10^5 (◇) y 10^6 (Δ) UFC/mL y control (○)).

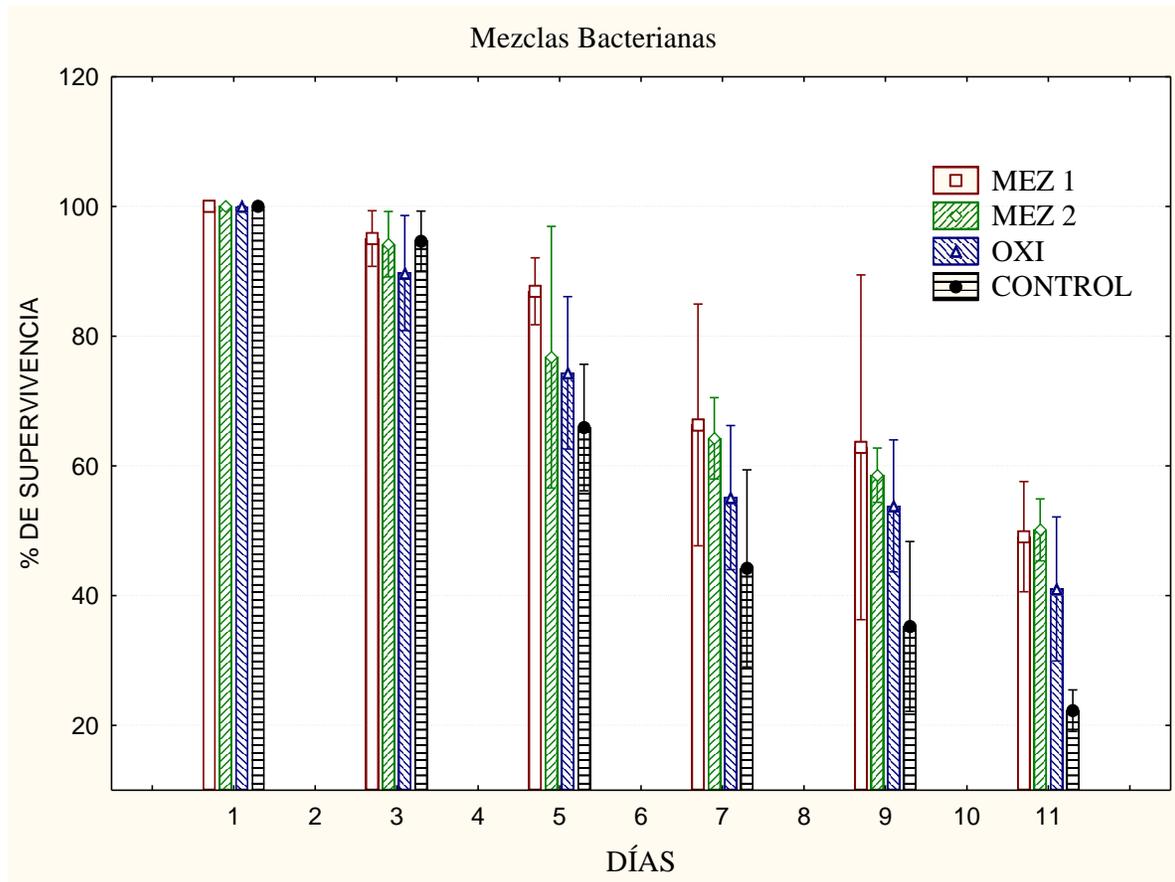


Figura 6. Supervivencia larval de *Litopenaeus vannamei* expuestos a dos mezclas bacterianas y tres concentraciones diferentes (mezcla 1(□): YO-I-2-1 y YC5-8 a una concentración de 10^4 UFC/ml, mezcla 2 (◇): YO-I-2-1y YC5-8 a una concentración de 10^5 UFC/mL), y un tratamiento con oxitetraciclina (Δ) así como el control (○).

V.7. Identificación de cepas probióticas

La identificación en el sistema BIOLOG se realiza por medio de reacciones bioquímicas con 95 diferentes pruebas y los resultados se interpretan y registran automáticamente. Como resultado de la identificación se obtuvo que la cepa catalogada con la clave YO-I-2-1 pertenece al género *Pseudomonas* y a la especie, *aeruginosa* con una aproximación del 100% (Figura 7).

