



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología

**Eficacia de la fagoterapia contra la infección inducida
por *Vibrio alginolyticus* en cultivos de *Artemia
franciscana***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Carla Ivonne FERNÁNDEZ ESPINEL

ASESORES

Miguel Ángel Francisco TALLEDO RIVERA

Violeta de Jesús FLORES DOMINICK

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Fernández, C. (2016). *Eficacia de la fagoterapia contra la infección inducida por Vibrio alginolyticus en cultivos de Artemia franciscana*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

1304

1312

06



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

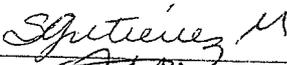
Siendo las 16:10 horas del 24 de octubre de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **CARLA IVONNE FERNÁNDEZ ESPINEL**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **020-EAPMP-2016**, la titulando expuso su tesis: **"EFICACIA DE LA FAGOTERAPIA CONTRA LA INFECCIÓN INDUCIDA POR *Vibrio alginolyticus* EN CULTIVOS DE *Artemia franciscana*"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: solresaliente.

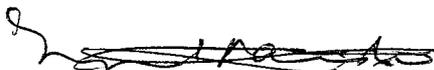
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **CARLA IVONNE FERNÁNDEZ ESPINEL** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:35 horas se levantó la sesión.

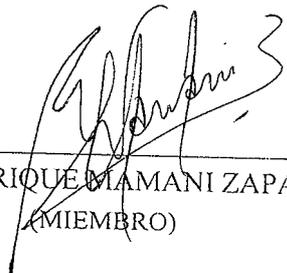
Ciudad Universitaria, 24 de octubre de 2016.



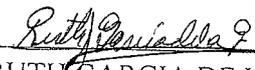
Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO
(PRESIDENTA)



Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(ASESOR)



Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA
(MIEMBRO)



Mg. RUTH GARCIA DE LA GUARDA
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

*Con mucho amor a mis padres:
Isabel y Javier.*

A mi Hermana:

Valerie.

*Todo lo q soy se los debo a ustedes,
gracias por su apoyo y amor incondicional ,
los amo.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A Dios por haber permitido la culminación de esta tesis con el apoyo de todos mis seres queridos, por haberme enseñado el camino y llenar mi corazón de esperanza en los momentos caóticos.

Al INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis dentro de sus instalaciones, especialmente agradezco al Laboratorio de Patobiología Acuática que dirige la Blga. Violeta Flores, por las facilidades brindadas en el uso de equipos e instalaciones, al Laboratorio de Microbiología Acuática, a cargo de la Mg. Rita Orozco por brindarme las facilidades de correr mis pruebas en el laboratorio, al Laboratorio de Ecotoxicología Acuática a cargo de Christian Paredes, por permitirme el uso de sus instalaciones y materiales de laboratorio y al laboratorio de cultivo de microalgas por proporcionarme los quistes de *Artemia franciscana* para la realización de esta tesis.

A mi asesor de tesis de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Blgo. Miguel Talledo, por su apoyo, paciencia, guiado y dedicación, gracias por las charlas en las cuales me explicaba cosas que a veces no entendía.

A Violeta Flores, mi asesora externa, por su apoyo, comprensión, cariño, paciencia y consejos, por tratarme siempre con tanto cariño, por impartirme todos sus conocimientos, por haberme dado la oportunidad desde el primer momento, de crecer como persona, de crecer profesionalmente, siempre le estaré agradecida, la quiero mucho.

A mis 3 revisores: a la profesora Susanita, el profesor Mamani y la profesora Ruth, gracias por sus acertados e invaluable consejos, por sus valiosas críticas y por la diligencia que siempre mostraron en la evaluación de esta tesis.

A mis queridos compañeros de IMARPE la verdad mencionarían tantas cosas, tantas anécdotas, tantos consejos, aportes y enseñanzas, cosas que aprendí de ustedes y tal vez ni se dieron cuenta, gracias chicos de veras, a Joel por orientarme cuando te llamaba desesperada para cualquier consulta, ya que sustentaste hace poco, eras una fuente confiable ☺, a Ricardo por haberme enseñado a armar mi sistema de aireación hasta altas horas de la noche, a Anthony por la gran paciencia, por todos los consejos en los momentos críticos por alentarme a mantener la calma cuando me estresaba y amilanaba ante difíciles situaciones y todo su apoyo en la parte estadística, a Isi también por toda la paciencia del mundo jeje por su orientación, sus valiosos consejos, por nunca

haber renegado conmigo, por siempre darme ánimos en los momentos de crisis experimentales, gracias por haber dedicado horas los fin de semana a ayudarme en algunas cosas de forma en la tesis pero sobre todo por su gran y valiosa amistad.

Al equipo de Patobiología Acuática: Marco, Verónica, Violeta e Irving, gracias por siempre tratarme con cariño, por los buenos momentos, por su ayuda, porque siempre cuando estaba preocupada me sacaban una sonrisa, por las largas conversaciones y por la confianza, siempre los tendré en mi mente y corazón.

A mi querida amiga Gloria, gracias por todo, son 5 años de amistad en los cuales hemos pasado tantas cosas, en definitiva no me alcanzaría papel para agradecer todos los consejos que nos hemos impartido, gracias por siempre preocuparte por la evolución de mi tesis y ayudarme a hacer más diligente todo el trámite administrativo, te quiero mucho amiga, como olvidar a Renzo, gracias de veras por haber ayudado en la entrega de las copias de mis borradores , gracias por haber ido más temprano de lo habitual a la uni porque te lo pedí y a mi amigo Luis por acompañarme y aconsejarme en los momentos difíciles, eres tan jovencito que me sorprende de veras que hayamos logrado congeniar tan bien!!!!.

A Alex por ser siempre como has sido conmigo , tan bueno, gentil, con un corazón enorme, por ser transparente siempre y aguantarme en mis momentos de crisis, de tristezas, de alegrías, por los consejos y la preocupación desde pregrado, de veras muchas gracias.

A mi familia a mi padre Javier, mi madre Isabel y mi hermana Valerie, por haber hecho de mí lo que soy ahora, por siempre haber creído en mis sueños, por todo su apoyo y amor constante, los amo con todo mi corazón.

A mi tía Noemí que desde el cielo me ayuda y cuida, gracias tía porque en vida siempre te preocupabas por mí y me aconsejabas y aun lo sigues haciendo lo sé, te quiero y te extraño infinitamente.

Y finalmente a Ivy y Kody mis dos chiquitines siempre haciéndome reír y renegar, significan mucho para mí , se han convertido en miembros de la familia, siempre meneando la colita aun cuando los regañamos, son adorables.

ABREVIATURAS

- DL₅₀ Dosis Letal 50
- UE Unidades experimentales
- NaCl Cloruro de Sodio
- ClCa₂ Cloruro de Calcio
- TSA Agar Tripticasa Soya
- AP Agua de Mar estéril enriquecida con Peptona
- UFP/mL Unidades formadoras de placas por mililitro
- UFC/mL Unidades formadoras de colonias por mililitro
- AM Agar Marino
- TSB Caldo Tripticasa de Soya
- IMARPE Instituto del Mar del Perú

INDICE

RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Acuicultura.....	3
2.2. <i>Artemia franciscana</i>	5
2.3. <i>Vibrio alginolyticus</i>	7
2.4. Antibióticos: uso en la acuicultura	8
2.5. Bacteriófagos	9
2.6. Taxonomía de los bacteriófagos.....	9
2.7. Ciclo biológico.....	11
2.8. La fagoterapia.....	14
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general.....	17
4.2. Objetivo específico	17
5. MATERIALES Y METODOS	18
5.1. MATERIALES.....	18
5.1.1. Material biológico	18
5.1.2. Medios de cultivo.....	18
5.1.3. Material de vidrio	18
5.1.4. Material de plástico	18
5.1.5. Equipos	19
5.2. MÉTODOS	20
5.2.1. Cinética de crecimiento bacteriano:	20
5.2.1.1. Turbidimétrico	20
5.2.1.2. Recuento en placa	21
5.2.2. Aislamiento del bacteriófago:	21
5.2.3. Producción masiva del bacteriófago	22
5.2.4. Cuantificación del bacteriófago	22
5.2.5. Reducción de la carga bacteriana en quistes de <i>Artemia franciscana</i>	23
5.2.6. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀).	26
5.2.7. Cinética de mortalidad de nauplios durante la infección con <i>Vibrio alginolyticus</i>	26

5.2.8.	Fagoterapia	27
5.2.8.1.	Ensayo 1: Evaluación de diferentes dosis de bacteriófagos	27
5.2.8.2.	Ensayo 2: Evaluación de la eficacia del tratamiento con bacteriófagos en diferentes etapas del progreso de la infección.....	28
5.2.9.	Análisis de datos y análisis estadística.....	29
6.	RESULTADOS.....	30
6.1.	Estandarización del cultivo de <i>Vibrio alginolyticus</i>	30
6.2.	Cinética de crecimiento bacteriano:	30
6.2.1.	Turbidimétrico	31
6.2.2.	Curva de cinetica de crecimiento bacteriano según las UFC/mL.....	31
6.3.	Aislamiento y purificación del bacteriófago específico contra <i>Vibrio alginolyticus</i> :.....	32
6.4.	Producción masiva y cuantificación del bacteriófago	33
6.5.	Reducción de la carga bacteriana en quistes de <i>A. franciscana</i>	35
6.6.	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀).....	36
6.7.	Cinética de supervivencia de nauplios durante la infección con <i>Vibrio alginolyticus</i>	39
6.8.	FAGOTERAPIA	41
6.8.1.	Ensayo 1: Evaluación de diferentes dosis de bacteriófagos	41
6.8.2.	Ensayo 2: Evaluación de la eficacia del tratamiento con bacteriófagos en diferentes etapas del progreso de la infección	46
7.	DISCUSIÓN	50
8.	CONCLUSIONES.....	54
9.	RECOMENDACIONES	55
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
11.	ANEXOS.....	65

INDICE DE FIGURAS

Figura Nº 1. Evolución de la acuicultura peruana en TM (2000 – 2010).....	4
Figura Nº 2. Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de la acuicultura 2014.	5
Figura Nº 3. Morfología de los bacteriófagos.....	10
Figura Nº 4. Ciclo lítico del bacteriófago T4.....	12
Figura Nº 5. Procedimiento para la cuantificación del bacteriófago.....	23
Figura Nº 6. Procedimiento para realizar la reducción de la carga bacteriana en quistes de <i>A. franciscana</i>	25
Figura Nº 7. Procedimiento para determinar la Dosis Letal 50 (DL ₅₀).	26
Figura Nº 8. Procedimiento para determinar la cinética de mortalidad de nauplios durante la infección con <i>V. alginolyticus</i>	27
Figura Nº 9. Procedimiento para realizar la evaluación de diferentes dosis de bacteriófagos.....	28
Figura Nº 10. Procedimiento para realizar la Evaluación de la eficacia del tratamiento con bacteriófagos en diferentes etapas del progreso de la infección.....	29
Figura Nº 11: Curva de crecimiento bacteriano de <i>V. alginolyticus</i>	30
Figura Nº 12: Curva y ecuación de la cinética de crecimiento bacteriana de acuerdo al conteo de UFC/mL a las 3, 6 y 8 horas.	32
Figura Nº 13. Spot test contra <i>V. alginolyticus</i>	33
Figura Nº 14. Determinación de la presencia de fagos líticos contra <i>V. alginolyticus</i> por aclaramiento en cultivo A) fago contra bacteria B) solo bacteria.....	33
Figura Nº 15: Observación de las UFP/mL del stock de bacteriófagos Va1 a distintas diluciones (10^{-1} - 10^{-9}) para la cuantificación.....	35
Figura Nº 16. Analisis utilizando el software EPA-PROBI version 1.5 para calcular la LD ₅₀ resultando esta en 680.129 µl, resultado que fue redondeado a 700 µl.....	37
Figura Nº 17. Cinética de supervivencia de nauplios durante la infección con <i>V. alginolyticus</i> a las 48 horas de infección.	39
Figura Nº 18. Relacion entre dosis y supervivencia (Barras verticales indican intervalos de confianza y barras horizontales la media).....	43
Figura Nº 19. Intervalos de confianza: Se observa como el tiempo de inoculación del bacteriófago Va1 influye en la supervivencia de nauplios de <i>A. franciscana</i>	48

INDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1. Especies cultivadas en la acuicultura peruana en TM (2000 – 2010).....	4
Tabla Nº 2. Familia y morfología de los bacteriófagos, Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado.....	11
Tabla Nº 3 Promedios de lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro	31
Tabla Nº 4. Extrapolación de los valores de crecimiento bacteriano de acuerdo a la ecuación de la recta.....	32
Tabla Nº 5: Conteo de UFC/ mL de <i>A. franciscana</i> sometidas a tratamiento	36
Tabla Nº 6. Supervivencia de nauplios de <i>A. franciscana</i> sometida a diferentes dosis de <i>V. alginolyticus</i> a las 48 horas post infección.....	38
Tabla Nº 7. Conteo de supervivencia de nauplios durante la infección con la LD ₅₀ de <i>V. alginolyticus</i> a diferentes tiempos de comenzada la infección.	40
Tabla Nº 8. Diferencias entre los tratamientos mediante la prueba estadística Tukey	42
Tabla Nº 9. Conteo de la supervivencia de nauplios de <i>A. franciscana</i> infectadas con la LD ₅₀ y tratadas con diferentes dosis del bacteriófago Va1.	45
Tabla Nº 10. Diferencias entre los tratamientos mediante la prueba estadística Tukey	47
Tabla Nº 11. Conteo de la supervivencia de nauplios de <i>A. franciscana</i> infectadas con la LD ₅₀ y tratadas en diferentes tiempos de comenzada la infección con el bacteriófago Va1.	49
Tabla Nº 12. Recuento del número de UFC/mL a las 3 horas de crecimiento de <i>V. alginolyticus</i>	65
Tabla Nº 13. Recuento del número de UFP/ml a las 6 horas de crecimiento de <i>V. alginolyticus</i>	65
Tabla Nº 14. Recuento del número de UFP/ml a las 8 horas de crecimiento de <i>V. alginolyticus</i>	66

RESUMEN

En la actualidad la *Artemia* sp es el principal alimento vivo que se utiliza en estadios tempranos de larvas de peces, pero es sabido que estos organismos también actúan como vectores de transmisión de microorganismos patógenos y oportunistas es así que el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la fagoterapia para reducir la mortalidad en *Artemia franciscana* causada por una infección inducida con la cepa de *Vibrio alginolyticus*, desarrollando las infecciones experimentales en recipientes con 100 ml de agua de mar estéril suplementada con peptona a una densidad de 100 nauplios por ml. Se tomó como LD₅₀, la dosis de inóculo bacteriano que causó el 50% de muerte de nauplios de *Artemia franciscana* a las 48 horas y se realizó la cinética de infección de *Vibrio alginolyticus* para evaluar cómo disminuye la tasa de supervivencia en el cultivo experimental.

Para evaluar la eficacia de la fagoterapia del fago Va1 se inocularon diferentes dosis del bacteriófago para determinar cuál de ellas era más efectiva y se trabajó con esta dosis para determinar en qué tiempo de comenzada la infección se debe inocular el bacteriófago para obtener una mayor supervivencia de los nauplios. Se demostró que el fago Va1 fue efectivo para aumentar la supervivencia, una sola dosis de 400µl con un título de $8 \cdot 10^8$ UFP/mL al comienzo de la infección fue suficiente para eliminar la infección inducida con *Vibrio alginolyticus*. El tiempo de aplicación del bacteriófago no puede exceder las 15 horas post infección ya que dentro de este intervalo de tiempo el índice de supervivencia se encuentra entre 75 y 97%, resultados que mostraban diferencias significativas con respecto al control. Se puede concluir que el uso de bacteriófagos como tratamiento contra vibriosis utilizando a *Artemia franciscana* como modelo biológico es efectivo para la prevención y control de *Vibrio alginolyticus*.

Palabras clave: *Vibrio alginolyticus*, bacteriófago, fagoterapia, nauplios, *Artemia franciscana*

ABSTRACT

Today *Artemia* sp is the main living food of larval fish that is used in early stages, but it is also known that these organisms also act as vectors for pathogens and opportunistic microorganisms, so the aim of this work was to evaluate the effectiveness of the phagotherapy in order to reduce the mortality of *Artemia franciscana* induced by *Vibrio alginolyticus*, developing experimental infections in containers with 100 ml of sterile seawater supplemented with peptone at a density of 100 nauplii per ml. LD₅₀ was taken as, the dose of bacterial inoculum that caused the death of 50% of *Artemia franciscana* nauplii at 48 hours and *Vibrio alginolyticus* kinetics infection was performed in order to evaluate how the survival rate decreases in the experimental units.

To evaluate the efficacy of phage therapy by phage Va1 different bacteriophage doses were inoculated in order to know which was most effective dose to be used to determine at what time the infection started to inoculate the bacteriophage to increased survival nauplii. It was shown that the phage Va1 was effective in increasing survival, with a single dose of 400µl with a titer of $8 \cdot 10^8$ UFP/mL at the beginning of the infection was enough to eliminate *Vibrio alginolyticus* induced infection. The bacteriophage application time cannot exceed 15 hours post infection and that within this time interval the survival rate was between 75 and 97%, results showing significant differences to control. It can be concluded that the use of bacteriophages as a treatment against vibriosis using an *Artemia Franciscana* as a biological model is effective for the prevention and control of *Vibrio alginolyticus*.

Keys Words: *Vibrio alginolyticus*, bacteriophage, fagotherapy, brine shrimp, *Artemia franciscana*

1. INTRODUCCIÓN

Por el continuo desarrollo de la acuicultura a nivel mundial y por la creciente demanda de recursos acuícolas por parte de la población, hay una mayor necesidad de generación de productos de origen marino por parte de las plantas de producción de productos hidrobiológicos. Sin embargo, éstas a menudo experimentan grandes pérdidas económicas dado que los peces, al igual que otros organismos, son susceptibles al desarrollo de diversas enfermedades originadas por bacterias (Carnevia *et al.*, 2013), virus, protozoarios, helmintos, oomicetos, copépodos y hongos. (Sarmiento y Rodriguez, 2013).

