

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



TRATAMIENTO DE BACTERIAS PATOGENAS DE *Vibrio harveyi* EN
MUESTRAS REFRIGERADAS Y CRIOPRESERVADAS DE ESPERMA DE
ABULON ROJO *Haliotis rufescens*

T E S I S PROFESIONAL

QUE PRESENTA

JOSE ALBERTO MIRANDA VELASCO

APROBADO POR:



DRA. CARMEN GUADALUPE PANIAGUA CHAVEZ
PRESIDENTE



DR. JOHN BUCHANAN
1ER. VOCAL



DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
2DO. VOCAL



M.C. EUSEBIO BARRETO ESTRADA
3ER. VOCAL



M.C. MIGUEL HUMBERTO CARRILLO MENDIVIL
SECRETARIO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



**TRATAMIENTO DE BACTERIAS PATOGENAS DE *Vibrio harveyi* EN
MUESTRAS REFRIGERADAS Y CRIOPRESERVADAS DE ESPERMA DE
ABULON ROJO *Haliotis rufescens***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

JOSE ALBERTO MIRANDA VELASCO

Ensenada, Baja California.

Junio de 2007

DEDICATORIA

Dra. Carmen Paniagua Chávez, por sus consejos, tiempo y dedicación, pero sobre todo, por toda la confianza que deposito en mí.

AGRADECIMIENTOS

Beca Semarnat /CONACYT. Proyecto No. Semarnat 2002-co1-00393

A mis asesores:

Dr. John T. Buchanan, por todo el interés, ayuda brindada y tiempo irremplazable que dedicó a este trabajo.

M. en C. Humberto Carrillo Mendivil, por la asesoría técnica, consejos y todo el tiempo invertido en este trabajo, y durante todo mi formación durante la carrera.

Dr. Faustino Camarena Rosales, por todo el tiempo invertido en la edición del trabajo escrito y consejos prácticos durante la carrera.

M. en C. Eusebio Barreto, por todo el tiempo invertido en la edición del trabajo escrito.

Soporte técnico:

- PhD. Kelly Colvin, por su ayuda técnica en el desarrollo de este trabajo.
- Dr. Miguel Ángel Del Río Portilla, por su ayuda, consejos y por la asesoría en la parte escrita.
- Dr. Jorge Cazares Martínez (Laboratorio de Patología, CICESE), por su disponibilidad y apoyo de su equipo de trabajo.
- Dr. Galdi Hernández, por sus consejos técnicos.
- M. en C. Yanet Guerrero, por su ayuda técnica.
- Dr. Rebeca Vásquez del Instituto de Sanidad Acuícola, A.C. (ISA).

Personal:

A mi madre Leticia Velasco, por ser mi inspiración y ejemplo a seguir en todos los aspectos de mi vida.

A mi novia Guillermina Ortiz, por nunca dejarme caer sin importar la adversidad del momento.

Gracias a todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron para la realización de este trabajo.

A TODOS USTEDES GRACIAS!

RESUMEN

Resumen de la tesis de **José Alberto Miranda Velasco** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en **Biología**. Ensenada, Baja California, México. Junio de 2007.

Título: TRATAMIENTO DE BACTERIAS PATOGENAS DE *Vibrio harveyi* EN MUESTRAS REFRIGERADAS Y CRIOPRESERVADAS DE ESPERMA DE ABULON ROJO *Haliotis rufescens*



Dra. Carmen C. Paniagua Chávez

La conservación de los recursos de especies acuáticas, es de gran utilidad en el desarrollo de líneas génicas y conservación, entre otros. Sin embargo, un aspecto importante que se debe considerar en la conservación de recursos genéticos es la posibilidad de contaminación cruzada en las muestras de esperma almacenadas en los bancos del germoplasma. La bioseguridad es un problema importante hoy en día y la necesidad de mantener un banco de germoplasma de especies acuáticas libre de patógenos es primordial. Los objetivos de este trabajo fueron examinar: 1) la viabilidad y el crecimiento de bacterias patógenas de *Vibrio harveyi* inoculado en muestras refrigeradas (4°C) y criopreservadas (-196°C) de esperma de abulón rojo *Haliotis rufescens*; 2) el efecto citotóxico de antibiótico/antimicótico (A/A) en la viabilidad del esperma refrigerado o criopreservado; 3) el mejor tratamiento para la eliminación de bacterias patógenas de las muestras de esperma; y 4) técnica de diagnóstico para detectar bacterias patógenas en muestras de esperma.