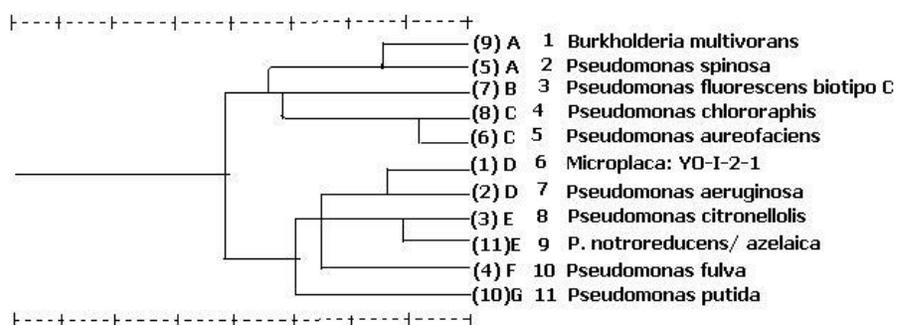


Figura 7. Dendrograma que muestra las distancias filogenéticas y la similitud de la cepa seleccionada YO-I-2-1 aislada de camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* con especies bacterianas.

En lo que respecta a la cepa YC5-8 los datos sugieren una similitud a *Burkholderia cepacia* (Figura 8).

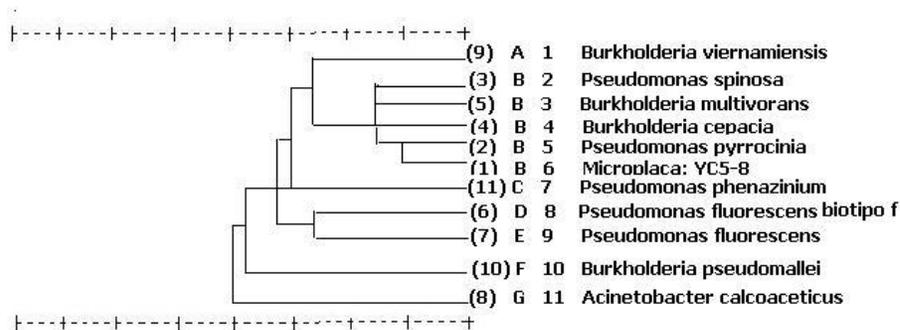


Figura 8. Dendrograma que muestra las distancias filogenéticas y la similitud de la cepa seleccionada YC5-8 aislada de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* con especies bacterianas.

En la figura 9 y 10 se muestra la tabla de resultados que presenta la base de datos del sistema BIOLOG para la identificación, donde se muestra las reacciones positivas o negativas para cada fuente de carbono probada.

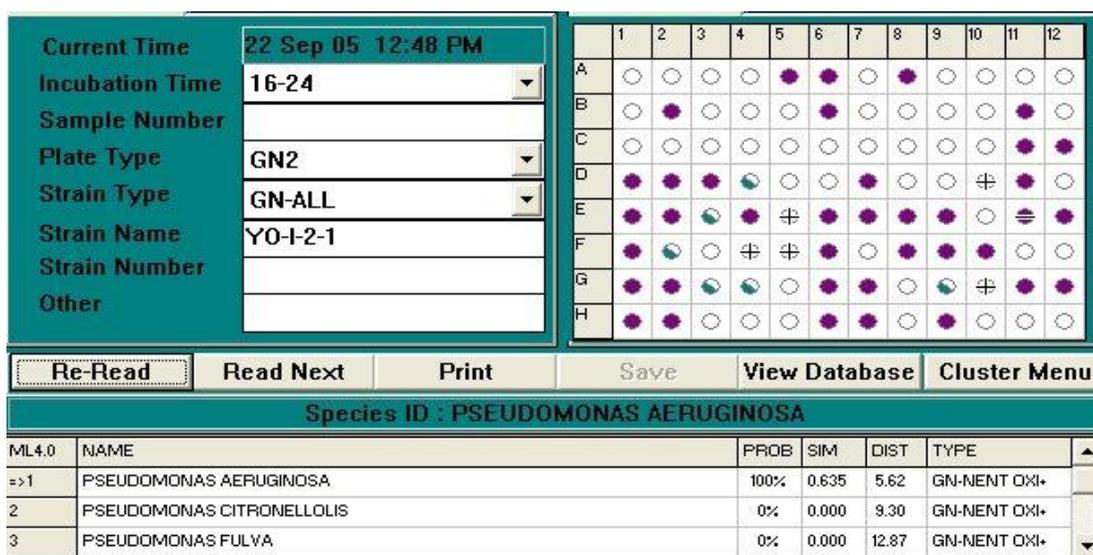


Figura 9. Microplaca ilustrada con los resultados de las reacciones bioquímicas de cada una de las fuentes de carbono para la identificación de la cepa catalogada como YO-I-2-1.



Figura 10. Microplaca ilustrada con los resultados de las reacciones bioquímicas de cada una de las fuentes de carbono para la identificación de la cepa catalogada como YC5-8.

VI. DISCUSIÓN.

Las ventajas de los probióticos sobre los antibióticos fue discutido por Moriarty (1998), el cual enfatizó los beneficios de los probióticos y sus mecanismos de acción como son exclusión competitiva, competencia por nutrientes, secreción de enzimas y/o sustancias inhibitorias presentando como ejemplo el género *Bacillus*.