Estas enfermedades se presentan tanto en ambiente natural como en cautiverio, pero es en cautiverio donde se presentan con mayor incidencia, dado que los peces y otros organismos cultivados son sometidos muchas veces a un continuo estrés y altas densidades, además de la transmisión horizontal de bacterias patógenas u oportunistas causada por el alimento vivo (*Artemia franciscana* y *Rotíferos* sp), en consecuencia son más susceptibles al desarrollo de diversas patologías de origen bacteriano, siendo ésta una de las principales causas de mortalidad en peces.

Para la industria acuícola, esto ha generado el uso excesivo e inadecuado de antibióticos para tratar y prevenir enfermedades, trayendo consigo la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos usados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas; ésta problemática ha originado la búsqueda de otras alternativas de tratamiento siendo una de ellas la fagoterapia, que se presenta como una opción promisoriosa para tratar y prevenir enfermedades de etiología bacteriana en el cultivo acuícola.

Actualmente en el Perú son escasos los estudios que se han desarrollado sobre terapia fágica aplicada a la acuicultura, en consecuencia se debe profundizar en este tema con el objetivo de brindar una base para estudios posteriores en terapia fágica y su aplicación.

Esta investigación estuvo enfocada en la fagoterapia ante *Vibrio alginolyticus*, la cual nos dará conocimientos sobre el comportamiento del fago en un sistema modelo *in vivo* utilizando como modelo experimental a *Artemia franciscana* y así poder controlar la mortalidad causada por esta bacteria oportunista.

En este estudio se evaluará la eficacia de la fagoterapia como tratamiento debido a su alta especificidad, dado que el bacteriófago solo infecta a su bacteria hospedera, sin alterar la flora normal del organismo. Además, es bactericida contra bacterias resistentes a antibióticos, son estables, tienen baja toxicidad, no presentan efectos secundarios, por ende, se les considera inócuos para los organismos cultivados, no son dañinos para el medio ambiente, su producción tiene un bajo costo (Loc-Carrillo y Abedon, 2011), y presentan un crecimiento exponencial, por lo que su aplicación frecuentemente solo necesita una sola dosis. (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Goldman y Green, 2009)

La fagoterapia se presenta como una alternativa prometedora, dada necesidad de buscar nuevos métodos para hacer frente a los diferentes tipos de patologías causadas por bacterias en acuicultura (Loc-Carrillo y Abedon, 2011), y es ampliamente utilizada en agricultura, ganadería y medicina humana siendo usada por décadas en algunos países de la ex Unión Soviética (Sulakvelidze *et al.*, 2001). En muchos casos se reporta una reducción en la sintomatología y un aumento en la tasa de supervivencia de los organismos que fueron tratados con bacteriófagos (Fruciano, 2007).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Acuicultura

La Organización de las Naciones para la Agricultura y Alimentación (FAO, 2003) define a la acuicultura como la crianza de organismos acuáticos para optimizar su producción.

La acuicultura engloba a todas las actividades que tienen como objetivo: la producción, el desarrollo y la comercialización de organismos acuáticos (Negrete y Romero, 1989)

Sin embargo, la producción a gran escala es un factor limitante ya que a menudo los organismos son sometidos a estrés, altas densidades y a un continuo deterioro de los factores Bióticos y abióticos (Balcazar et al., 2006).

La tendencia que presenta la acuicultura en América Latina y El Caribe está orientada principalmente a cultivos de camarones (*Litopenaneus vannamei*) y tilapia (*Oreochromis sp*), también se encuentran las especies amazónicas como el sábalo cola roja (*Brycon erythropterum*), la gamitana (*Colossoma macropomun*), el paco (*Piaractus brachypomus*) y finalmente las especies de mar cuya demanda aumenta cada año presentando buena acogida en el mercado, entre los que se encuentran el lenguado (*Paralichtys adspersus*), atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), el barrilete (*Katsuwonus pelamis*), la corvina (*Cilus gilberti*), cabrilla (*Paralabrax humeralis*) y chita (*Anisotremus scapularis*) (Ministerio de la Producción – Perú 2011).

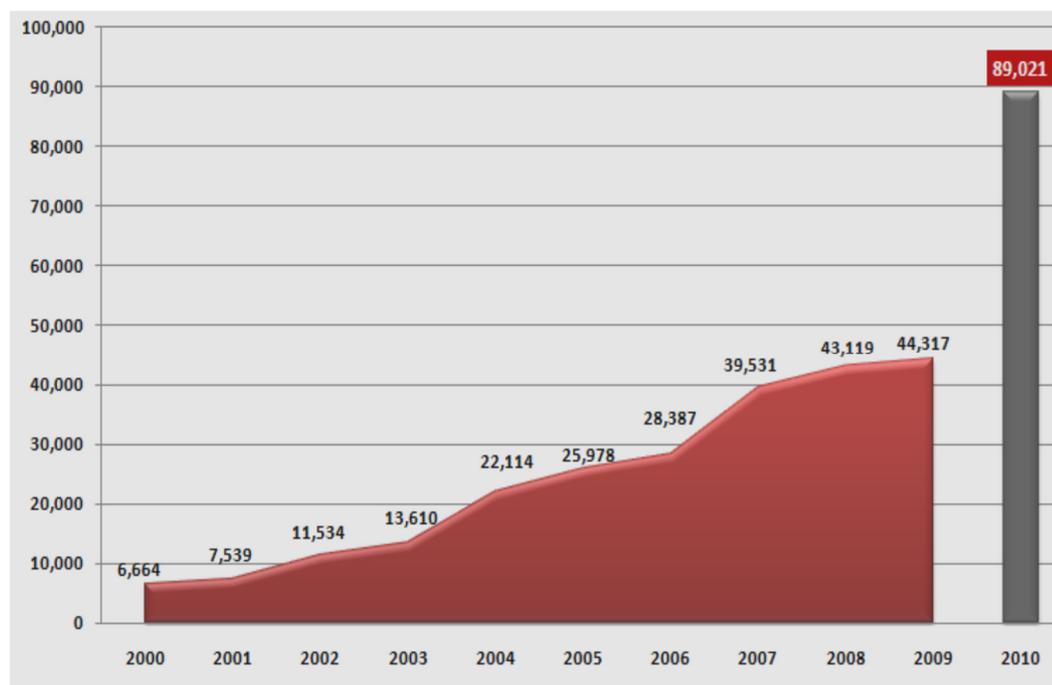
En el 2010 la acuicultura peruana alcanzó más de 89 mil toneladas, siendo 81% de organismos de ámbito marino y 19% de ámbito continental (Figura N°1).

Se puede apreciar un crecimiento a partir del 2002 de las especies en cultivo en los sistemas de producción acuícola (Tabla N°1).

Tabla N° 1. Especies cultivadas en la acuicultura peruana en TM (2000 – 2010)

Ámbito / Especie	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Continental	2,041	2,872	3,231	3,601	6,550	6,586	6,793	9,348	14,986	14,837	17,322
Boquichico	11	7	6	103	82	60	12	15	25	27	36
Cam. de Malasia	10	6	7	8	11	18	11	4	6	11	15
Carachama	-	-	1	0	0	0	0	1	4	1	22
Carpa	6	10	6	0	1	3	11	13	15	15	19
Gamitana	14	20	54	203	241	251	344	414	539	564	680
Paco	26	20	36	9	6	43	38	34	71	75	101
Pacotana	-	-	4	6	3	17	6	86	59	12	3
Paiche	-	-	-	0	2	14	2	-	1	3	48
Tilapia	46	223	122	112	1,326	619	494	1,741	1,714	1,261	2,013
Trucha	1,928	2,586	2,981	3,111	4,699	5,475	5,794	6,997	12,497	12,817	14,250
Sábalo cola roja	-	-	10	45	177	85	78	41	52	49	114
Otros	-	-	4	4	2	1	3	2	3	2	19
Marítimo	4,623	4,667	8,303	10,009	15,564	19,392	21,594	30,183	28,133	29,480	71,701
Concha de Abanico	3,915	3,913	5,701	6,670	10,485	11,065	12,337	18,518	14,802	16,047	58,101
Langostino	614	731	2,593	3,328	5,073	8,324	9,257	11,657	13,314	13,425	13,598
Ostras del Pacífico	16	8	9	11	6	3	-	-	-	-	-
Otros	78	15	-	-	-	-	-	8	17	8	2
TOTAL	6,664	7,539	11,534	13,610	22,114	25,978	28,387	39,531	43,119	44,317	89,021

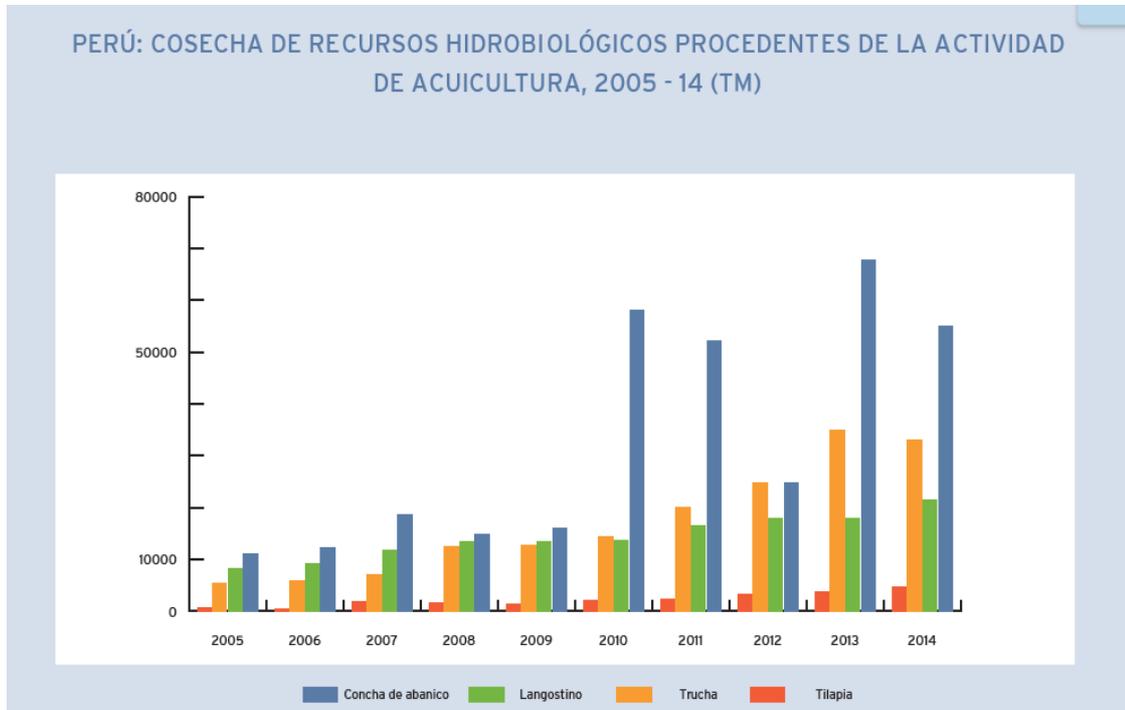
Fuente: Tabla obtenida del Ministerio de la Producción (Perú 2010)



Fuente: (Ministerio de la Producción, Perú-2010)

Figura N° 1. Evolución de la acuicultura peruana en TM (2000 – 2010)

Se observa que entre los años 2010 - 2014 la producción acuícola se ha ido incrementando, centrándose en 4 principales especies, las cuales son: concha de abanico, langostino, trucha y tilapia (Figura N° 2).



Fuente: Ministerio de la producción (Perú- 2014)

Figura N° 2. Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de la acuicultura 2014.

Se puede observar que la acuicultura va consolidándose progresivamente como una importante fuente económica, esto probablemente se deba a la diversidad de climas y fauna que tenemos en nuestro litoral, facilitando así el cultivo de diversas especies tanto continentales como marinas. (Ministerio de la Producción, Perú-2010)

2.2. *Artemia franciscana*

El incremento en la producción de peces en cautiverio demanda la búsqueda de tratamientos que estimulen el crecimiento, engorde y el desarrollo del sistema inmunológico de los organismos cultivados desde la etapa larval hasta la adultez, uno

de los principales factores estimulantes del desarrollo es la nutrición (Léger *et al.*, 1986), un pez bien alimentado será resistente a una amplia variedad de enfermedades (Vallat, 2001).

En las primeras fases del desarrollo larval se incide mucho en una buena alimentación debido a que en esta etapa se producen las mayores mortalidades, en consecuencia, se considera al alimento vivo como base de la alimentación por el alto valor nutricional que presenta. (Sales y Janssens, 2003).

En la actualidad la *Artemia* es el principal alimento vivo que se utiliza en la acuicultura, siendo utilizado en las fases tempranas de crecimiento de larvas de peces (Erdogan y Olmez, 2009).

A pesar de todos los aportes nutricionales que otorga el alimento vivo muchas veces estos organismos también actúan como vectores de transmisión de diferentes microorganismos patógenos y oportunistas entre los que encontramos a *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas cepaciae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio cholerae* El Tor, *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. proteolyticus* y *Pseudomonas creosotensis*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, etc. (Quiroz, 2005)

Estudios evidencian mortalidades de hasta un 100% en nauplios, reportándose a menudo a *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* como agentes causales de patologías dentro de las que encontramos destrucción enzimática e inhibición de la hemolinfa de los nauplios debido a productos extracelulares (Rico-Mora y Votolina, 1995); asimismo al ser usadas como alimento vivo causan altas mortalidades en larvas de peces de cultivo causando hemorragias, piel oscura y úlceras, internamente los peces acumulan líquido ascítico en la cavidad peritoneal y presentan hígados hemorrágicos (Babelona *et al.*, 1998).

2.3. *Vibrio alginolyticus*

En el ambiente acuático existe una gran variedad de bacterias patógenas y oportunistas, es especialmente en la acuicultura donde se propicia el desarrollo de enfermedades de etiología bacteriana, debido principalmente a las relaciones existentes entre agente etiológico, hospedero y ambiente (Pillay, 1992).

Se ha reportado que los cultivos de peces en cautiverio se ven afectados recurrentemente por el desarrollo de vibriosis, que se caracteriza por ser una enfermedad sistémica en peces que conduce a altas tasas de mortalidad y cuya incidencia se da mayormente en la fase de larva y alevín (Gutreuter, 1987; Ahne, 1981; Santos, *et al.*, 1992).

Los grupos que causan mayor incidencia de ictiobacteriosis pertenecen al género *Vibrio* ya que predominan en los ambientes acuáticos y forman la mayor parte de la flora interna de los organismos, (Brisou *et al.*, 1965; Bullock *et al.*, 1971) los vibrios pueden actuar como agentes etiológicos primarios o como patógenos oportunistas contribuyendo a la muerte de peces afectados por otras patologías (FAO, 2011).

Vibrio alginolyticus es una bacteria ubicua, su distribución es mundial y se encuentra en todos los organismos marinos. (Zavala *et al.*, 2005; Stephen, 1978; Baffone *et al.*, 2000; Gilmour, 1977), es una bacteria Gram negativa, presenta flagelos periticos y polares por lo cual es móvil, no forma esporas, son anaeróbicos facultativos (Baumann, 1984), presenta alta tolerancia a la sal y crece a diferentes temperaturas (Fournier y Quilici, 2002), la etiología causada por *Vibrio alginolyticus*, es una septicemia bacteriana, cuyos principales síntomas son:

Nado lento, desprendimiento de escamas, oscurecimiento de piel y aparición de úlceras a nivel epitelial, presencia de congestión en el intestino, vejiga y peritoneo (Colorni y col, 1981; Gómez- León *et al.*, 2005), aislada comúnmente de lesiones ulcerosas a nivel epitelial (Akazawa, 1968).

Estudios demuestran que parte de los síntomas ya descritos, cuando se realizan infecciones inducidas por inyectables con dosis elevadas de *Vibrio alginolyticus* se

produce una fuerte inflamación en la zona del inóculo con necrotización progresiva, exoftalmia con deformación en cráneo y aletas, nado desequilibrado y finalmente convulsivo (Negrete y Romero, 1998).

También se ha reportado la alta patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* en bivalvos causando altas mortalidades en larvas de ostión (Platt et al., 1995) y en almejas (Gomez et al., 2005).

Se asocia a *Vibrio alginolyticus* con otras especies de vibrios capaces de originar brotes con altas tasas de mortalidad (Muroga et al., 1987; Sedano et al., 1996), también se ha reportado la asociación entre *Artemia* sp y *Vibrio alginolyticus*, lo que conlleva a la transmisión de bacterias a larvas alimentadas con nauplios de *Artemia* sp originando diferentes patologías. (Gómez-Gil et al., 2000 y Snoussi et al., 2006)

2.4. Antibióticos: uso en la acuicultura

El control de enfermedades de peces en cultivo se basa principalmente en el uso de antibióticos pero, es sabido que el uso extensivo de estos trae como consecuencia la aparición de bacterias resistentes, lo que conlleva en muchas ocasiones al desarrollo de patologías que no pueden ser tratadas e incluso cepas que pueden infectar a otros organismos incluyendo al hombre (Defoirdt et al., 2007)

Los antibióticos se usan contra diversas patologías bacterianas, sin embargo, en los últimos años se ha prohibido su uso en muchos países (Wolff, 2004; Grave et al., 1999; Aarestrup, 2005) debido al efecto negativo en los organismos cultivados y en el medio ambiente, que limitan su efectividad como terapia. (Santiago et al., 2009, Cabello, 2004; Bjorlund et al., 1990; Grave et al., 1999; Cabello, 2006; Buschmann et al., 2006; Samuelsen et al., 1992). Además, promueven el surgimiento de bacterias resistentes a uno o más antibióticos, siendo principalmente las vibriosis y fotobacteriosis; a esto se suma la presencia de estos fármacos en el ambiente acuático (Capone et al., 1996) y que son capaces de ingresar a una gran variedad de especies de peces por vía de la

cadena alimenticia (Husevag *et al.*, 1991) lo que trae como consecuencia una alteración del sistema inmunológico, debilitándolo y haciéndolo más susceptible a diversas patologías ocasionadas por bacterias oportunistas y por bacterias patógenas que aprovechan las bajas defensas del organismo (FAO, 2011).