Para esta investigación, las muestras de esperma de abulón rojo fueron resuspendidas en agua de mar e inoculadas con *Vibrio harveyi* con o sin A/A y fueron almacenadas en un refrigerador a 4°C o criopreservadas en un congelador programable con una tasa de congelamiento de a 1.0°C/min hasta alcanzar -30°C. Las muestras fueron mantenidas a esta temperatura por 5 minutos antes de ser depositadas en un tanque con nitrógeno líquido (-196°C). Las muestras refrigeradas fueron trasladadas a la Universidad de San Diego California (UCSD) donde se evaluó la supervivencia y crecimiento bacteriano, citotoxicidad de A/A en esperma y la eficacia de A/A para eliminar o para reducir la densidad bacteriana. Alícuotas de cada tratamiento fueron utilizadas para evaluar movilidad del esperma después de las primeras 24, 48 y 72 horas. Las muestras criopreservadas fueron descongeladas en un baño maría a 45°C por ~8 segundos después de 15 días de almacenamiento fueron evaluadas al igual que las muestras refrigeradas.

Diferencias significativas fueron encontradas en la movilidad del esperma refrigerado entre las tres concentraciones del A/A, donde la concentración más alta (15µl/mL) redujo perceptiblemente el porcentaje de movilidad. Después de 24 h de almacenamiento a 4°C con 5µl/mL de A/A el esperma conservó un alto porcentaje de movilidad (~70%) y bajo crecimiento bacteriano, esto sugiere que la conservación en refrigeración del esperma con A/A es una buena opción. No se encontraron diferencias significativas en la movilidad del esperma de las muestras criopreservadas en los diferentes tratamientos. El crecimiento bacteriano fue afectado por las 3 concentraciones de A/A. Estos resultados pueden ser útiles para entender el papel de agentes infecciosos y su transmisión en muestras almacenadas en los bancos de germoplasma.

ABSTRACT

Thesis abstract of **José Alberto Miranda Velasco** presented as partial requisite to obtain the Bachelor degree in **Biology**. Ensenada, Baja California, Mexico. June 2007.

Title: ANTIBIOTIC/ANTIMYCOTIC SOLUTION TREATMENT ON BACTERIAL GROWTH OF *Vibrio harveyi* IN REFRIGERATED AND CRYOPRESERVED SAMPLES OF SPERM OF RED ABALONE *Haliotis rufescens*

Cryopreservation of sperm of important aquatic species is useful for genetic studies and artificial breeding, conservation, among others. However, an important issue that must be considered in the conservation of genetic resources is the possibility of microbiological cross-contamination in sperm samples stored in the germplasm banks. Biosecurity is an important issue and several approaches to reduce the risk of pathogen transfer need to be developed for aquatic species.

The objectives of this work were to examine: 1) the viability and growth of the pathogenic bacteria *Vibrio harveyi* inoculated in samples of sperm of red abalone *Haliotis rufescens* during a refrigerated storage (4°C) and after a long-term storage (-196°C); 2) the cytotoxic effect of antibiotic/antimycotic (A/A) on the viability of refrigerated or cryopreserved sperm; 3) the best treatment for the elimination of pathogenic bacteria from the sperm samples; and 4) diagnostic techniques to determine if pathogenic bacteria are present in sperm samples.