El proceso en la selección de cepas con capacidad probiótica, requiere de aislar y caracterizar los microorganismos presentes en el intestino de camarones adultos de *Litopenaeus vannamei* y la glándula digestiva de *Crassostrea corteziensis*, considerando que los mismos estarán adaptados a crecer y multiplicarse en este órgano. Por ello un total de 44 cepas bacterianas fueron aisladas y seleccionadas para las pruebas de inhibición *in Vitro*. De éstas, 2 cepas catalogadas como YO-I-2-1 y YC5-8 demostraron tener una respuesta positiva contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Estas cepas fueron identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (YO-I-2-1), y en lo que respecta a la cepa YC5-8 los datos sugirieron una similitud entre ésta y *Burkholderia cepacia*. El antagonismo ensayado entre cepas de bacterias marinas y cepas referenciales de patógenos marinos Gram negativos, ha sido considerado de interés en acuicultura como una alternativa para el uso de antibióticos por Lemos *et al.*, (1985); Dopazo *et al.* (1988); Westerdahl *et al.* (1991) y Riquelme *et al.*, (1996, 1997). En esta investigación las bacterias aisladas seleccionadas fueron expuestas a las cepas patógenas de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, obteniendo una respuesta positiva entre los linajes con características probióticas y cepas patógenas, por lo que el presente trabajo sugiere resultados similares a los obtenidos por dichos autores. En consecuencia, la observación de una marcada inhibición sobre el crecimiento de vibrios patógenos es evidente tratándose además de cepas probióticas aisladas de organismos adultos, los cuales pueden ser hospederos potenciales de patógenos, como es el caso de *L. vannamei* y *C. corteziensis*.

La susceptibilidad de camarones y moluscos a bacterias patógenas es bien conocida, trabajos publicados determinan que la sensibilidad a patógenos varía de acuerdo a la especie y a la concentración del inóculo. Tal es el caso de Luna-Gonzalez *et al.*(2002), quien expone la susceptibilidad de 4 especies diferentes de moluscos bivalvos como lo son *Atrina maura*,

Nodipecten subnodosus, *Crassostrea gigas* y *Argopecten ventricosus*, siendo la más susceptible esta última a la cepa patógena *Vibrio alginolyticus* APSA 2 y la más resistente *C. gigas*. Así mismo Gibson *et al.* (1998), observó una alta sensibilidad por parte de *C. gigas* a la bacteria patógena *Vibrio tubiashii* aun con la presencia del linaje A199 candidato a probiótico compuesto de *Aeromonas media*.

Durante el primer bioensayo se descartaron las cepas YPD10-4 y YC5-1 las cuales presentaron niveles de sobrevivencia del 27.8 y 8.14% respectivamente, además que durante las pruebas preliminares de citotoxicidad presentaron una hemólisis de tipo β la cual se caracterizó por presentar hemolisinas que ocasionan daño a los hemocitos (Koneman, 1985), lo que ocasionó datos de baja supervivencia y deformidades observadas en las larvas.

A lo largo de los años se han estudiado las relaciones simbióticas de mezclas bacterianas y el beneficio que brinda a los organismos hospederos, pero tales estudios han sido limitados en organismos invertebrados. Debido a esto, se realizó un bioensayo donde las cepas previamente seleccionadas, YO-I-2-1 y YC5-8, fueron inoculadas en cultivos larvarios de *L. vannamei* a una concentración de 10^4 , 10^5 , 10^6 UFC/mL y un tratamiento de oxitetraciclina. Estas concentraciones utilizadas fueron seleccionadas en base a la bibliografía la cual expone que inóculos bacterianos patógenos puede reflejar daños a una concentración de 10^4 UFC/mL en organismos en cultivo (Latchford y Prayitno, 1995; Moriarty, 1998; Moriarty, 1999) al igual que una concentración igual o mayor de 10^6 UFC/mL puede ocasionar altos porcentajes de mortalidad en poblaciones cultivadas (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2001; Yen-Ling *et al.*, 1993; Verschuere *et al.*, 2000), así mismo dosis de 10^5 UFC/mL son consideradas como dosis letal media (LD50) para camarones pertenecientes a el género *Litopenaeus* (Vaseeharan y Ramasamy, 2003; Burnett, 2004).

Los mejores porcentajes de supervivencia larval fueron obtenidos en los tratamientos de mezclas bacterianas ($P < 0.05$), en comparación con los otros tratamientos incluyendo el control y la oxitetraciclina, estos valores se pueden atribuir a una complementación para maximizar el efecto positivo en los organismos en cultivo (Iriarte y Austin, 2002a).