2.5. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o también llamados fagos son virus que infectan bacterias, estos fueron descritos por primera vez por Twort en 1915 y posteriormente por Félix d'Herelle en 1917. Los bacteriófagos son los cuerpos más abundantes en la tierra se estima un total de 10^{31} en todo el planeta tierra haciéndolos los agentes biológicos más abundantes del planeta (Hanlon, 2007).

Los fagos son parásitos obligados y se encuentran en todos los ambientes del planeta tierra en los que colonizan sus bacterias hospederas ya que necesitan de estas para poder multiplicarse aprovechando la maquinaria replicativa del hospedador (Hanlon, 2007).

Cada partícula del bacteriófago puede tener como material genético ADN o ARN envuelta por una cápside de naturaleza proteica o lipoproteína (Guttman *et al.*, 2005).

2.6. Taxonomía de los bacteriófagos

Actualmente existen 13 familias de bacteriófagos estas 13 clasificaciones se basan principalmente en su morfología y su genoma (Ackermann, 2001). (Figura N° 3)

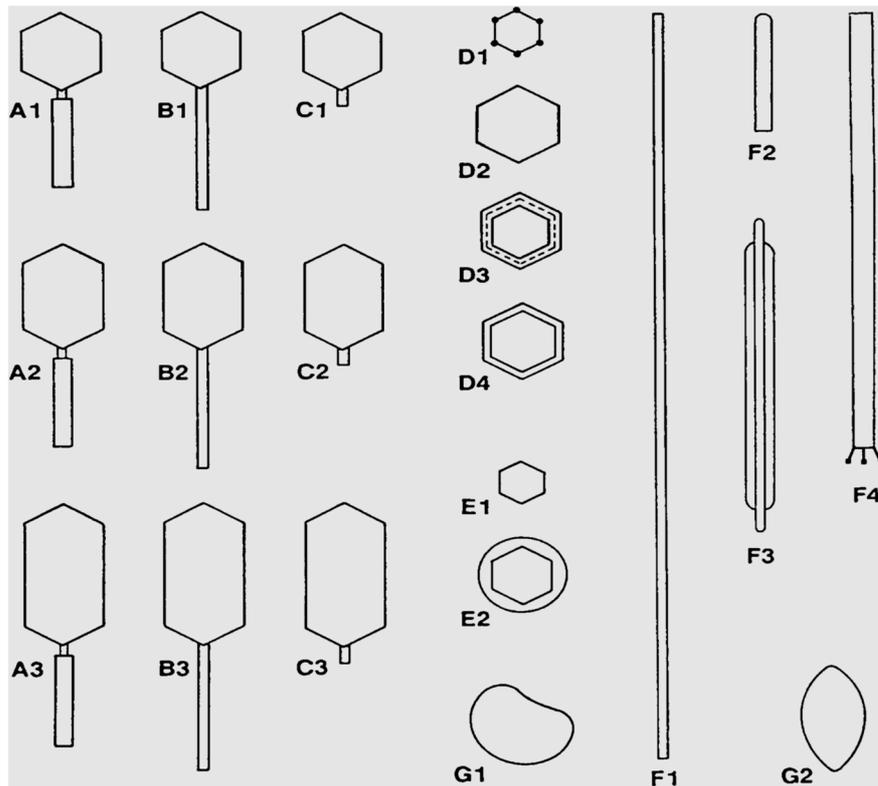


Figura N° 3. Morfología de los bacteriófagos.

Fuente: Ackermann, 2001.

De los 5100 fagos examinados por microscopía electrónica desde el año 1959 alrededor del 96% corresponden a fagos que presentan cola en su morfología, y dentro de este grupo de bacteriófagos con cola el 25.1 % pertenece a la familia Myoviridae, 60.8% a los Siphoviridae y 14.1 % a la Podoviridae y solo un 15 % de los fagos presentan cabeza alargada (Ackermann, 2001). (Tabla N° 2)

Tabla N° 2. Familia y morfología de los bacteriófagos, Sc: simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: superhelicoidal, L: lineal, seg.: segmentado

Morfología	Forma	Ácido nucleico	Familia	Particularidades
A1 a A3	Fagos con cola	ADN dc, L	Myoviridae	Cola contráctil
B1 a B3			Siphoviridae	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			Podoviridae	Cola corta
D1	Fagos poliédricos	ADN sc, C	Microviridae	Capsómeros sobresalientes
D3			Corticoviridae	Cápside compleja, lípidos
D4			Tectiviridae	Vesícula lipídica, pseudocola
E1			Leviviridae	
E2			Leviviridae	Cubierta lipídica
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	Inoviridae	a- filamentos largos
F2				b- bastones cortos
F3			Lipothrixviridae	Cubierta lipídica
F4			Rudiviridae	Similar al virus del mosaico del tabaco
G1	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	Plasmaviridae	Cubierta lipídica, sin cápside
G2			Fuselloviridae	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón

Fuente: Ackermann (2001).

2.7. Ciclo biológico

Los bacteriófagos presentan dos ciclos biológicos de replicación, los cuales comprenden el ciclo lítico que causa una rápida muerte por lisis celular bacteriana y el ciclo lisogénico en el que el material genético se acopla al cromosoma bacteriano (profago) y se queda en estado de latencia, el ciclo lisogénico no ocasiona la rápida lisis de la célula hospedera (Hanlon, 2007).

Detallaremos el ciclo lítico por ser el único ciclo biológico considerado en los tratamientos fágicos. (Figura N° 4).

Las etapas del ciclo lítico son:

- A. Fase de adsorción:
- B. Penetración:
- C. Metabolismo del bacteriófago
- D. Morfogénesis
- E. Lisis celular

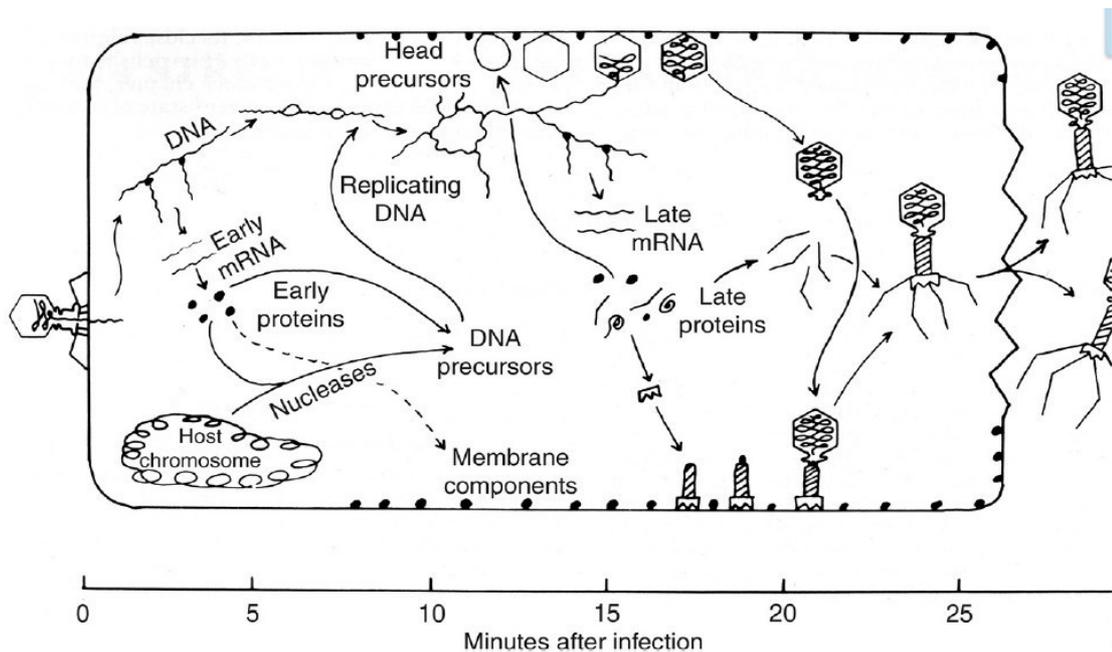


Figura N° 4. Ciclo lítico del bacteriófago T4.

Fuente: Mathew *et al.*, 1983

2.7.1. Fase de adsorción:

La fase de adsorción inicia cuando la cola de los bacteriófagos filamentosos se unen a receptores específicos en la pared celular de la bacteria hospedera. En bacterias Gram negativas, las proteínas, oligosacáridos y lipopolisacáridos pueden actuar como receptores para los bacteriófagos. (Kutter y Sulakvelidze, 2005). Muchas de las moléculas de superficie que los fagos utilizan como receptores solo se expresan en ciertas condiciones ambientales, por ejemplo: el receptor para el bacteriófago Lambda

solo se expresa en presencia de maltosa, es sabido que muchos fagos requieren cofactores específicos para el proceso de adhesión tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} o, simplemente, cualquier catión divalente (Dobbins *et al.*, 2004; Kutter y Sulakvelidze, 2005)

2.7.2. Penetración:

Después de la unión irreversible de la célula hospedera y el fago, el genoma del bacteriófago pasa a través de la cola hacia el interior de la célula huésped, la punta de la cola tiene un mecanismo enzimático para penetrar la capa de peptidoglucano de la célula hospedera para liberar el ADN directamente en la célula. El ADN se extrae a continuación en la célula por procesos que comprenden energética celular. (Kutter y Sulakvelidze, 2005).

Una vez dentro de la célula el ADN del fago es susceptible a las exonucleasas y enzimas de restricción del hospedador por lo tanto muchos recircularizan su ADN. (Russel, 1991; Kutter y Sulakvelidze, 2005 y Maniloff, 1998)

2.7.3. Metabolismo del bacteriófago

Esta etapa empieza con el reconocimiento del ARN polimerasa debido a promotores del bacteriófago en la célula hospedera, que conducen a la transcripción de los genes tempranos inmediatos del bacteriófago. Los productos de estos genes protegen el material genético del fago inactivando proteasas, enzimas de restricción, terminando procesos de biosíntesis de macromoléculas por parte del anfitrión y destruyendo macromoléculas del huésped, para posteriormente transcribir los productos que sintetizan un nuevo bacteriófago.

La degradación del ADN del huésped y la inhibición de la traducción de ARNm del hospedador son otros mecanismos que pueden contribuir para la síntesis de nuevos fagos. (Kutter y Sulakvelidze, 2005).

2.7.4. Morfogénesis

En esta etapa el material genético del bacteriófago se empaqueta para formar las procápsides. En la mayoría de los fagos su montaje implica reacciones complejas entre las proteínas estructurales de cabeza, seguida de escisión proteolítica en la región N-terminal de las principales proteínas de cabeza y cola. (Kutter y Sulakvelidze, 2005).

2.7.5. Lisis celular

Como última etapa tenemos la lisis celular es un evento que ocurre muy rápido (Wang, 2003) en esta etapa se liberan partículas de bacteriófagos que pueden infectar otros hospederos y comenzaran de nuevo el ciclo lítico.

En bacteriófagos con cadenas sencillas se produce la acción de la enzima muraminidasa que impide la síntesis del peptidoglucano bacteriano y en fagos con DNA de doble cadena se produce la acción de dos enzimas, la endolisina, que degrada el peptidoglucano y la enzima holina que produce la desorganización de la membrana celular (Kutter y Sulakvelidze, 2005 y Bernhardt *et al.*, 2002)

2.8. La fagoterapia

La fagoterapia es una alternativa nueva y prometedora su uso es muy versátil, puede ser utilizado en agricultura, salud, ganadería etc. (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

En la acuicultura, la terapia fágica se plantea como una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias patógenas y oportunistas (Ronda *et al.*, 2003) como por ejemplo ante *Pseudomonas plecoglossicida*, en el que se utilizó los fagos PPp-W4 Y PPpw-3 para examinar sus efectos como agentes terapéuticos en una infección inducida en *Plecoglossus altivelis* “ayu” por alimento impregnado con *Pseudomonas plecoglossicida*, ambos bacteriófagos mostraron una alta actividad inhibitoria, mostrando una reducción diaria del 5% de mortalidad, verificándose la presencia de bacteriófagos en el riñón luego de dos semanas de realizado el tratamiento (Park y

Nakai, 2003). También se analizó la eficacia de la terapia fágica para controlar la vibriosis producida por *Vibrio parahaemolyticus* en larvas de *Litopenaeus vannamei* “camarón blanco”, en el que se demostró la eficacia de la fagoterapia para prevenir y controlar la vibriosis (Lomelí, 2011). Se evaluó el uso de bacterias probióticas y fagos como medida de prevención contra *Vibrio* sp en la producción de nauplios de *Artemia* demostrando que los bacteriófagos y bacterias antagonistas son importantes controladores biológicos (Quiroz, 2005).

Se estudió la vibriosis causada por *Vibrio parahaemolyticus* en nauplios de *Artemia franciscana* y evaluó la eficacia de la dosis y el tiempo concluyendo que la terapia fágica fue efectiva para prevenir vibriosis en *Artemia* sp (Martínez, 2013).

Del medio marino también se han aislado numerosos bacteriófagos contra *Vibrio parahaemolyticus*, observando que éstos ejercen un excelente control contra esta cepa (Baross *et al.*, 1978), lo que argumenta que los bacteriófagos están asociados con la muerte de bacterias en ambientes naturales, trayendo consigo una mayor supervivencia de peces infectados (Nakai y Park, 2002).

3. HIPÓTESIS

La aplicación del bacteriófago Va1 contra *Vibrio alginolyticus* aumentará significativamente la supervivencia de *Artemia franciscana* durante la vibriosis inducida bajo condiciones controladas.

Variables independientes: Dosis de bacteriófago, Tiempo post infección, Inóculo Bacteriano (LD₅₀)

Variables dependientes: Supervivencia de *Artemia franciscana*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la eficacia de la fagoterapia contra la infección inducida por *V. alginolyticus* en cultivos de *Artemia franciscana* bajo condiciones controladas.

4.2. Objetivo específico

1. Aislar y purificar el bacteriófago específico contra *V. alginolyticus*
2. Determinar la dosis letal 50 (LD₅₀) de *Artemia franciscana* infectada experimentalmente con diferentes concentraciones de inóculo de *V. alginolyticus*
3. Evaluar el efecto de las dosis del bacteriófago aislado en la supervivencia de *Artemia franciscana* infectada experimentalmente con *V. alginolyticus*.
4. Evaluar el efecto de la fagoterapia con el tiempo post infección con *V. alginolyticus* en la supervivencia de *Artemia franciscana*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material biológico

- Cepa de *Vibrio alginolyticus* ATCC ® 33787.
- Quistes de *Artemia franciscana*
- Bacteriofago *Va1*

5.1.2. Medios de cultivo

- Caldo Tripticasa soya (TSB) x 500 G
- Agar Tripticasa de soya (TSA) X 500 g
- Peptona bacteriológica x 500g

5.1.3. Material de vidrio

- Vasos precipitados x1 L
- Tubos de vidrio con tapa rosca 16Xmm x 100mm
- Frasco botella en borosilicato x 1 L
- Pipetas Pasteur de vidrio de 146 mm
- Frasco viales de vidrio transparente x 25mL con tapa rosca
- Matraz Erlenmeyer de vidrio graduado de 125mL clase A
- Matraz Erlenmeyer de vidrio graduado de 500mL clase A
- Placa Petri de poliestireno descartable 15 mm x 100 mm
- Tubo de vidrio de ensayo de 13 mm x 100 mm
- Vaso precipitado x 100 mL

5.1.4. Material de plástico

- Jeringas descartables de 10ml con aguja 18 G x 1 1/2 in
- Tubos de centrifuga de polopropileno fondo cónico x 15 ml
- Tips de 1000 microlitros
- Papel parafilm rollo de 4"x125 ft
- Guantes quirúrgicos estériles descartables N° 6
- Filtros bacteriológicos de 0,22 micras de porosidad adaptable a jeringa hipodérmica
- Micropipeta automática de rango de 10-100 µl

- Micropipeta automática de rango de 100-1000 μ l

5.1.5. Equipos

- Termostato
- Agitador orbital
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Centrífuga
- Autoclave
- Refrigeradora
- Computadora

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Cinética de crecimiento bacteriano:

Se utilizó la cepa de *Vibrio alginolyticus* ATCC ® 33787 proporcionada por el INSTITUTO DEL MAR DEL PERU (IMARPE), esta cepa fue reactivada en 5 ml de Caldo Tripticasa de Soya (TSB) estéril suplementado con 1% de cloruro de Sodio (NaCl) para posteriormente incubarla a 35 °C durante 24 horas. La cepa fue sembrada en Agar Marino (AM) por 24 horas a 35 °C por la técnica de estría por agotamiento.

Se evaluó el tiempo en el cual la cepa de *V. alginolyticus* alcanzó la fase logarítmica de su crecimiento, para este fin se utilizaron dos métodos:

- El de turbidez, registrando lecturas a cada intervalo de tiempo en el espectrofotómetro.
- El conteo directo de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)

5.2.1.1. Turbidimétrico

Para realizar esta prueba se inoculó por asada la cepa en estudio en un tubo de ensayo conteniendo 5 mL de Agua de Mar estéril enriquecida con Peptona (AP) para posteriormente incubarla a 28 °C durante toda la noche.