Briefly, red abalone sperm was collected and suspended in seawater. Samples were inoculated with *Vibrio harveyi* with or without A/A and stored in a refrigerator at 4°C or were cryopreserved in a controlled-rate freezer (freezing rate 1.0°C/min to reach -30°C). Aliquots from each treatment were used to evaluate sperm motility at 24, 48 and 72 h at 4°C, the refrigerated samples were transfer to the University of San Diego California (UCSD) to verify bacterial survival and growth, A/A cytotoxicity and effectiveness of A/A to eliminate or reduce bacterial numbers over time. The cryopreservation samples were defrosted in a water bath at 45°C by ~8 seconds, after 15 days of storage were evaluated like the refrigerated samples.

Significant differences were found in sperm motility among the three concentrations of the A/A, where the highest concentration (15µl/mL) significantly reduced motility. After 24 h of storage at 4°C with 5µl/mL of A/A, the sperm retained a high motility (~70%) and low bacterial grow suggesting that cold storage of sperm with A/A is a good option. No significant differences were found in sperm motility of cryopreserved samples between the tree different treatments. Bacterial growth was affected by all 3 concentrations of A/A. These results can be useful to control infectious agents that are transmissible with sperm in germplasm banks.

INDICE

I. INTRODUCCION

I. 1. Biología del Género.....	8
I. 2. Distribución e Importancia Económica.....	8
I. 3. Pesquería y Cultivo del Abulón en México.....	10
I. 4. La Criopreservación como Herramienta en la Acuicultura y la Conservación.....	11
I. 5. Ventajas de la Criopreservación.....	12
I. 6. Verificación de viabilidad de Esperma.....	13
I. 7. Transferencia de Microorganismos Patógenos.....	14
I. 8. <i>Vibrio harveyi</i> como Patógeno de especies acuáticas.....	16
I. 8. 1. Vibriosis	16
I. 8. 2. Biología del Género.....	16
I. 8. 3 Medio de Crecimiento TCBS.....	16
I. 8. 4. Importancia en Acuicultura.....	17
I. 9. Características de la Solución Antibiótico/Antimicótico (100×) Sigma-Aldrich®.....	18
I. 9. 1. Penicilina G.....	18
I. 9. 1. 1 Modo de Acción.....	19
I. 9. 2. Estreptomicina.....	19
I. 9. 2. 1 Modo de Acción.....	20
I. 9. 3. Anfotericina B.....	20
I. 9. 3. 1 Modo de Acción.....	21
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. HIPOTESIS.....	22
IV. OBJETIVOS.....	22
IV. 1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	22
V. MATERIALES Y METODOS.....	23
V. 1. Obtención y Mantenimiento de los Organismos.....	23
V. 2. Obtención de muestra de esperma de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	23
V. 3. Estimación de la densidad espermática y motilidad.....	24
V. 4. Obtención y cultivo de <i>Vibrio harveyi</i>	24
V. 5. Identificación de <i>Vibrio harveyi</i>	25
V. 5. 1. Método Bioquímico.....	25
V. 5. 2. Método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....	25
V. 6. Diseño Experimental.....	26
V. 7. Refrigeración de las muestras de esperma	26
V. 7. 1. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma refrigerado (4°C).....	27