Así mismo, la utilización de mezclas bacterianas ha sido estudiada en diversos trabajos observando los mejores resultados con la utilización de cultivos mixtos de bacterias,

Iriarto y Austin, (2002a) reportan que cultivos de *A. hydrophila* y *V. fluvialis* fueron efectivos para controlar infecciones ocasionadas por *A. salmonicida* en trucha arco iris. De igual forma, Ruiz-Ponte *et al.*, (1999) encontraron que *Roseobacter* en un cultivo mixto con *V. anguillarum*, fue inhibitorio para vibrios, incrementando la supervivencia larval de la escalopa *Pecten maximus*. Gatesoupe, (1991) reportó el beneficio del uso de *Lactobacillus platarum* y *Lactobacillus helveticus* en el pez *Scophthalmus maximus* logrando una mejora en el crecimiento.

Resultados similares fueron obtenidos por Hirata *et al.*, 1998, quienes probaron una mezcla bacteriana que consistía principalmente de *Bacillus* spp. para incrementar la calidad de *Brachionus plicatilis*. Así como Balcazar (2003), quien demostró que la administración de una mezcla bacteriana a base de *Bacillus* y *Vibrios* sp. influyó positivamente en el crecimiento y supervivencia de juveniles de camarón blanco, a la vez que presentó un efecto protector contra *Vibrio harveyi* y WSSV.

Los resultados con el tratamiento de oxitetraciclina fueron de 41.03%, por encima del control pero no mejor que las mezclas, este antibiótico ha producido cepas resistentes debido a que no presenta un amplio espectro de inhibición. Tendencia y de la Peña, (2001), demostraron en un estudio con antibióticos que se presentó una alta resistencia por parte de las bacterias *Aeromonas* sp., *V. vulnificus*, *V. mimicus* y otras bacterias gram-negativas. De igual forma, Abraham *et al.* (1997), analizaron el mecanismo de resistencia bacteriana de *V. harveyi* aislado de camarones enfermos, encontrando que esta cepa fue resistente a los antibióticos ampicilina, clorotetraciclina, cefproflaxina, eritromicina, furazolidona, sulfametoxazol, gentamicina, neomicina, nitrofurantoína, oxitetraciclina y otros compuestos antimicrobianos.

Debido a la incidencia frecuente del género *Pseudomonas* en ambientes marinos y principalmente en las áreas de producción ya sea a nivel laboratorio o engorda se le ha reconocido como un microorganismo patógeno para larvas de camarón (Chythanya *et al.*, 2002), y moluscos bivalvos (Riquelme *et al.*, 2001)

En el presente trabajo se observó la disminución de patogenicidad en ambas cepas bacterianas, obteniéndose una mejora en términos de supervivencia en comparación con el control. Resultados similares fueron obtenidos por Chythanya *et al.* (2002) y Vijayan *et al.*

(2006), quienes observaron la ausencia de patogenicidad por parte de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* logrando un incremento en la supervivencia y crecimiento en otras especies de cultivo como son *Penaeus monodon* y *Macrobrachium rosenbergii*. De igual forma Riquelme *et al.* 2001, utilizó un linaje de *Pseudomonas* sp 11 en larvas de *Argopecten purpuratus* mostrando efectos protectores a las larvas de enfermedades. En otra investigación que realizó el mismo autor utilizando la misma cepa observó efectos antagónicos contra *V. anguillarum* (Riquelme *et al.*, 1997).

Miembros de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* son habitantes comunes de suelos, agua dulce y ambientes marinos, y son reconocidos por producir un gran número de metabolitos secundarios que inhiben a una amplia variedad de bacterias patógenas; tales sustancias antagónicas pueden ser antibióticos de amplio espectro (Saadoun *et al.*, 1999), productos del metabolismo como ácidos orgánicos (Lavermicocca *et al.*, 2000; Lavermicocca *et al.*, 2003), moléculas quelantes de hierro (sideróforos) (Mirleau *et al.*, 2000) y bacteriocinas (Tagg *et al.*, 1976).

Por otro lado la bacteria *Burkholderia cepacia* no es reconocida como probiótico, pero debido a sus características como lo son el ser un microorganismo con capacidad endofítica con ciertas plantas como lo es *Mimosa pudica* que le proporciona una mejora en el crecimiento debido a la secreción de fitohormonas, deaminasas, fosfatos solubles, etc., la convierte en un excelente antagónico contra fitopatógenos (Piyush *et al.*, 2005). Aunado a esto, produce sideróforos (moléculas quelantes de Hierro) que al igual que *Pseudomonas* representa una forma muy sutil de exclusión competitiva con otras bacterias, así como es un buen bioremediador pues tiene la capacidad de fijar el nitrógeno libre y convertirlo en compuestos más fáciles de degradar (MacFaddin, 2003). Numerosos son los trabajos que enlistan la producción de sustancias bacteriostáticas y siderofóricas por bacterias del género *Pseudomonas* (Gram, 1993, 1999; Smith & Davey 1993; McCarthy *et al.*, 1994; Frey *et al.*, 1996; Gatesoupe, 1997; Bly *et al.*, 1997; Lodeiros *et al.*, 1998; Chythanya *et al.*, 2002) y los beneficios que aportan, ya sea una o otra, ambas cepas representan un excelente candidato a probiótico.