Se verificó en el espectrofotómetro la turbidez del medio AP contenido en el matraz, esta fue considerada como la lectura blanco, a continuación se transfirió asépticamente 1 ml del cultivo de *V. alginolyticus* de toda la noche en el matraz de 250 ml conteniendo 50 ml del medio de cultivo AP y se registró inmediatamente la turbidez, esta fue considerada como lectura en el tiempo 0, posteriormente se realizaron lecturas cada hora en el espectrofotómetro hasta llegar a la fase estacionaria.

5.2.1.2. Recuento en placa

Para estimar el número de UFC/ml se realizó recuentos en placa en 3 intervalos de tiempo, los cuales son:

El inicio de la fase logarítmica, la mitad de la fase logarítmica y antes de ingresar a la fase estacionaria.

En los intervalos de tiempo señalados, se tomó el volumen de 1 mL del matraz de 250 ml que contenía 50 mL del medio de cultivo AP en el que se había inoculado la cepa de *V. alginolyticus* de toda la noche para posteriormente realizar diluciones seriadas en solución salina (10^{-1} hasta 10^{-11}), inmediatamente se tomó 0.1 ml de cada dilución y se inocularon en placas con Agar Marino por triplicado, la diseminación se realizó utilizando una espátula Drigalsky y se dejó incubar a 28 °C por 24 horas.

Luego de la incubación se realizó el conteo de UFC/ mL.

5.2.2. Aislamiento del bacteriófago:

El Fago Va1, específico contra *V. alginolyticus* se obtuvo de muestras de líquido ascítico procedente de un pez enfermo, correspondiente a la especie *Paralichthys adspersus* “lenguado”, del Laboratorio de Cultivo de Peces del IMARPE.

Para el aislamiento del fago Va1 se enfrentó 1 mL del líquido ascítico, previamente filtrado con filtros de jeringa estériles (0.22 μ m de porosidad), con 1 mL de un cultivo de *V. alginolyticus* en fase logarítmica.

El enfrentamiento se realizó en TSB suplementado con CaCl_2 (1 mL / 500 mL) y NaCl (1%), para posteriormente incubarse a 28 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó la suspensión bacteriana con los fagos a 3 300 x g por 15 minutos, a continuación se filtró el sobrenadante con filtros de jeringa estériles (0.22 μ m de porosidad), el filtrado obtenido de manera aséptica se conservó en refrigeración a 4°C en el laboratorio de Patobiología Acuática del IMARPE.

La presencia del bacteriófago se corroboró mediante la técnica de la gota, para esto se añadieron 200 μL de la cepa de *V. alginolyticus* en fase logarítmica en 3 mL de Agar Tripticasa Soya (TSA) al 70% que se debe encontrar a una temperatura de 45 °C y se vertió sobre una capa de TSA al 100%, una vez solidificada la doble capa, se depositó sobre la superficie una gota de 50 μL de suspensión fágica incubando posteriormente las placas a 28°C por 24 horas. (García Noriega, 2014).

5.2.3. Producción masiva del bacteriófago

Una vez corroborada la actividad del fago se procede a su producción masiva, para esto 5 ml del fago fueron adicionados en 500 mL de TSB suplementado con ClCa_2 (1 ml / 500 mL) y NaCl (1%) previamente inoculado con 5 mL de *Vibrio alginolyticus* en fase logarítmica, y se dejó en incubación a 28 °C por 24 horas. Luego de la incubación el sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0.22 μm de porosidad para la obtención del *stock* de trabajo.

5.2.4. Cuantificación del bacteriófago

Una vez obtenido el *stock* de trabajo, se realizó su cuantificación mediante la técnica de la doble capa, siguiendo la metodología utilizada por Hernández (2007), para esto se utilizó un cultivo bacteriano en fase logarítmica de *V. alginolyticus*.

Como se observa en la figura N° 5 se realizaron diluciones seriadas del bacteriófago y se adicionó 1 mL de cada dilución del fago a tubos previamente inoculados con 1 mL de *V. alginolyticus*, a cada tubo inoculado con bacteria y bacteriófago se le adicionó 3 ml de agar semisólido (TSA) al 70% el cual se encontraba a una temperatura de 45 °C, esta mezcla se vertió sobre una capa de agar sólido y se incubó a 28 °C por 24 horas. Posteriormente las placas de lisis fueron cuantificadas para hallar el número de UFP/ml.

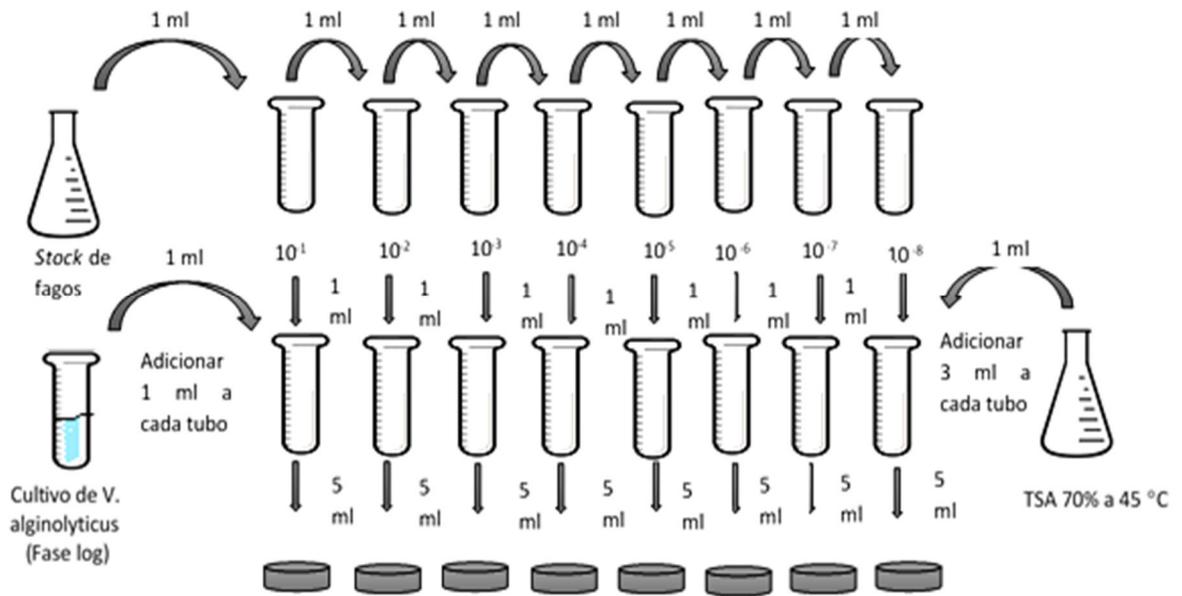


Figura N° 5. Procedimiento para la cuantificación del bacteriófago.

5.2.5. Reducción de la carga bacteriana en quistes de *Artemia franciscana*

Para reducir la carga bacteriana en quistes de *Artemia franciscana* (Gran Lago Salado, UTAH, Aquaculture ®, Bélgica) se utilizaron dos matraces estériles conteniendo 0.5 g de quistes deshidratados cada uno, a cada matraz se le añadió 100 ml de agua destilada estéril y se dejó hidratar por dos horas en un agitador a 100 RPM a 30 °C y en continua iluminación. Los quistes hidratados de uno de los matraces fueron transferidos a otro matraz con 100 mL de solución desinfectante (30 gl^{-1} de Hipoclorito de Sodio en agua de mar estéril), por un intervalo de diez minutos en continua agitación, posteriormente los quistes se enjuagaron con agua de mar estéril por quince minutos, seis veces. (Orozco, 2001).

Una vez lavados los quistes se sumergieron en una segunda solución desinfectante al 1% de Cloruro de Benzalconio con agua de mar estéril por 15 segundos, posteriormente los quistes fueron lavados y transferidos a un matraz estéril que contenía 400 mL de agua de mar estéril, incubándose a 28 °C en continua iluminación y aireación. (Martínez y Hipólito, 2013).

El segundo matraz con quistes hidratados fue utilizado como grupo control positivo, estos quistes se transfirieron a un matraz con 400 mL de agua de mar estéril y fueron sometidos a las mismas condiciones de incubación, iluminación y aireación que los quistes bajo tratamiento de desinfección.

Se utilizó un tercer matraz con agua de mar estéril como control negativo el cual fue sometido a las mismas condiciones de incubación, aireación e iluminación que los quistes bajo tratamiento de desinfección.

La reducción de la carga bacteriana se corroboró tomando 100 nauplios provenientes del matraz tratado y 100 nauplios del grupo control positivo, estos fueron macerados por separado en 2 mL de solución salina para posteriormente realizar diluciones seriadas de cada uno, a continuación se realizó la siembra por el método de diseminación masiva para cada dilución en AM por duplicado, las placas fueron incubadas por 24 horas a 28°C,

Como se muestra en la figura N° 6 transcurrido el periodo de incubación se registró el número de colonias para estimar el número de UFC/mL. (Lomelí, 2011)

Para el control negativo se realizaron diluciones del agua de mar estéril empleada en el tratamiento, a continuación se realizó la siembra de cada dilución por el método de diseminación masiva para cada dilución en AM por duplicado. Una vez corroborada la reducción de carga bacteriana, los nauplios fueron transferidos a unidades experimentales (UE) las cuales comprenden 100 mL de AP en vasos de precipitación de 200 mL a una densidad de 100 nauplios por UE y aireación controlada.

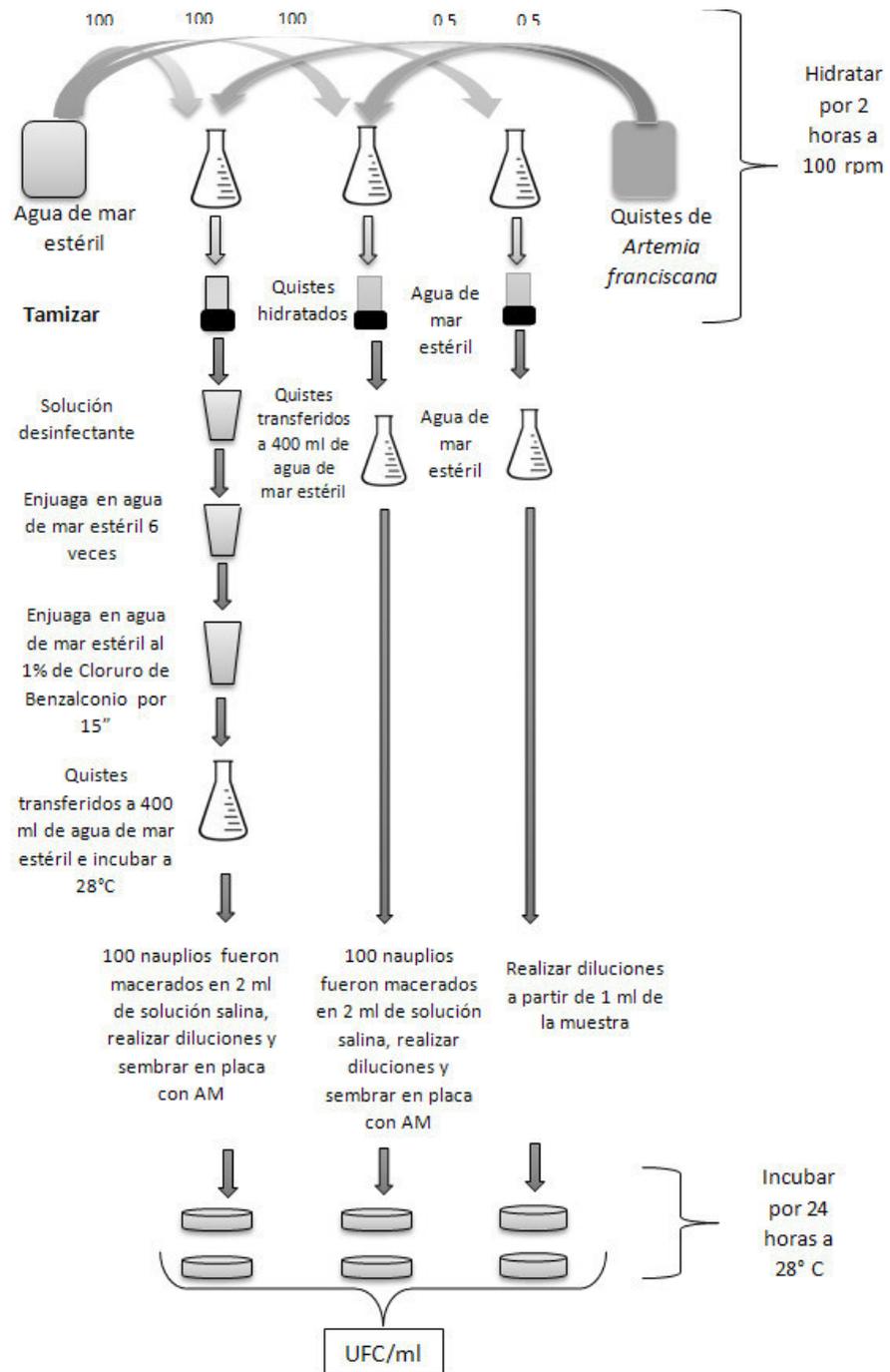


Figura Nº 6. Procedimiento para realizar la reducción de la carga bacteriana en quistes de *Artemia franciscana*.

5.2.6. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀).

Los nauplios fueron infectados con diferentes dosis de *V. alginolyticus* en fase logarítmica, según se aprecia en la figura N° 7. Las UE se mantuvieron a 28 °C, con aireación controlada y luz continua. El conteo de nauplios sobrevivientes fue contado a las 48 horas post infección (PI). El control positivo constará de UE sin la exposición a bacterias.

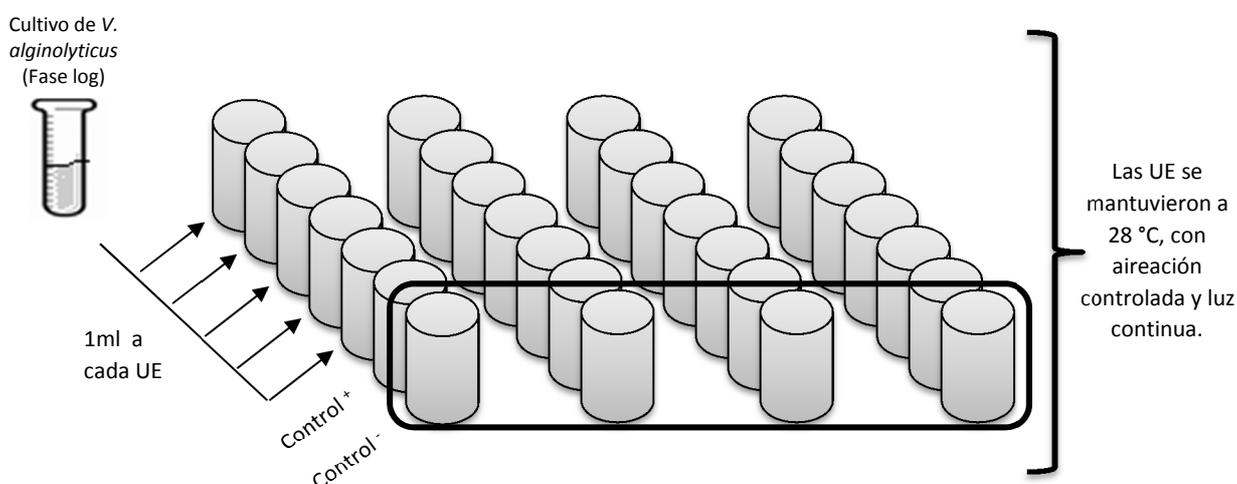


Figura N° 7. Procedimiento para determinar la Dosis Letal 50 (DL₅₀).

Además, se analizó la DL₅₀ utilizando el software EPA- Probit 1.5 para determinar la dosis que produjo el 50% de mortalidad a las 48 horas (Martínez y Hipólito, 2013).

Este ensayo fue repetido cuatro veces para evaluar su precisión.

5.2.7. Cinética de mortalidad de nauplios durante la infección con *Vibrio alginolyticus*.

Las unidades experimentales fueron inoculadas con la LD₅₀ de *V. alginolyticus* e incubadas a 28 °C con aireación controlada. El control positivo contó con UE sin la exposición a bacterias y el control negativo contó sólo con la adición de bacteria.

La mortalidad fue cuantificada a las 0, 3, 10, 15, 20, 30, 40 y 48 horas postinfección (Martínez y Hipólito, 2013), según se observa en la figura N° 8.

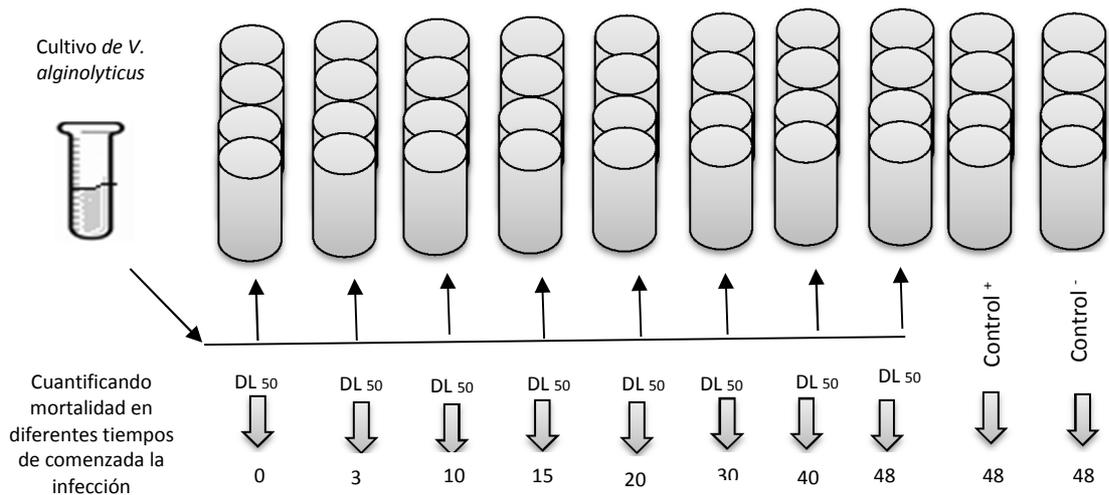


Figura N° 8. Procedimiento para determinar la cinética de mortalidad de nauplios durante la infección con *V. alginolyticus*.

5.2.8. Fagoterapia

En esta etapa se utilizó suspensiones de bacteriófagos procedentes del *stock*.

5.2.8.1. Ensayo 1: Evaluación de diferentes dosis de bacteriófagos

Como se observa la figura N° 9, las UE fueron infectadas con la DL₅₀ de *V. alginolyticus* y se trataron al inicio de la infección con dosis de fagos de 100 µl, 200 µl, 400 µl, 800µl y 1000 µl respectivamente. El control positivo comprendió UE sin la exposición a la bacteria y el control negativo consistió con la adición de la LD₅₀ bacteriana a las UE sin tratamiento fágico.

Cada evaluación se realizó por cuadruplicado, las unidades experimentales se incubaron a 28 °C con aireación controlada; la mortalidad fue registrada a las 48 horas (Lomelí, 2011).

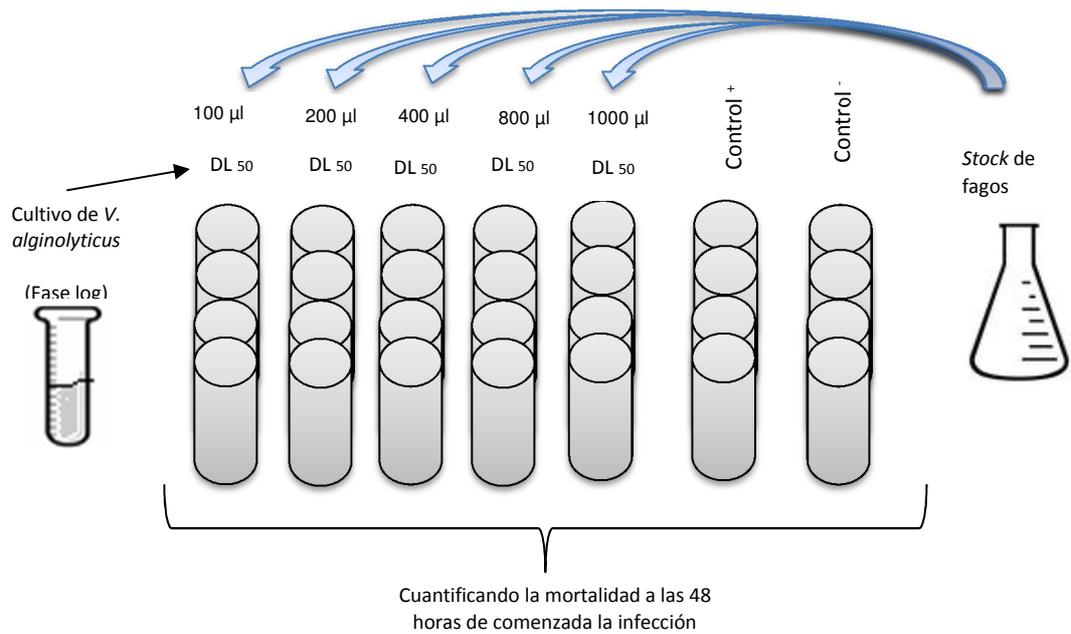


Figura N° 9. Procedimiento para realizar la evaluación de diferentes dosis de bacteriófagos

5.2.8.2. Ensayo 2: Evaluación de la eficacia del tratamiento con bacteriófagos en diferentes etapas del progreso de la infección

En este ensayo las UE fueron infectadas con la LD₅₀ de *V. alginolyticus* y se trataron con una sola dosis del stock de bacteriófagos a las 0, 3, 10, 15, 20, 30 y 40 horas después de iniciada la infección, las unidades experimentales se incubaron a 28 °C y la mortalidad de nauplios se evaluó a las 48 horas post infección, según el diagrama de trabajo de la figura N° 10.

El control positivo comprendió UE sin la exposición a bacterias y el control negativo consistió con la adición de la LD₅₀ bacteriana a las UE sin tratamiento fágico.

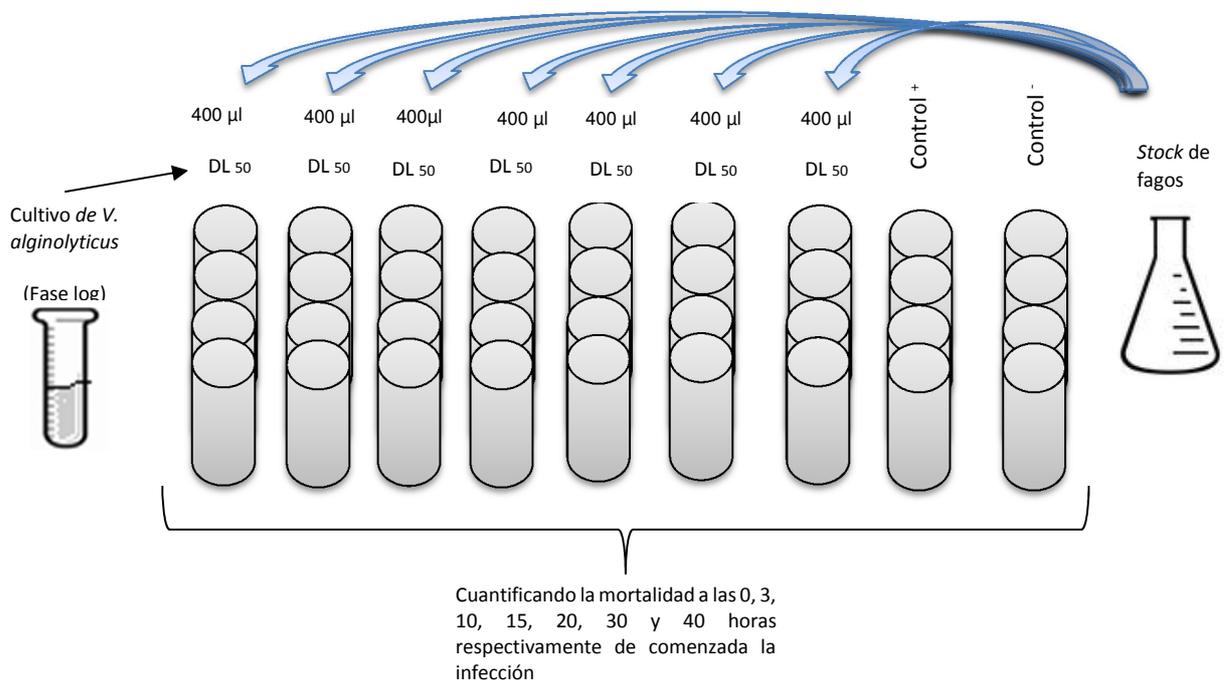


Figura N° 10. Procedimiento para realizar la Evaluación de la eficacia del tratamiento con bacteriófagos en diferentes etapas del progreso de la infección

5.2.9. Análisis de datos y análisis estadística

Para la interpretación y análisis de los resultados se usaron parámetros descriptivos y analíticos, para la descripción se usó el promedio y la desviación estándar y para el análisis del efecto de la dosis del bacteriófago se usó la prueba de Kruskal-Wallis o Tukey para evidenciar las diferencias significativas entre los tratamientos. El programa utilizado fue Minitab 16.

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización del cultivo de *Vibrio alginolyticus*

La cepa de *Vibrio alginolyticus* ATCC ® 33787 proporcionada por el IMARPE, mostro un adecuado crecimiento en AP.

V. alginolyticus mostró un crecimiento homogéneo en Agar Marino y en Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), en la descripción macroscópica las colonias presentaron bordes regulares, aspecto brillante, superficie cóncava, y forma circular

6.2. Cinética de crecimiento bacteriano:

Para obtener una mayor eficacia en los ensayos se realizó la curva de crecimiento de la cepa *Vibrio alginolyticus* ATCC ® 33787 desde la fase de latencia hasta la fase estacionaria.

Se determinó que la cepa inició la fase logarítmica de su crecimiento en AP a las 3 horas y entraba a la fase estacionaria a las 8 horas de cultivo (Figura N° 11).

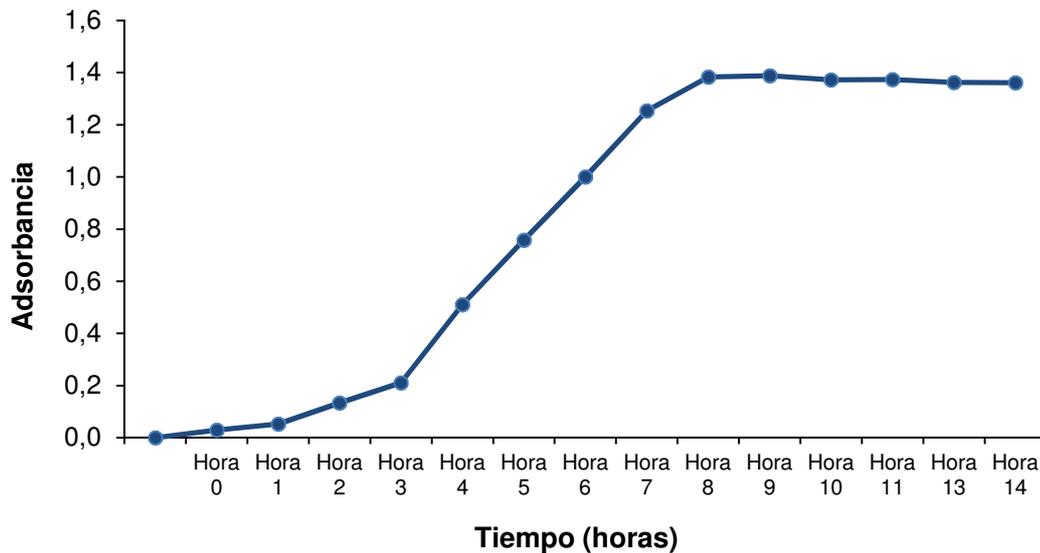


Figura N° 11: Curva de crecimiento bacteriano de *Vibrio alginolyticus*.

6.2.1. Turbidimétrico

Se observa que el los valores de absorbancia empiezan a aumentar de forma exponencial a partir de las tres horas llegando la absorbancia a su valor máximo a las 8 horas (Tabla N° 3)

Tabla N° 3 Promedios de lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro

Tiempo	Promedios de lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro
Hora 0	0.03
Hora 1	0.0529
Hora 2	0.1339
Hora 3	0.2115
Hora 4	0.5102
Hora 5	0.7574
Hora 6	1.0002
Hora 7	1.2532
Hora 8	1.3831
Hora 9	1.3881
Hora 10	1.3723
Hora 11	1.3735
Hora 13	1.3627
Hora 14	1.3628

6.2.2. Curva de cinetica de crecimiento bacteriano según las UFC/mL.

Se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (anexo 1) tomando como referencia las lecturas en el espectrofotómetro, los tiempos que consideramos para determinar las UFC/ml fueron a las 3, 6 y 8 horas y en base a los resultados obtenidos se determinó la acuacion de la recta (Figura N° 12), que estimó el numero de UFP/ml en diferentes tiempos de la fase logarítmica (Tabla N° 4)

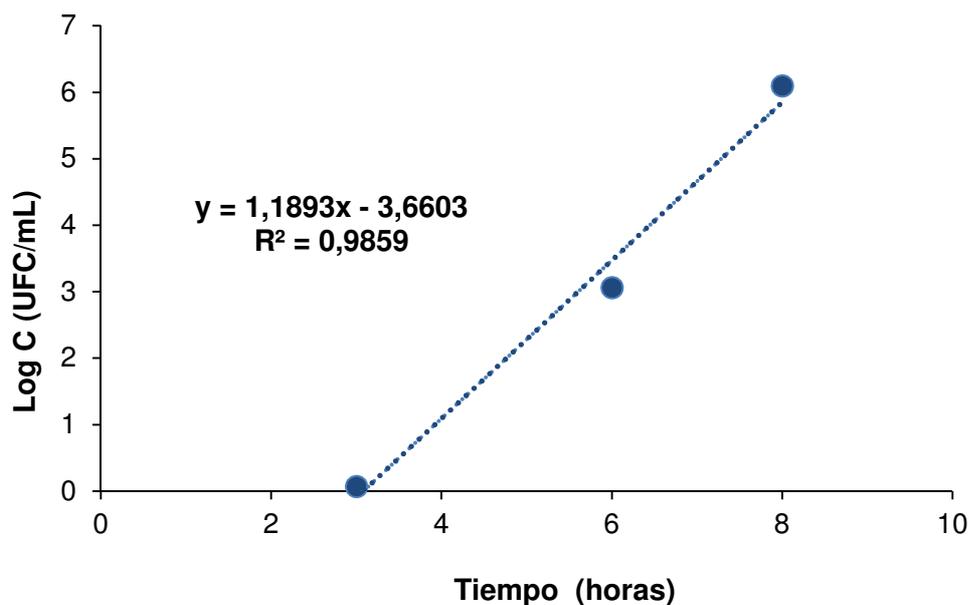


Figura Nº 12: Curva y ecuación de la cinética de crecimiento bacteriana de acuerdo al conteo de UFC/ml a las 3, 6 y 8 horas.

Tabla Nº 4. Extrapolación de los valores de crecimiento bacteriano de acuerdo a la ecuación de la recta.

Tiempo (h)	Concentración (UFC/mL x 10 ⁷)
3	0.808351037
4	12.49971181
5	193.2858226
6	2988.821647
7	46216.81361
8	714660.8639

6.3. Aislamiento y purificación del bacteriófago específico contra *Vibrio alginolyticus*:

Luego de realizar el procedimiento explicado en 5.2.2. se aislo el fago Va1 el que fue detectado mediante la técnica de *spot test*, prueba preliminar confirmatoria de presencia de bacteriófagos específicos, en placas con agar TSA al 1% de NaCl y utilizando la cepa de *V. alginolyticus* como cepa indicadora. Se observaron zonas de aclaramiento en la

región de goteo del bacteriófago, lo que evidencia la presencia y el efecto lítico contra la cepa susceptible (Figura N°13).



Figura N° 13. Spot test contra *V. alginolyticus*.

Se realizó el enfrentamiento en matraces y tubos para evidenciar el aclaramiento (Figuras N° 14)

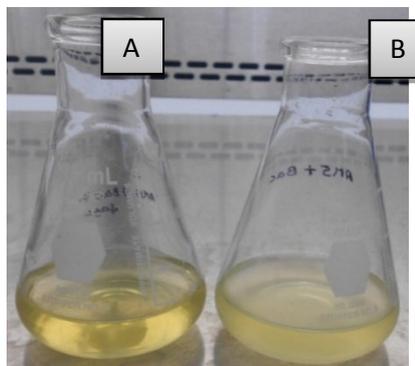
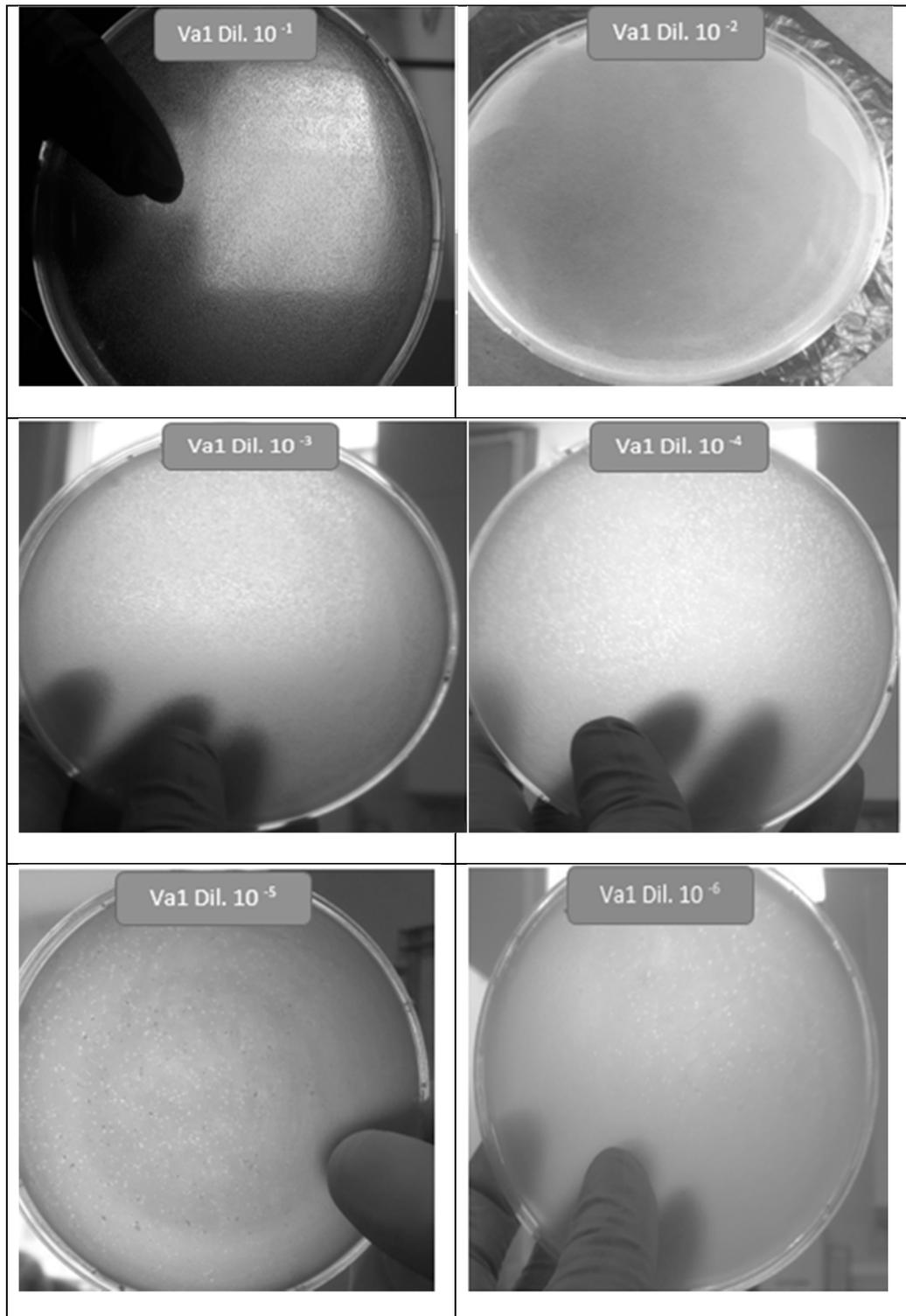


Figura N° 14. Determinación de la presencia de fagos líticos contra *V. alginolyticus* por aclaramiento en cultivo A) fago contra bacteria B) solo bacteria

6.4. Producción masiva y cuantificación del bacteriófago

En la etapa de producción masiva del bacteriófago se obtuvo 500 ml de un *stock* de fagos con un título de 2×10^9 UFP/ml, el stock con el título conocido fue utilizado en lo sucesivo del experimento (Figura N° 15).