El riesgo de seleccionar patógenos probiótico-resistentes no debe ser menospreciado, y esto es de particular importancia para buscar propiedades antagónicas diversificadas, en los cuales el riesgo de multiresistencia, es bajo (Gatesoupe, 1999). Para el género *Pseudomonas*, esto no representa un problema debido a sus propiedades antibacterianas de amplio espectro, así como a su amplia resistencia a condiciones físico-químicas como son temperatura y salinidad (Vijayan *et al.*, 2006).

Los resultados de este estudio establecieron que ambas cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*), ya sea en forma individual o en mezcla, presentaron un mejoramiento en la supervivencia larval de *L. vannamei* siendo excelentes candidatas a probióticos. Así mismo, este trabajo representa un aporte a las investigaciones recientes sobre bacterias marinas productoras de sustancias inhibitorias y su posible aplicación en acuicultura intensiva. En este sentido, queda abierta la posibilidad de que las cepas seleccionadas sean evaluadas en el control de patógenos que afectan a cultivos intensivos de invertebrados como de larvas de *Litopenaeus vannamei* y *Crassostrea corteziensis*.

VII. CONCLUSIONES.

Tomado en consideración los resultados obtenidos se concluye:

1. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante el sistema BIOLOG como *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*).
2. La inoculación de la cepa *Burkholderia cepacia* a una concentración 10^5 UFC/mL, mejoró la supervivencia larval de *L. vannamei* en comparación con las otras concentraciones de la misma cepa y la otra cepa bacteriana probada.
3. Las larvas tratadas con las mezclas de ambas cepas bacterianas a las concentraciones de 10^4 UFC/mL y 10^5 UFC/mL, fueron los mejores tratamientos para mejorar la supervivencia de *L. vannamei*.
4. Las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*, inoculadas ya sea en forma individual o combinadas, mejoran la supervivencia larval de *L. vannamei* en comparación con el control.
- 5.- *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) son candidatas potenciales para ser usadas como probióticos en el cultivo larvario de camarón.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar más pruebas reto *in vivo* para determinar el efecto inhibitorio y mejora en la supervivencia larval de *Litopenaeus vannamei*.
2. Hacer pruebas con el extracto libre de células bacterianas para determinar que tipo de sustancias inhibitorias son las que actúan.
3. Realizar otros bioensayos con otros organismos de cultivo para observar si el efecto probiótico se extiende mas allá del uso en *Litopenaeus vannamei* y *Crassostrea corteziensis*.
4. Efectuar una identificación a nivel molecular de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* identificadas bioquímicamente con el sistema BIOLOG, para determinar con mayor exactitud la especie aislada.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Abraham T. J., Palaniappan, R., Dhevendaran, K., 1997. Epibiotic infestation of luminous bacteria in penaeid shrimp *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) larvae. *Indian J. Mar. Sci.* 26: 209-211.
- Abraham T. y Palaniappan R. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture* 232: 81-90.
- Aguirre-Guzmán, G. y Ascencio-Valle, F. (2001). Infectious diseases in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Research of Developmental Microbiology* 4: 333-348.
- Aguirre-Guzman, G. 1993. Aplicación de probióticos en Acuicultura. En: Cruz, S. E., Ricque, M.D. y Mendoza, A.R. (Eds). *Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*. Universidad Autónoma de Nuevo León. 312-328 pp.
- Araya R. A., Jonquera M.A. y Riquelme C. E. (1999). Association of bacteria to the life cycle of *Argopecten purpuratus*. *Revista Chilena de Historia Natural* 72, 261-271.
- Balcazar, J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. CIVA 2002. (<http://www.civa2002.org>), 877-881.
- Balcazar, J.L., 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.
- Bly, J. E., Quiniou S. M.-A., Lawson J. A. y Clem L. W. 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases* 20: 35-40.
- Bruno, M. E.C., y Montville, J.T., 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3003-3010.
- Burnett, K. G., Burgents J. E. y Burnett L. E. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture* 231:1-8.
- Chythanya R., Karunasagar I. y Karunasagar D. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208:1-10.
- De Silva, S.S. 2000. A global perspective of aquaculture in the third millennium. 51-100. En: *Conference on Aquaculture in the Third Millennium*. Network of Aquaculture Centres

- in Asia Pacific and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Bangkok, Thailand. February 2000.
- De Weert, S., Vermeiren H., Mulders I. H., Kuiper I., Herdriekx N., Bloemberg G. V., vanderleyden J., De Mot R., y. Lugtenberg B.J.2002. Flegella-driven chemotaxis toward exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 1173-1180.
- Dopazo, C., Lemos M., Lodeiros C., Barja J. y A. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 97-101.
- Frey, P., Smith, J.I., Albar, L., Prior, P., Saddler, G.S., Trigalet-Demery, D. y Trigalet, A.1996. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) sclannacearum* race I of the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 473-479.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Lebbadi, M. y Valdivia, E., 1993. Isolation and physicochemical characterization o fan antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 438-442.
- Garriques, D. y Arevalo G.. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. 53-59 pp. En: C. L. Browdy and J.S. Hopkins (eds.), *Swimming through troubled water. Porceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.
- Gatesoupe, F.J. 1991. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. Associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10: 239-246.
- Gatesoupe, F.J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10, 239-246.
- Gatesoupe, F.J. 1999. Review/ The use of probiotics un aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.

- Gram, L. 1993. Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2197-2203.
- Gram L., Melchiorson J., Spanggard B., Huber I. y Nielsen T.F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 969-973.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. y Turnbull, J.F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191: 259-270.
- Guerinot, M.L. 1994. Microbial iron transport. En: *Annual Review of Microbiology*. Vol. 48, L.N. Ornston, A. Ballows and E.P. Greenberg (eds), pp. 438-442. Annual Reviews. Inc., CA.
- Himabindu K. V., Narottam P. S. y Kamal, K. J. 2004. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35:501-507.
- Hirata H., Murata O., Yamada S., Ishitani, H. y Wachi, M.1998. Probiotic culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Hidrobiologia*. 387/388: 495-498.
- Holzappel, W.H., Haberer, J. S. Schillinger U. y Huis in 't Veld J.. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41:85-101.
- Iriarto A. y Austin B.. 2002a. Probiotics in Aquaculture. *Journal of Fish Diseases*. 25: 633-642.
- Jack, R. W., Tagg J.R., y Ray B.. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 59:171-200.
- Jory, D. E. 1998. Use of probiotics in Penaeid shrimp growout. *Aquaculture Magazine*, 24(1): 62-67.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*. 70: 337-349.
- Koneman E. W. 1985. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. México D. F. 533 pp.
- Latchford J. W. y Prayitno S. B. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132: 105-112.

- Lavermicocca, P., Valerio F., Evidente A., Lazaron S., Corsetti A. y Gobetti M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4084-4090.
- Lavermicocca, P., Valerio F. y Visconti, A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 634-640.
- Lemos, M., Toranzo A. y Barja, J. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal sea-weeds. *Microb. Ecol.* 11: 149-163.
- Lilly y Stilwell, 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Scien.* 213-233.
- Lightner D. V. 1996. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. The World Aquaculture society. Louisiana State University.
- Lodeiros, C., Fernandez, E., Velez, A. y Bastardo, J. 1998. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. *Boletín Instituto Oceanográfico* 27, 63-69.
- Luna-González, A., Maeda-Martínez A., Ascencio-Valle F. y Robles-Mungaray M. 2001. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Hydrolytic enzymes of Crassostrea gigas*. México.
- Luna-González A., Maeda-Martínez A. y Ascencio-Valle F. 2002. Comparative susceptibility of véliger larvae of tour bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Diseases of aquatic organisms.* 49:221-226.
- MacFaddin J. F. 2003. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana. México D.F. 850 pp.
- Maeda, M. y Liao, I.C. 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larvae, *Penaeus monodon*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.* 21: 25-29.
- Maeda, M. 2002. Microbial communities and their use in aquaculture. En: Cheng-Sheng, L., O'Bryen, B. (Eds). *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture production Systems*. World Aquaculture Society. Baton Rouge. 119-129 pp.
- Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M. y Hirayama, K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia* 358: 285-290.