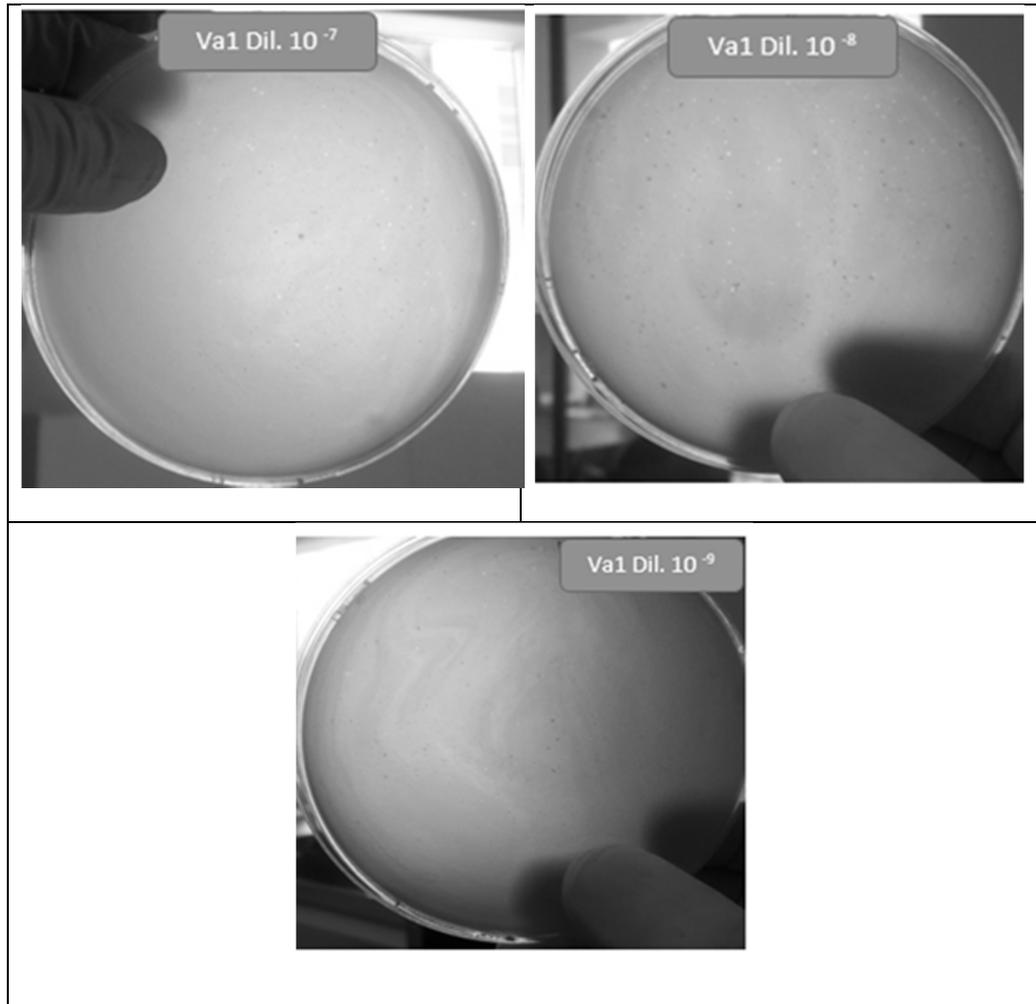


Figura N° 15: Observación de las UFP/mL del stock de bacteriófagos Va1 a distintas diluciones (10^{-1} - 10^{-9}) para la cuantificación

6.5. Reducción de la carga bacteriana en quistes de *A. franciscana*.

Se observó que luego de la decapsulación realizada con cloruro de sodio e hidróxido de potasio y además un lavado de 15 segundos con abundante agua de mar estéril al 1% de cloruro de benzalconio disminuyó significativamente el crecimiento bacteriano a 5 UFC/ml en comparación con el control cuyo crecimiento bacteriano dio como resultado incontables UFC/mL (Tabla N°5).

Tabla N° 5: Conteo de UFC/ ml de *A. franciscana* sometidas a tratamiento

Diluciones		Control positivo				Control negativo				Tratamiento			
		-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4
Repetición 1 (duplicado)	100	I	I	I	I	0	0	0	0	5	0	0	0
	100	I	I	I	I	0	0	0	0	6	0	0	0
Repetición 2 (duplicado)	100	I	I	I	I	0	0	0	0	4	0	0	0
	100	I	I	I	I	0	0	0	0	6	0	0	0
Repetición 3 (duplicado)	100	I	I	I	I	0	0	0	0	4	0	0	0
	100	I	I	I	I	0	0	0	0	4	0	0	0

I: Incontables; **Control positivo:** nauplios sin solución desinfectante; **Control Negativo:** Agua de Mar enriquecida estéril; **Tratamiento:** *A. franciscana* sometida a la solución desinfectante.

Se evidencia una gran variación en las UFC/ml entre el tratamiento y los controles tanto positivo y negativo, demostrando una gran eficacia en la desinfección de los nauplios.

6.6. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀).

En la figura N° 16 se observa que la dosis que produce 50% de mortalidad de nauplios de *A. franciscana* en 48 horas es 700 µl (2.1 x 10¹⁰ UFC/mL) de *V. alginolyticus*, resultado que fue corroborado al realizarse 4 repeticiones en la prueba, de lo expuesto se estableció el tiempo de 48 horas como tiempo estándar hasta finalizar las pruebas de infecciones experimentales así como las pruebas de fagoterapia. (Tabla N° 6).

Adicionalmente se puede observar que a medida que aumenta la dosis de *V. alginolyticus* se genera una mayor mortalidad en los nauplios de *A. franciscana*, demostrando la patogenicidad de la cepa.

La concentración de oxígeno disuelto se controló en todas las UE para descartar una mortalidad debido a la falta de oxígeno, este valor se encontró entre 6 y 6.5 mg/l en lo sucesivo del experimento

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	225.924	158.683	282.549
LC/EC 5.00	312.003	240.774	368.472
LC/EC 10.00	370.601	300.323	425.063
LC/EC 15.00	416.251	348.285	468.558
LC/EC 50.00	680.129	630.491	730.852
LC/EC 85.00	1111.290	997.467	1304.426
LC/EC 90.00	1248.177	1100.323	1511.658
LC/EC 95.00	1482.600	1270.082	1884.382
LC/EC 99.00	2047.481	1657.185	2857.739

Figura N° 16. Analisis utilizando el software EPA-PROBI version 1.5 para calcular la LD₅₀ resultando esta en 680.129 µl, resultado que fue redondeado a 700 µl.

Adicionalmente utilizando el software Minitab 16 se analizaron los resultados de supervivencia, y de acuerdo al estadístico Kolgomorov los resultados presentan una distribución normal ($p > 0.05$), además se realizó el análisis de igualdad de varianzas en el cual se utilizó la prueba de Bartlett ($p=0.874$) que es mayor a 0.05 a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto los resultados presentan varianzas iguales.

Finalmente se realizó la prueba de Anova y se obtuvo un $p < 0.05$ indicando diferencias significativas en los resultados a un nivel de confianza del 95%.

Tabla Nº 6. Supervivencia de nauplios de *Artemia franciscana* sometida a diferentes dosis de *Vibrio alginolyticus* a las 48 horas post infección.

ARTEMIA (nauplios.100ml ⁻¹)	BACTERIA (UFC/ml)	REPETICIONES				PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA A LAS 48 HORAS POST INFECCIÓN
		SUPERVIVENCIA A LAS 48 HORAS POST INFECCIÓN				
		Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	
100	0(control)	99	98	97	97	100%
100	100ul (2.9 x 10 ⁹)	97	99	96	98	97.5%
100	200ul (5.9 x 10 ⁹)	94	93	95	97	94.75%
100	300ul (8.9 x 10 ⁹)	93	85	92	89	89.75%
100	400ul (1.2 x 10 ¹⁰)	80	82	84	78	81.00%
100	500ul (1.5 x 10 ¹⁰)	72	69	72	76	72.25%
100	600ul (1.8 x 10 ¹⁰)	63	58	65	61	61.75%
100	700ul (2.1 x 10 ¹⁰)	52	48	55	51	51.50%
100	800ul (2.4 x 10 ¹⁰)	42	39	45	40	41.5%
100	900ul (2.7 x 10 ¹⁰)	28	26	21	29	26.00%
100	1000ul (2.9 x 10 ¹⁰)	12	10	9	13	11%

6.7. Cinética de supervivencia de nauplios durante la infección con *Vibrio alginolyticus*.

Utilizando el software Minitab 16 se analizaron los resultados de supervivencia, y de acuerdo al estadístico Kolgomorov los resultados presentan una distribución normal ($p > 0.05$), además se realizó el análisis de igualdad de varianzas en el cual se utilizó la prueba de Bartlett la cual es mayor a 0.05 a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto los resultados presentan varianzas iguales.

Finalmente se realizó la prueba de Anova y se obtuvo un $p < 0.05$ indicando diferencias significativas al momento de comparar los resultados de supervivencia a las 0 y 48 horas a un nivel de confianza del 95%(Tabla N°7).

Se observa como la supervivencia de nauplios disminuye a medida que avanza el tiempo de comenzada la infección demostrando así la patogenicidad de la cepa y la susceptibilidad de *A. franciscana* ante *V. alginolyticus* (Figura N° 17)

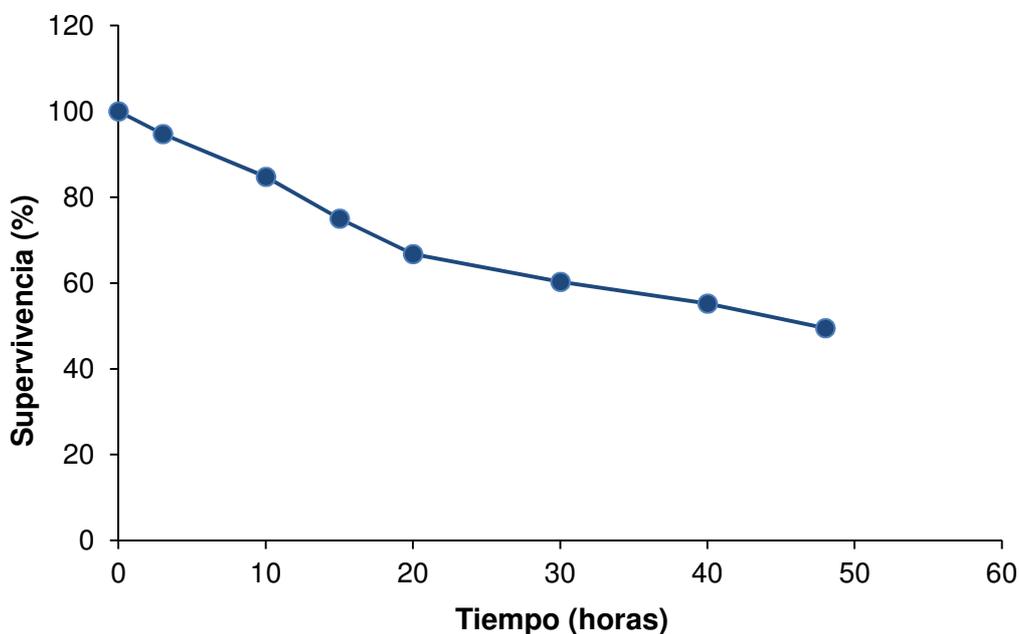


Figura N° 17. Cinética de supervivencia de nauplios durante la infección con *Vibrio alginolyticus* a las 48 horas de infección.

Tabla Nº 7. Cuento de supervivencia de nauplios durante la infección con la LD₅₀ de *Vibrio alginolyticus* a diferentes tiempos de comenzada la infección.

ARTEMIA (nauplios.100ml ⁻¹)	TIEMPO (horas)	BACTERIA (2.1 x 10 ¹⁰ UFC/ml)	REPETICIONES				PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA AL TRANSCURSO DEL TIEMPO POST INFECCIÓN
			SUPERVIVENCIA A LOS DIFERENTES TIEMPOS POST INFECCIÓN				
			Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	
100	48 (control-)	0	100	99	100	99	99.50%
100	0	700ul	100	100	100	100	100%
100	3	700ul	94	96	97	92	94.75%
100	10	700ul	85	83	87	84	84.75%
100	15	700ul	75	75	78	72	75.00%
100	20	700ul	68	63	69	67	66.75%
100	30	700ul	61	58	59	63	60.25%
100	40	700ul	56	54	55	56	55.25%
100	48	700ul	51	47	48	52	49.50%

6.8. FAGOTERAPIA

6.8.1. Ensayo 1: Evaluación de diferentes dosis de bacteriófagos

Utilizando el software Minitab 16 se analizaron los resultados de supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* tratados con diferentes dosis del bacteriófago Va1. Los resultados presentan una distribución normal de acuerdo al estadístico de Kolmogorov ($p > 0.05$), además se realizó el análisis de igualdad de varianzas en el cual se utilizó la prueba de Bartlett ($p=0.566$, $p > 0.05$) a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto los resultados presentan varianzas iguales.

Se realizó la prueba de Anova y se obtuvo un $p < 0.05$ indicando diferencias significativas en los resultados a un nivel de confianza del 95%.

Finalmente se realizó la prueba de Tukey para determinar qué tratamientos son diferentes y qué tratamientos dan como resultado valores similares, en esta prueba se consideró un nivel de confianza del 95%.

En la tabla N° 8 podemos observar que al utilizar dosis de 400 μ l, 800 μ l y 1000 μ l de bacteriófagos en el tratamiento las medias de los resultados de supervivencia no presentan una variación elevada, lo que indica que no hay diferencia significativa en el uso de estas dosis, por lo tanto todos pertenecen a la agrupación B, a comparación del uso de la dosis del 100 μ l (agrupación C) y 200 μ l (agrupación E) del bacteriófago, en el que se observa una media equidistante con respecto a la agrupación A (control +) , D (control -) y B, lo q indica una diferencia significativa entre los resultados .

Tabla N° 8. Diferencias entre los tratamientos mediante la prueba estadística Tukey

DOSIS	N°	MEDIA	AGRUPACION
control +	4	98.750	A
400µl	4	88.000	B
1000 µl	4	87.750	B
800 µl	4	87.250	B
200 µl	4	83.000	E
100 µl	4	69.500	C
control-	4	51.500	D

En la figura N° 18 se observa que al adicionar 400 µl, 800 µl y 1000 µl de inóculo fágico se obtuvieron resultados prometedores de supervivencia, asimismo cuando se emplean dosis del fago de 100 µl y 200 µl hay una disminución en la tasa de sobrevivientes y al utilizar dosis de 100 µl hay mayor variación en los conteos de supervivientes, además se aprecia gráficamente los valores de las medias de los supervivientes así como también los intervalos de confianza al 95%.