- Martinez Cordova L.R. 2002. Camaronicultura: Avances y tendencias. AGT Editor, S.A. Mexico D.F. 167 pp.
- McCarthy, S.A., Johnson, R.M. y Kakimoto, D. 1994. Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982. 85 isolated from Kniko Bay. Japan. Journal Applied Bacteriology 77, 426-432.
- Mirleau, P., Delorme S., Philippot L., Meyer J.-M., Mazurier S. y Lemanceau P. 2000. Fitness in soil land rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine sythesis and uptake. FEMS Microbiol. Ecol. 34: 35-44.
- Mohanty S. N., Swain S. K. y Tripathi S. D. 1996. Rearing of catla (*Catla catla*) spawn on formulated diets. Journal of Aquaculture in the Tropics. 11: 253-258.
- Moriarty D. J. W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151: 333-349.
- Moriarty D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Diaseases control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. En: Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th international Symposium on Microbial Ecology (ed. By C. R. Bell, M. Brylinsky & P. Johnson-Green). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Muñoz Aguilar, J. M., Sabih A. M., Richards, A. J. M., Loake G. J., Watson M. D., y Shaw C. H. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. J. Gen. Microbiol. 134: 2741-2746.
- Naik A. T. R., Murthy H.S. y Ramesha T.J. 1999. Effect of graded levels of G-probiotic on growth, survival and feed conversion of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Fishery Technology. 36:63-66.
- Nogami, K., Hamasaki, K., Maeda, M. y Hirayama, K. 1997. Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. Hydrobiologia. 358: 291-295.
- Nogami K., y Maeda M. (1992). Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus tribeculatus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49, 2373-2376.

- Park S.C., Shimamura I., Fukunaga M., Mori K. y Nakai T. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1416-1422.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health*. 29: 4-8.
- Pybus, V., Loutit, M.W., Lamont, I.L. y Tagg, J.R. 1994. Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4335. *J.Fish Dis*. 17:311-324.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. y Menasveta, P. 1998. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. En: flegel, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok. 177-181.
- Riley, M. A. y Wertz J. E. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Ann. Rev. Microbiol*. 56: 117-137.
- Ringo, E. y Gatesoupe, F. J. 1998. Review/ Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160: 177-203.
- Riquelme, C., Hayashida G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. y Ishida, Y. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic Vibrios. *J. Shellfish Research* 15: 369-374.
- Riquelme C., Araya R., Vergara N., Rojas A., Guaita M. y Candia M. (1997). Potencial probiotic strains in culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154:17-26.
- Riquelme C., Araya R. y Escribano R. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181, 25-36.
- Rodriguez, J., Thompson, F. y Gullian K. M. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233:1-14.
- Ruiz-Ponte C., Samain J.F., Sanchez J.L. y Nicolas J.L. 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology* 1, 52-59.

- Saadoun, I., al- Momani F., Malkawi H. I. y Mohammad M. J. 1999. Isolation, Identification and analysis of antibacterial activity of soil streptomycetes isolates from north Jordan. *Microbios* 100: 41-46.
- Sahl, H.-G. y Bierbaum G. 1998. LANTIBIOTICS: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79.
- Scholz U., Garcia Diaz G., Ricque D., Cruz Suarez L.E., Vargas Albores F. y Latchford J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176: 271-283.
- Smith P. y Davey S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of fish Diseases* 16:521-524.
- Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Sick E.B., Pipper C.B., Martinussen T., Slierendrecht W.J. y Gram L. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology.* 3:755-765.
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M. y Deguchi, Y., 1997. *Vibrio* sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4986-4989.
- Tagg, J. R., Dajani A. S. y Wannamaker L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bact. Rev.* 40: 722-756.
- Tannock, G. W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. En: Mackie, R. I., Withe, B. A., Isaacson, R. E. (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions.* Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, 434-465 pp.
- Tendencia E. A., de la Peña L. D. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 195: 193-204.
- Vandenbergh, P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interfere with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:221-238.

- Vaseeharan B. y Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Applied Microbiology* 36: 86-87.
- Vargas-Albores, F. 1995. Sistemas de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia*, 46:33-45.
- Verschuere L., Heang H., Criel G., Sorgeloos P. y Verstraete W. 2000. Selected bacterial strains Project *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1139-1146.
- Vijayan K.K., Bright I.S., Jayaprakash N. S., Alavandi S.V., Somnath S. P., Preetha R., Rajan J.J.S. y Santiago T. C. 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS/-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture* 251: 192-200.
- Westerdahl, A., Olsson, J. J., Kjelleberg, S. y Conway P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2223-28.
- Williams, S.T. y Vickers, J.C. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microb. Ecol.* 12: 43-52.
- Yeng-Ling S., Winton, Ch. y Chung-Hsing, W. 1993. Isolation and Characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *Journal of Invertebrate pathology*. 61: 24-31.

X. ANEXOS.

Tabla V. Fuentes de carbono empleadas en el sistema BIOLOG para la identificación bioquímica de las especies bacterianas enumeradas de acuerdo a su posición en la microplaca.

posición microplaca		Fuente de Carbono	posición microplaca		Fuente de Carbono
A	1	agua	D	9	d- ácido glucuronico
A	2	a- cyclodextrina	D	10	a- ácido hydroxybutyrico
A	3	dextrina	D	11	b- ácidohydroxybutyrico
A	4	glycogeno	D	12	g- ácido hydroxybutyrico
A	5	tween 4	E	1	p-ácido hydroxyphenylacetico
A	6	tween 80	E	2	Ácido itaconico
A	7	n-acetyl alactosamina	E	3	Ácido a- keto-butyrico
A	8	n-acetyl-d-ucosamina	E	4	Ácido a- keto-glutárico
A	9	adonitol	E	5	Ácido a- keto-valérico
A	10	l- arabinosa	E	6	Ácido d,l- láctico
A	11	d- arabitol	E	7	Ácido malónico
A	12	d- cellobiosa	E	8	Ácido propiónico
B	1	i- erythritol	E	9	Ácido quinico
B	2	d- fructosa	E	10	ácido- saccharico
B	3	l- fucosa	E	11	Ácido sebácico
B	4	d- galactosa	E	12	Ácido succínico
B	5	gentiobiosa	F	1	Ácido bromo succínico
B	6	a-d- glucosa	F	2	Ácido succinamico
B	7	m- inositol	F	3	glucuronamida
B	8	a-d- lactosa	F	4	alaninamida
B	9	lactulosa	F	5	d- alanina
B	10	maltosa	F	6	l- alanina
B	11	d- manitol	F	7	l- alanyl-glycina
B	12	d- manosa	F	8	l- asparagina
C	1	d- melibiosa	F	9	ácido- aspártico
C	2	b- methyl-d-glucosida	F	10	Ácido l- glutámico
C	3	d- psicosa	F	11	Ácido glycy-l-aspártico
C	4	d- raffinosa	F	12	Ácido glycy-l-glutámico
C	5	l- rhamnosa	G	1	l- histidina
C	6	d- sorbitol	G	2	hydroxy-l-prolina
C	7	sucrosa	G	3	l- leucina
C	8	d- trehalosa	G	4	l- ornithina
C	9	turanosa	G	5	l- fenilalanina
C	10	xylitol	G	6	l- prolina
C	11	methyl pyruvato	G	7	Ácido l- pyroglutámico
C	12	methyl succinato	G	8	d- serina
D	1	Ácido acetico	G	9	l- serina
D	2	Ácido cis- aconitico	G	10	l- threonina
D	3	Ácido citrico	G	11	carnitina
D	4	Ácido formico	G	12	Ácido g- amino butyrico
D	5	Ácido d-galactonico lactona	H	1	Ácido urocánico
D	6	Ácido d- galacturonico	H	2	inosina
H	8	2,3- butanediol	H	3	uridina
H	9	Glycerol	H	4	thymidina
H	10	d,l-a- glycerol phosphato	H	5	feniletilamina
H	11	glucose-1-phosphato	H	6	putrescina
H	12	glucose-6-phosphato	H	7	2- amino ethanol

Tabla VI. Análisis de varianza de una vía practicado a los arcosenos de la supervivencia larval de *Litopenaeus vannamei* inoculados con los tratamiento (YO-I-2-1, YPD10-4, YC5-1, YC5-8 y CONTROL).

Df	MS	df	MS	Error	F	P
1	4	1.007860	9	.056986	17.68603	.000272

Tabla VII. Prueba de rangos múltiples de Tukey para definir diferencias en base al arco seno de los porcentaje de supervivencia larval de *Litopenaeus vannamei* inoculados con los diferentes tratamientos bacterianos (p<0.05).

TRATAMIENTOS	Promedio	1	2
YC5-1 {3}	2.754872	a	
CONTROL {5}	3.018638	a	
YC5-8 {4}	3.687750		b
YPD10-4 {2}	3.988407		b
YO-I-2-1 {1}	4.104277		b

Tabla VIII. Análisis de varianza de una vía practicado a los arcosenos de la supervivencia larval de *Litopenaeus vannamei* inoculados con todos los tratamiento (YO-I-2-1, YC5-8, MEZCLA 1, MEZCLA 2, OXI y CONTROL).

Tratamientos	df	MS	df	MS	F	P
	Efecto	Efecto	Error	Error		
	9	0.542749	11	0.114077	4.757741	0.009033

TABLA IX. Prueba de rangos múltiples de Tukey para definir diferencias en base al arco seno de los porcentaje de supervivencia larval de *Litopenaeus vannamei* inoculados con los diferentes tratamientos bacterianos ($p>0.05$).

TRATAMIENTOS	MEDIA DE ARCOSENO	1
Control {10}	3.271621	a
YO-I-2-1 10^6 {3}	3.468748	ab
YO-I-2-1 10^5 {2}	3.669996	ab
Oxi {9}	4.237654	ab
YO-I-2-1 10^4 {1}	4.271452	ab
Yc5-8 10^6 {6}	4.271452	ab
Yc5-8 10^4 {4}	4.426478	ab
MEZCLA 2 {8}	4.605271	b
Yc5-8 10^5 {5}	4.676808	b
MEZCLA 1 {7}	4.682331	b