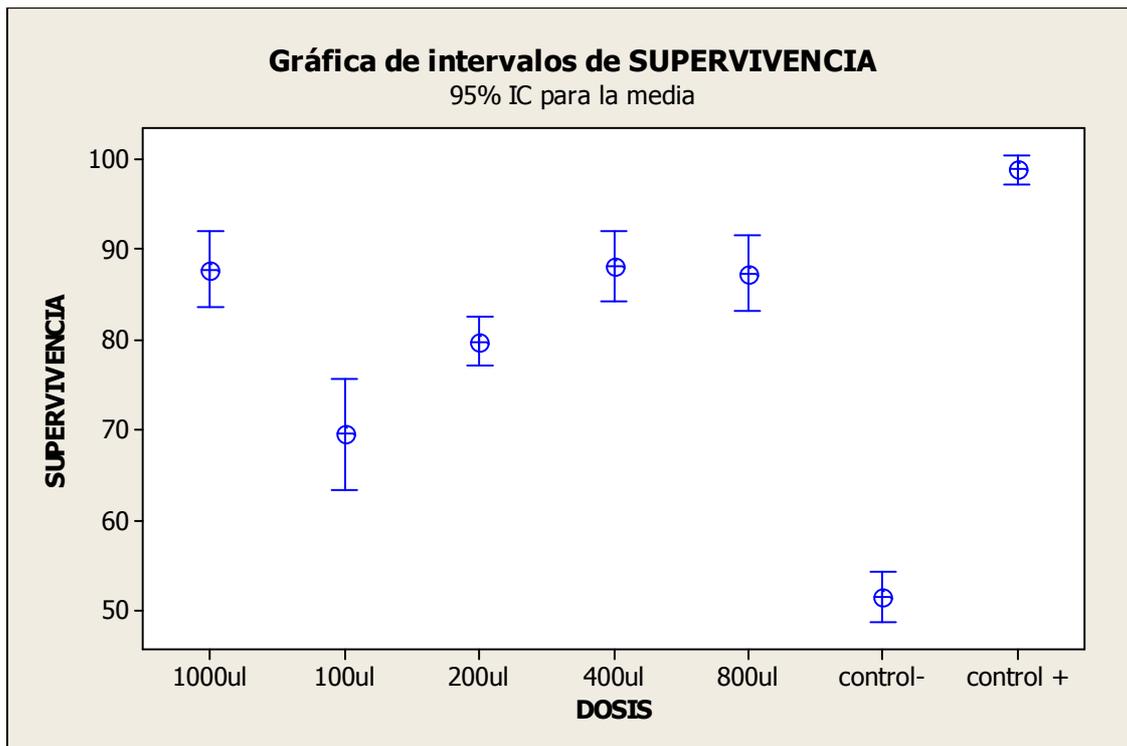


Figura N° 18. Relacion entre dosis y supervivencia (Barras verticales indican intervalos de confianza y barras horizontales la media)

En el control positivo solo se evaluó nauplios sin la adición bacteriana, los resultados demostraron una supervivencia de 98.75% a comparación del control negativo donde los nauplios fueron infectados con la LD_{50} y no fueron tratados con bacteriófagos, el resultado evidenció una supervivencia de 51.5 % estos resultados evidencian como la tasa de supervivencia aumenta o disminuye ante la exposición de la cepa.

Al realizar el tratamiento fágico se observó que al usar 400 μ l de bacteriófago se obtuvo la una supervivencia del 88%, obteniendo resultados similares al usar 800 μ l μ y 1000 μ l de volumen fágico en los cuales se obtuvieron supervivencias de 87.25% y 87.75% respectivamente.

Al usar 100 μ l de bacteriófagos observamos una tasa de supervivencia de 69.50% resultado que evidencia una disminución en el conteo de sobrevivientes a comparación

del control positivo o a diferencia de usar 400 μ l, 800 μ l μ y 1000 μ l de bacteriófago como tratamiento. (Tabla N° 9).

Tabla N° 9. Cuento de la supervivencia de nauplios de *Artemia franciscana* infectadas con la LD₅₀ y tratadas con diferentes dosis del bacteriófago Vat1.

TIEMPO DE TRATAMIENTO	ARTEMIA (nauplios.100ml ⁻¹)		BACTERIA (2.1 x 10 ¹⁰ UFC/ml)	FAGO (UFP/mL)	REPETICIONES				PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA CON TRATAMIENTO FAGICO	SUPERVIVENCIA SIN TRATAMIENTO FAGICO
	Control +	Control -			98	98	100	99		
48 horas	100	100	0	0	98	98	100	99	-	98.75
48 horas	100	100	700µl	0	53	52	49	52	-	51.50
48 horas	100	100	700µl	100 µl (2x10 ⁸)	71	68	65	74	69.50	-
48 horas	100	100	700 µl	200 µl (4x10 ⁸)	80	79	78	82	79.75	-
48 horas	100	100	700 µl	400 µl (8x10 ⁸)	86	86	89	91	88.00	-
48 horas	100	100	700 µl	800 µl (1.6x10 ⁹)	86	87	85	91	87.25	-
48 horas	100	100	700 µl	1000µl (2x10 ⁹)	86	90	85	90	87.75	-

6.8.2. Ensayo 2: Evaluación de la eficacia del tratamiento con bacteriófagos en diferentes etapas del progreso de la infección

La supervivencia en todas las UE que fueron sometidas al tratamiento con el bacteriófago Va1 en diferentes tiempos de comenzada la infección fueron mayores a 62%.

Los nauplios sin infectar presentan una supervivencia del 99.50% a comparación de los controles infectados con la LD₅₀ de *V. alginolyticus* cuya supervivencia es del 50.50 % a las 48 horas.

Utilizando el software Minitab 16 se analizaron los resultados de supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* tratados con una dosis de 400µl del bacteriófago Va1 a diferentes tiempos de comenzada la infección, los resultados presentan una distribución normal utilizando el estadístico de Kolmogorov ($p > 0.05$), además se realizó el análisis de igualdad de varianzas en el cual se utilizó la prueba de Bartlett ($p=0.873$, $p > 0.05$) a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto los resultados presentan varianzas iguales.

Se realizó la prueba de Anova y se obtuvo un $p < 0.05$ indicando diferencias significativas en los resultados a un nivel de confianza del 95%.

Finalmente se realizó la prueba de Tukey para determinar qué tratamientos son diferentes y qué tratamientos dan como resultado valores similares, en esta prueba se consideró un nivel de confianza del 95%.

En la tabla N° 10 podemos observar que al utilizar una dosis de 400 µl del bacteriófago a un tiempo de 20 y 30 horas de comenzada la infección las medias de los resultados no presentan una variación elevada lo que indica que no hay diferencia significativa en el tratamiento fágico a estos tiempos por lo que ambos pertenecen a la agrupación D. Además se observa que el tratamiento a las 3 horas de comenzada la infección con una dosis de 400 µl del bacteriófago dio como resultado una tasa de supervivencia casi igual

al control positivo, por lo que se agrupan como A, lo que evidencia su eficacia como tratamiento profiláctico a diferencia de cuando usamos el tratamiento fágico a las 40 horas de comenzada la infección, donde se observó resultados similares al control negativo agrupándose como E, demostrando poca eficacia en el tratamiento de una infección que ya se encuentra muy desarrollada.

Tabla N° 10. Diferencias entre los tratamientos mediante la prueba estadística Tukey

TIEMPO	N	Media	Agrupación
control +	4	98.	A
3 h	4	94.500	A
10h	4	86.250	B
15h	4	77.750	C
20h	4	66.000	D
30h	4	61.000	D
40h	4	54.000	E
control -	4	50.750	E

Se observa que a las 3, 10, 15, 20 y 30 horas de comenzada la infección empleando 400 µl del bacteriófago, se obtuvo resultados prometedores de supervivencia, asimismo cuando se emplea la dosis de 400 µl del bacteriófago a las 40 horas de comenzada la infección, hay una disminución en la tasa de supervivencia ;además, se aprecia gráficamente los valores de las medias de los supervivientes así como también los intervalos de confianza al 95%; además, al adicionar bacteriófago a las 3 horas de iniciada la infección los resultados de las medias de supervivencia son similares al control +, y al usar el bacteriófago a las 40 horas la media es similar a la del control - (Figura N°19).

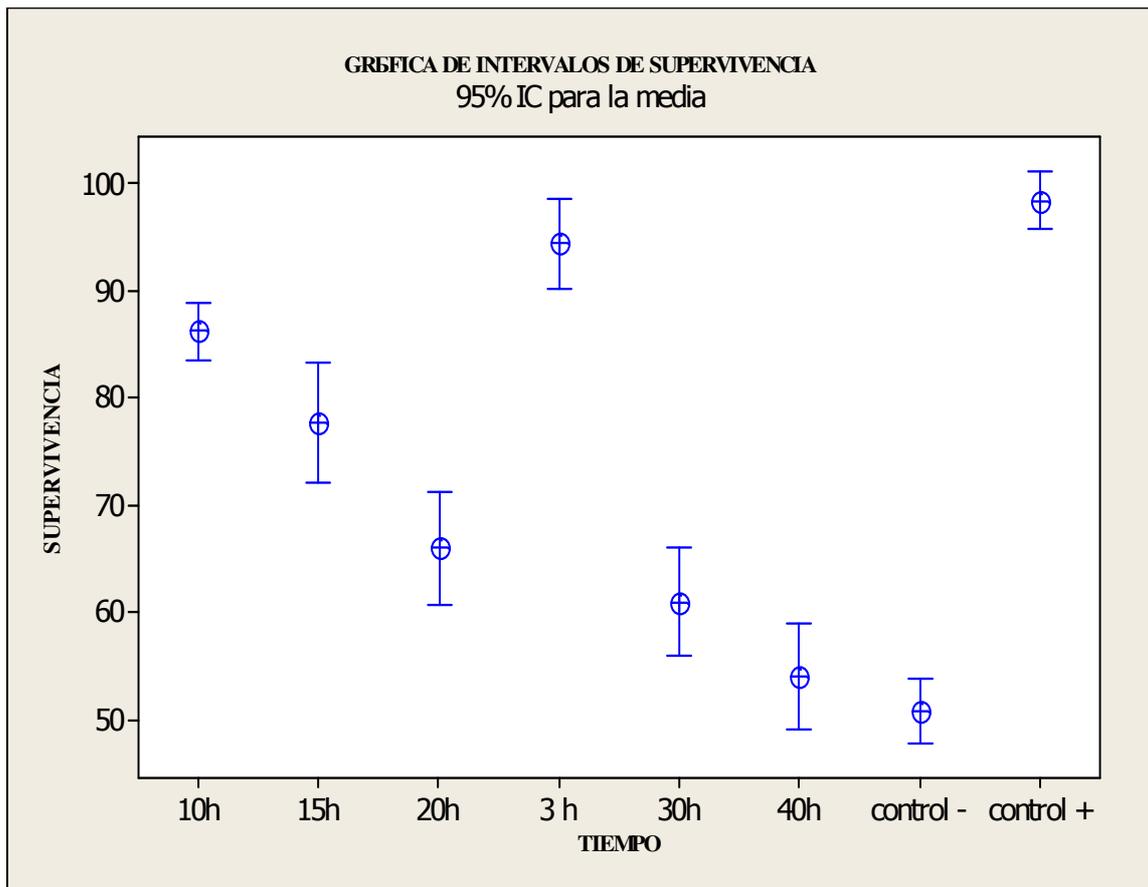


Figura Nº 19. Intervalos de confianza: Se observa como el tiempo de inoculación del bacteriófago Va1 influye en la supervivencia de nauplios de *A. franciscana*.

En el control positivo se observa una supervivencia de 99.50% a comparación del control negativo que presentó una supervivencia de 50.75 %, se realizó el tratamiento fágico en diferentes tiempos observando que al usar 400 µl a las 3 horas de comenzada la infección se obtiene una supervivencia del 94.50%, asimismo se obtuvo resultados de 86.25%, 77.75 %, 66.00%, 61.00 % y 54.00 % al usar 400 µl del bacteriófago a los 10, 15, 20, 30 y 40 horas de comenzada la infección respectivamente(TablaNº11).

Tabla Nº 11. Cuento de la supervivencia de nauplios de *Artemia franciscana* infectadas con la LD₅₀ y tratadas en diferentes tiempos de comenzada la infección con el bacteriófago Va1.

TIEMPO DE INOCULACION DEL BACTERIOFAGO POST INFECCIÓN (horas)	ARTEMIA (nauplios.100ml ⁻¹)		BACTERIA (2.1 x 10 ¹⁰ UFC/ml)	FAGO (8x10 ⁸ UFP/ml)	REPETICIONES				PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA CON TRATAMIENTO FAGICO A LAS 48 HORAS	SUPERVIVENCIA SIN TRATAMIENTO FAGICO A LAS 48 HORAS
	Control +	Control -			SUPERVIVENCIA A LAS 48 HORAS CON TRATAMIENTO FAGICO					
-	100	100	0	0	99	100	96	99	-	99.50
-	100	100	700µl	0	52	51	48	52	-	50.75
3	100	100	700ul	400ul	91	94	96	97	94.50	-
10	100	100	700ul	400ul	84	86	87	88	86.25	-
15	100	100	700ul	400ul	76	74	79	82	77.75	-
20	100	100	700ul	400ul	66	70	62	66	66.00	-
30	100	100	700µl	400ul	62	58	65	59	61.00	-
40	100	100	700ul	400ul	53	50	56	57	54.00	-

7. DISCUSIÓN

Ronda *et al.*, (2003) consideran a los bacteriófagos como una alternativa promisoría en el tratamiento de enfermedades en sistemas de cultivos acuícolas ya que estos son capaces de infectar una gran diversidad de cepas bacterianas en sistemas de cultivos. En este experimento a partir de la cepa ATCC de *Vibrio alginolyticus* se aisló 1 bacteriófago, observándose una gran capacidad lítica lo que concuerda con lo expuesto por Kalatzis (2016) quien aisló bacteriófagos altamente líticos contra *Vibrio alginolyticus* a partir de agua de mar.

Sorgeloos, (1992) reporta que para la reducción de carga bacteriana en nauplios de *Artemia franciscana* se pueden emplear antibióticos como el cloranfenicol, y así lograr nauplios axénicos, si bien su efectividad para el control bacteriano está demostrada, los antibióticos no fueron considerados como alternativa en la desinfección de nauplios *Artemia franciscana* debido a que pueden generar resultados falsos positivos, dado que pueden quedar restos de ellos y evitar la infección por la cepa de *Vibrio alginolyticus*, además Defoirdt *et al.*, (2007) reporta que el uso de antibióticos genera resistencia bacteriana, estos son factores que pueden interferir en la realización y obtención de resultados en este experimento.

Para la reducción de carga bacteriana asociada a nauplios de *Artemia franciscana* se utilizó un desinfectante altamente efectivo llamado Cloruro de Benzalconio con el que se evidenció una gran disminución de bacterias (99%) asociadas a los nauplios de *Artemia franciscana* en comparación del control, lo que quedó corroborado por Martínez (2013) que reporta una desinfección total de carga bacteriana utilizando una concentración de 1% de Cloruro de Benzalconio durante 15 segundos.

En los estudios de Immanuel *et al.*, (2004); Campa (2010) y Lomelí (2011) sobre los efectos de bacteriófagos en terapia fágica, así como el efecto de bacterias antagonistas,

evaluación de compuestos activos y bacterias probióticas, la mortalidad es utilizada como principal indicador en las evaluaciones.

Se encontró que las mejores condiciones para el mantenimiento de nauplios de *Artemia franciscana* fue el empleo de unidades experimentales con 100 ml de agua de mar estéril, suplementada con peptona a una densidad de 100 ml, en comparación con lo expuesto por Lomelí (2011) y Martínez (2013) donde se utilizó agua de mar artificial estéril debido a que el agua de mar natural estéril causaba la mortalidad de los nauplios, esto probablemente se debió a que el agua de mar natural estéril no fue enriquecida con peptona a comparación de este ensayo, utilizando estas condiciones se realizaron los ensayos de infección y fagoterapia.

En lo referente al modelo de infección, no se han reportado protocolos establecidos para inducir una vibriosis en laboratorio es así que en este experimento se tomó como referencia los modelos realizados por Saulnier *et al.*, (2000); Martínez (2013) y Lomelí (2011).

Se indujo vibriosis en nauplios de *Artemia franciscana* con una dosis de 700 μ l (2.1×10^{10} UFC/ml), ya que fue la que produjo el 50% de mortalidad en las unidades experimentales de *Artemia franciscana* a las 48 horas de iniciada la infección, dato que coincide con lo expuesto por Martínez (2013). En esta tesis se realizó la cinética de infección para estimar como disminuye la supervivencia de nauplios a medida que avanza el tiempo, no se han reportado muchos trabajos donde realicen la cinética de infección en diferentes tiempos de comenzada la infección, se tomó como referencia lo expuesto por Lomelí (2011) que tomó los datos de mortalidad en nauplios de *Penaeus vannamei* a las 6, 12, 34,36, 48 y 72 horas debido que se consideró el 50% de mortalidad a las 72 horas, a diferencia de nuestro estudio que tomó los conteos de supervivencia a las 3, 6, 15, 20, 30, 40 y 48 horas, esto se dio debido a que la cepa de *Vibrio alginolyticus* llega a su fase logarítmica entre las 3 y 8 horas por este motivo, se tomaron los conteos

a las 3, 6, 15 y 20 horas y a partir de las 20 horas los conteos de supervivencia fueron cada diez horas.

Se obtuvo que la cepa de *Vibrio alginolyticus* generó mortalidades significativas ($p < 0.05$) lo que concuerda con lo descrito por Panos *et al.*, (2016) que reportó la patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* en animales acuáticos y en el hombre. Además Zavala *et al.*, (2005) reportó patogenicidad de la cepa en larvas de peces y Negrete *et al.*, (1989) en alimento vivo.

FAGOTERAPIA

Se han realizado trabajos con bacteriófagos en acuicultura que permiten darnos un mayor conocimiento sobre su aplicación y como es que funcionan en un sistema *in vivo* tal es el caso de Lomelí (2011); Martínez (2013) y Nakai y Park (2002); en el presente trabajo se realizó una evaluación de la aplicación de los bacteriófagos como agentes terapéuticos contra *Vibrio alginolyticus*.

Se evaluó el comportamiento de los bacteriófagos utilizando diferentes dosis y adicionándolos en diferentes tiempos de comenzada la infección.

En el primer ensayo se evaluó diferentes dosis del bacteriófago durante la infección de nauplios de *Artemia franciscana* con *Vibrio alginolyticus* dando como resultado diferencias significativas ($p < 0.05$) en las tasas de supervivencia. Se registró una supervivencia de 88%, 87.25% y 87.75% utilizando dosis de 400 μ l, 800 μ l y 1000 μ l respectivamente lo que muestra una supervivencia significativa en las dosis aplicadas, lo cual difiere con lo descrito por Lomelí (2011), quien probó dosis de bacteriófagos de 100 μ l, 200 μ l, 400 μ l y 800 μ l causando una mortalidad del 100 % de nauplios al usar 400 y 800 μ l de fagos, debido probablemente a las exo y endotoxinas liberadas por la lisis celular bacteriana según Calendar (2006).

Como segundo ensayo se evaluó el efecto del tiempo de la aplicación del bacteriófago Va1 sobre los nauplios expuestos a la LD₅₀ de *Vibrio alginolyticus*, se observó diferencias

significativas en la tasa de supervivencia cuando se adicionó el fago a las 3, 10, 15, 20 y 30 horas post-infección, es importante resaltar que adicionando el bacteriófago a las 20 y 30 horas se obtuvo una tasa de supervivencia mayor a 62% , resultado que difiere significativamente ($p < 0.05$) de aquellos nauplios expuestos solamente a la bacteria (control -), encontrándose un efecto protector al aplicar los fagos hasta las 20 y 30 horas de comenzada la infección; lo que concuerda con lo expuesto por Lomelí (2011) quien encontró un efecto protector al adicionar dosis del bacteriófago a las 24 y 36 horas, reportándose que en todos los tiempos la supervivencia fue mayor al 63% encontrándose un efecto profiláctico y correctivo en la aplicación de los bacteriófagos; además de lo expuesto por Nakai *et al.*, (1999) y Park *et al.*, (2000), en los que se reportó un efecto protector de los bacteriófagos con un tiempo máximo de aplicación de 24 horas, siendo ese resultado similar a lo expuesto en esta tesis.

Park *et al.*, (2000) reporta un efecto benéfico utilizando bacteriófagos como tratamiento profiláctico en infecciones experimentales, encontrando a la fagoterapia como una solución aplicable para el control de vibriosis, ya que los bacteriófagos pueden ser aislados de los mismos ambientes de cultivo, requiere una sola dosis de aplicación y no generan cepas resistentes a comparación de los antibióticos.

8. CONCLUSIONES

- Se logró aislar y purificar el bacteriófago Va1 específico contra *Vibrio alginolyticus*.
- La cepa de *Vibrio alginolyticus* ATCC ® 33787 es un modelo adecuado para reproducir la vibriosis en nauplios de *Artemia franciscana* ya que 700 µl (2.1 x 10¹⁰ UFC/ml) de la cepa en fase logarítmica puede causar la muerte del 50% de la población de cada unidad experimental (DL₅₀).
- Los bacteriófagos en la concentración de 8x10⁸ UFP/ml logran reducir la infección de los nauplios con *Vibrio alginolyticus*.
- El uso de bacteriófagos es efectivo como tratamiento preventivo en la vibriosis inducida por *Vibrio alginolyticus* demostrando que su uso reduce la mortalidad significativamente hasta las 20 horas de comenzada la infección.

9. RECOMENDACIONES

- Desarrollar un protocolo para la reproducción de vibriosis a nivel de laboratorio.
- Realizar la evaluación de la susceptibilidad de los nauplios expuestas a diferentes valores de temperatura, oxígeno, luz, alimentación, para estimar que factores están relacionados con una mayor carga bacteriana en el alimento vivo.
- Realizar experimentos posteriores con diferentes cepas de *Vibrio alginolyticus* ya que el desarrollo de la infección dependerá de la patogenicidad de la cepa, ya que no todas las cepas pertenecientes a una misma especie son necesariamente patógenas.
- Hacer un estudio de la presencia de genes que codifican para la producción de endo y exotoxinas como parte de la interacción fago – bacteria para así evitar resultados falsos positivos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic y Clinical Pharmacology y Toxicology*.2005. 96(1):271–281.
- Ackermann, H. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2001. Brief review. *Arch Virol*. 2001. 146(1): 843-857.
- Ahne W. Serological techniques currently used in fish virology. *Dev. Biol. Stand*. 1981. 49(1):3–27.
- Ahne, W.; Bjorklund, H.V.; Essbauer, S.; Fijan N.; Kurath G. y Winton J.R. Spring Viremia of Carp (VPC). *Dis. aquat. Org*. 2002. 52(1):261-272.
- Akazawa, H. Bacterial disease of marine fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*. 1968. 31(1):271-272.
- Baffone, W.; Pianetti, A.; Bruscolini, F.; Barbieri, E. y Citterio, B. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *International Journal of Food Microbiology*. 2000.54(2): 9– 18
- Balbuena, E. Manual Básico De Sanidad Piscícola .FAO, 2011.
- Balcazar, J.; De Blas, L.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, I.; Vendrell, D.; Muzquiz, D. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol*. .2006.114 (3-4):173-186.
- Baross, J.; Liston, J. y Morita, R. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other vibrio bacteriophages in marine samplest. *Applied and Environmental Microbiology*.1978. 36(3):492-499.

- Baumann, P.; Furnis, A. y Lee, J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editores. Williams and Wilkins. Baltimore-London. 1984.
- Bernhardt, T.; Wang, I.; Struck, D. y Young, R. Breaking free; "Protein antibiotics" and phage lysis. *Research in microbiology*. 2002. 153(8):493-501.
- Biswas, B.; Adhya, S.; Washart, P.; Paul, B.; Trostel,; Powel, B.; Carlton, R.; Bjorlund, H.; Bondestam, J. y Bylund, G. Residues of Oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*.1990. 86(1):359-367.
- Brisou, J.; Tysset, C.; Rautlin De la Roy, Y. y Curcier, R. Marine bacteria specially Micrococcaceae. *Journal. Genetic Microbiology*. 1965. 41(1):23.
- Bullock, G. Book 2B: Identification of Fish Pathogenic Bacteria. Editores: Snieszko S. y Axelrod, H. *Diseases of Fishes*. Hong Kong. pp. 40. 1971.
- Buschmann, A.; Riquelme, V.; Hernández, M.; Varela, D.; Jiménez, J.; Henríquez, L.; Vergara, P.; Guiñez, R. y Filún, L. A review of the impacts of salmon farming on marine coastal ecosystems in the southeast pacific. *ICES Journal of Marine Science*. 2006. 63(1):1338-1345.
- Cabello, F. Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Rev Méd Chile* .2004. 132(1):1001-1006.
- Cabello, F. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* .2006. 8(1):1137-1144.
- Calendar, R. *The bacteriophages*. 2nd edition. Oxford University Press, EUA, 746 p. 2006.

- Capone, D.; Weston, D.; Miller, V. y Shoemaker, C. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*. 1996. 145(1):55-75.
- Carnevia, D.; Letamendía, M.; Perretta, A. y Delgado, E. Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), Diagnosticadas en peces ornamentales de Uruguay. *Veterinaria*. 2013. 46(1):27-32.
- Colorni, A.; Paperna, I. y Gordin, H. Bacterial infections in gilt-head sea bream *Sparus aurata* cultured at Elat. *Aquaculture*. 1981. 23(4):257-267.
- Defoirdt, T.; Boon, N.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W. y Bossier, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.* 2007. 25(1):472–479.
- Dobbins, A.; George, J.; Basham, D.; Ford, M.; Pedulla, M.; Lawrence, J.; Hatfull, G. y Hendrix, R. Complete genomic sequence of the virulent Salmonella bacteriophage SP6. *Journal of bacteriology*. 2004. 186(7):1933-1944.
- Dorval, C.; Parisien, A. y Lan, C. Production and application of bacteriophage and bacteriophage-encoded lysins. *Recent Patents on Biotechnology*. 2009. 3(1): 1-9.
- Erdogan, F. y Olmez, M. Effects of enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in angel fish, *Pterophyllum scalare*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009. 8(8): 1660-1665.
- Fournier, J. y Quilici, M. Infections à vibrions non cholériques. *Maladies infectieuses*. 2002. pp.1-7.
- Fruciano, D. Phage as an antimicrobial agent: D'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the west. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2007.18(1):19-26.

- Garcia Noriega, Ernesto. “Evaluación del producto fágico Listextmp100 en la eliminación de biofilms de *Listeria monocytogenes*”. Asesores: Pilar García, Ana Rodríguez. Tesis de Maestría. Universidad de Oviedo, España, 2014.
- Gilmour, A. Characteristics of marine vibrios isolated from fish tanks. *Aquaculture*. 1977. 11(1):51-62.
- Gomez, J.; Villamil, L.; Lemos, M.; Novoa, B. y Figueras, A. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. 71(1): 98-104.
- Gómez, J.; Villamil, L.; Lemos, M.; Novoa, B. y Figueras, A. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl Environ Microbiol*. 2005. 71(1):98–104.
- Goldman, E.; Green, LH. Practical handbook of microbiology. CRC Press Boca Raton FL, USA. 2009.
- Gutreuter, S. Considerations for estimation and interpretation of annual growth rates. In Age and Growth of Fish. Editors:Summerflet, R. y Hall, G. 1987. pp. 115-126. Iowa State University Press. Ames, Iowa, Estados Unidos.
- Grave, K.; Lingaas, E.; Bangen, M. y Rønning, M. Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in norway in 1992 and 1996. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.1999. 43(1):243-252.
- Gopal, S.; Otta, S.; Kumar, S.; Karunasagar, I.; Nishibuchi, M. y Karunasagar, I. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int J Food Microbiol*. 2005. 102(1): 151–159.

- Gómez-Gil, B.; Roque, A. y Mazari, A. Infección oral experimental de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* a través de bioencapsulación de *Vibrio parahaemolyticus* en *Artemia Franciscana*. *Ciencias Marinas*. 2000. 26(1):65-77.
- Guttman, B.; Raya, R. y Kutter, E. Basic Phage Biology. In: Bacteriophages: biology and applications. Editores: Kutter, E. y Sulakvelidze, A. 2005. Florida. EEUU.pp. 42-79.
- Hanlon, G. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment Of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007. 30(2): 118-128.
- Hernandez Magadan,Alfonso. “Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea”. Asesor: Juan Suarez. Tesis de Doctorado. Universidad de Oviedo, España, 2007.
- Husevag, B.; Lunestad, B.; Johannsen, P.; Enger, O. y Samuelsen, O. simultaneous occurrence of *Vibrio salmonicida* and antibiotic resistant bacteria in sediments at abandoned aquaculture sites. *Journal of Fish Diseases*.1991. 14(1):631-640.
- Immanuel, G.; Vincybai, V.; Sivaram, V.; Palavesam, A. y Marian, M. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*. 2004. 236(1): 53-65.
- Léger, P. y P. Sorgeloos. Optimized feeding regimes in shrimp hatchery. Editor: Fast, A. y Lester, L. *Marine shrimp culture: principles and practices*. Capitulo 9. *Elsevier Science Publishers*. 1992. U.S.A. pp. 225-244.
- Léger, P.; Bengtson, D.; Simpson, K. y Sorgeloos, P. The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 1986. 24(1):521-623.

- Loc-Carrillo, C. y Abedon, S. Pros and cons of phage therapy bacteriophage. *Landes Bioscience*. 2011. 1(2):111-114.
- Lomelí, C. O. “La fagoterapia como estrategia para reducir la mortalidad por Vibriosis en larvas de camaron blanco *Litopenaeus vannamei*”. Asesor: Sergio Martínez. Tesis de Maestría. IPN-CICIMAR. La Paz B.C.S. 2011.
- Maniloff, J. y Ackermann, H. Taxonomy of bacterial viruses: Establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales. *Arch. Virol.* 1998. 143(10):2051–2063.
- Manual Básico De Sanidad Piscícola .FAO, 2003.
- Martinez, S y Hipolito, A. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the Vibriosis of brine shrimp .*Aquaculture*. 2013. 1(1):120-124.
- Ministerio de la Produccion – Perú 2011
- Ministerio de la producción (Perú- 2014)
- Muroga, K.; Higashi, M. y Keitoku, H. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*. 1987(1); 65:79–88.
- Nakai, T. y Park, SC. bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*. 2002. 153(1):13-18.
- Nakai, T.; Sugimoto, R.; Park, K.H.; Matsuoka, S.; Mori, K.; Nishioka, T. y Maruyama, K. Protective effects of bacteriophage on experimental *lactococcus garviae* infection in yellowail. *Diseases Aquatic Organism*. 1999. 37(1):33-41.

- Negrete, P. y Romero, J. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus Carpio*, con bacterias aisladas de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas. *Hidrobiologica*.1998. 8(2):107-116.
- Negrete, P.; Monroy, C. y Romero, J. Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* y *Tubifex*) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Vet. Méx.* 1989.39 (3): 255-268.
- Orozco, M. Manejo bacteriano del cultivo de *Artemia franciscana* kellogg, 1906: aislamiento, caracterización y efecto en el cultivo larvario de *Artemia*, de bacterias heterótrofas aerobias asociadas a quistes comerciales de *Artemia*. Asesores: Ricardo Vázquez, GopalMurugal. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC, México, 2001.
- Kalatzis, P.; Bastías, R.; Kokkari, C. y Katharios, P. Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Gm1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLOS ONE*. 2016. 11(3):1-18
- Park, C. y Nakai, T. Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in Ayu *Plecoglossus Altivelis*. *DisAquatOrg*. 2003. 53(1):33-39.
- Pillay, T. Aquaculture and environment. *Fishing News book*. 1992. 48-98. Oxford.
- Platt, M.; Rich, M. y Mclaughlin, J. The role of chitin in the thermoprotection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Food Protection*. 1995. 58(5): 513-514.
- Quiroz, G.E. "Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* sp. Durante la eclosión de *Artemia*", Asesor: Sergio Martínez. Tesis de Maestría. IPN-CICIMAR. La Paz B.C.S. 2005.

- Rico-Mora, R. y Voltolina, D. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *J Invertebr Pathol.* 1995. 66(2):203–204.
- Ronda, C.; Vázquez, M. y López, R. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. *Aquatic.* 2003. 18(1):3-10.
- Russel, M. Filamentous phage assembly. *Molecular microbiology.*1991. 5(7):1607–1613.
- Sales, J. y Janssens, G. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources.* 2003. 16(1): 533-540
- Samuelsen, O.; Lunestad, B.; Husevag, B.; Holleland, T. y Ervik, A. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. *DisAquatOrg.* 1992. 12(1):111-119.
- Santiago, M.; Espinoza, A. y Bermúdez, M. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2009. 40(3):22-32.
- Santos, Y.; Huntly, P.; Turnbull, A. y Hastings, T. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in United Kingdom. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.* 1992. 12(6):209-210.
- Sarmiento, J. y Rodriguez, A. Lerneosis en alevinos de *Prochilodus magdalenae*, Prochilodontidae, cultivados en laboratorio. *Rev. Intropica.* 2013. 8(1):99-103.
- Saulnier, D.; Haffner, P.; Goarant, C.; Levy, P. y Ansquer, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture.* 2000. 191(3):133–144.

- Sedano, J.; Zorrilla, I.; Moriñigo, M.; Balebona, M.; Vidaurreta, A.; Bordas, M. y Borrego, J. Microbial origin of the abdominal swelling affecting farmed larvae of gilt-head seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture research*. 1996. 27(5):323–333.
- Snoussi M, K Chaieb, Mahmoud y A Bakhrouf. 2006. Quantitative study, identification and antibiotics sensitivity of some Vibrionaceae associated to a marine fish hatchery. *Annals of Microbiology*. 56(4): 289-293.
- Stephen, S.; Vaz, A.; Chandresshekar, I. y Rao, K. Characterization of *Vibrio alginolyticus* (*Berneckea alginolyticus*) isolated from fauna of arabian sea. *Ind. Med. Res.* 1978. 68(1):7-11.
- Sulakvelidze, A.; Alavidze, Z. y Morris, G. Bacteriophage therapy Antimicrobial. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2001. 208(1):649-659.
- Su, Y. y Liu, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 2007.24 (6): 549-558.
- Vallat, B. Organización Mundial de Sanidad Animal. El papel de la OIE, en las enfermedades de animales acuáticos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. México. 2001. 2(1):19-24.
- Wang, I.; Deaton, J. y Young, R. Sizing the holin lesion with an endolysin-betagalactosidase fusion. *J Bacteriol.* 2003. 185(3): 779–787.
- Wolff, M. Uso y abuso de Antibióticos. Momento de su evaluación, más allá del ser. *Revistamédica de Chile*. 2004. 132(8):909-911.
- Zavala, A.; Quiñones, E. y Vázquez, C. La vida oscura de *Vibrio alginolyticus*. *Revista Digital Universitaria*. 2005 .6 (4):1-7.

11. ANEXOS

Conteo de las UFP/mL a las 3, 6 y 8 horas.

Tabla N° 12. Recuento del número de UFC/mL a las 3 horas de crecimiento de *V. alginolyticus*

Dilución	Colonias contadas en placa 1	Colonias contadas en placa 2	Colonias contadas en placa 3
10^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-2}	Incontables	Incontables	incontables
10^{-3}	365	384	376
10^{-4}	41	35	42
10^{-5}	2	5	5
10^{-6}	0	0	0
10^{-7}	0	0	0
10^{-8}	0	0	0
10^{-9}	0	0	0
10^{-10}	0	0	0
10^{-11}	0	0	0

El resultado de UFC/ml a las 3 horas es 1.18×10^7 UFP/ml.

Tabla N° 13. Recuento del número de UFP/mL a las 6 horas de crecimiento de *V. alginolyticus*

Dilución	Colonias contadas en placa 1	Colonias contadas en placa 2	Colonias contadas en placa 3
10^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-4}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-5}	incontables	Incontables	incontables

10^{-6}	467	452	437
10^{-7}	38	42	36
10^{-8}	2	4	4
10^{-9}	0	0	0
10^{-10}	0	0	0
10^{-11}	0	0	0

El resultado de UFC/ml a las 6 horas es 1.16×10^{10} UFP/ml

Tabla N° 14. Recuento del número de UFP/mL a las 8 horas de crecimiento de *V. alginolyticus*

Dilución	Colonias contadas en placa 1	Colonias contadas en placa 2	Colonias contadas en placa 3
10^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-4}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-5}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-6}	Incontables	Incontables	Incontables
10^{-7}	Incontables	incontables	Incontables
10^{-8}	incontables	incontables	incontables
10^{-9}	406	450	443
10^{-10}	38	42	46
10^{-11}	6	4	4

El resultado de UFC/ml a las 8 horas es 1.26×10^{13} UFP/mL.