V. 7. 2. Efecto del A/A en el crecimiento bacteriano en muestras de esperma refrigerado (4°C).....	27
V. 8. Criopreservación del esperma de abulón rojo.....	27
V. 8. 2. Descongelación.....	28
V. 8. 3. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma criopreservado (-196°C).....	28
V. 8. 4. Efecto del A/A en el crecimiento bacteriano en las muestras de esperma criopreservado (-196°C).....	29
V. 9. Análisis Estadístico.....	29
 VI. RESULTADOS.....	29
VI. 1. Movilidad de Esperma de Abulón Rojo <i>Haliotis rufescens</i> en muestras Refrigeradas (4°C).....	29
VI. 1. 2. Motilidad de esperma de Abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> en muestras Criopreservadas (-196°C).....	31
VI. 3. Crecimiento bacteriano de <i>Vibrio harveyi</i> en muestras de esperma de Abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> refrigeradas (4°C)	32
VI. 4. Crecimiento bacteriano de <i>Vibrio harveyi</i> en muestras Criopreservadas (-196°C) de esperma de Abulón Rojo <i>Haliotis rufescens</i>	33
 VII. DISCUSIONES.....	34
VII. 1. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma refrigerado (4°C).....	34
VII. 2. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma criopreservado (-196°C).....	36
VII. 3. Efecto de la solución antibiótico/antimicótico (A/A) en el crecimiento bacteriano en muestras de esperma refrigerado (4°C).....	36
VII. 4. Efecto de la solución antibiótico/antimicótico (A/A) en el crecimiento bacteriano en las muestras de esperma criopreservado (-196°C).....	38
 VIII. CONCLUSIONES.....	39
 IX. PERSPECTIVAS.....	40
 X. BIBLIOGRAFIA.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de cinco especies de abulón en Baja California.....	9
Figura 2. Estructura Química de la Penicilina G.....	18
Figura 3. Estructura Química de la Estreptomicina.....	19
Figura 4. Estructura Química de la Anfotericina B.....	20
Figura 5. Movilidad de las muestras de esperma almacenadas de 0 a 72 h a 4°C.....	30
Figura 6. Motilidad en muestras de esperma criopreservado.....	31
Figura 7. Supervivencia de bacterias (log CFU) en medio THA en muestras Refrigeradas (4°C).....	32
Figura 8. Supervivencia de bacterias (log CFU) en medio THA en muestras Criopreservadas (-196°C).....	34

I. INTRODUCCION

I. 1. Biología del Género

Los abulones pertenecen a la familia Haliotidae, la mayor parte de estos gasterópodos se encuentran desde la zona intermareal hasta los 20 m de profundidad, siendo este rango el que les proporciona las condiciones ambientales preferidas para su desarrollo (Hahn, 1989). Las larvas de estos organismos suelen encontrarse en la base de los talos de las macroalgas como *Macrocystis pirifera* y *Nereocystis luekeana*, mismas que los adultos utilizan como fuente natural de alimento (Leighton, 2000).

Los abulones son organismos dióicos, es decir, tienen sexos separados. Para las distintas especies se reportan períodos de desove que pueden ser semestrales, anuales o continuos, dependiendo de la integración de factores bióticos y abióticos presentes en el ambiente (Hahn, 1989). Su modo de alimentación consiste en ramonear superficies cubiertas por bacterias o diatomeas, principalmente (Leighton, 2000). La madurez sexual se alcanza a partir de los dos años de edad, siendo un indicador, el tamaño de la gónada. La liberación de gametos es externa, en el medio natural lo activan factores como la temperatura (Díaz *et al.*, 2000), condiciones oceánicas y ciclos lunares (Leighton, 2000), entre otros.

I. 2. Distribución e Importancia Económica.

Estos organismos representan una pesquería de gran importancia comercial en las costas del Pacífico mexicano y estadounidense (Guzmán del Proo y Ortiz-Quintanilla, 1972). Para la Península de Baja California se registran cinco especies, siendo *Haliotis rufescens* (abulón rojo), *H. corrugata* (abulón amarillo) y *H. fulgens* (abulón azul) las de mayor importancia económica (Leighton, 2000).

Los abulones azul, amarillo y negro (*Haliotis cracherodii*) se distribuyen a lo largo de casi toda la costa de la península de Baja California, desde las Islas Coronado, hasta la Isla Margarita. En México, el abulón rojo tiene una distribución más estrecha, desde las Islas Coronado, hasta Punta Baja en Bahía del Rosario (Guzmán del Proo, 1992) (Figura 1). Sin embargo, no fue sino hasta 1960 que las pesquerías de abulón en México se convirtieron en un recurso económicamente importante (Cox, 1962).

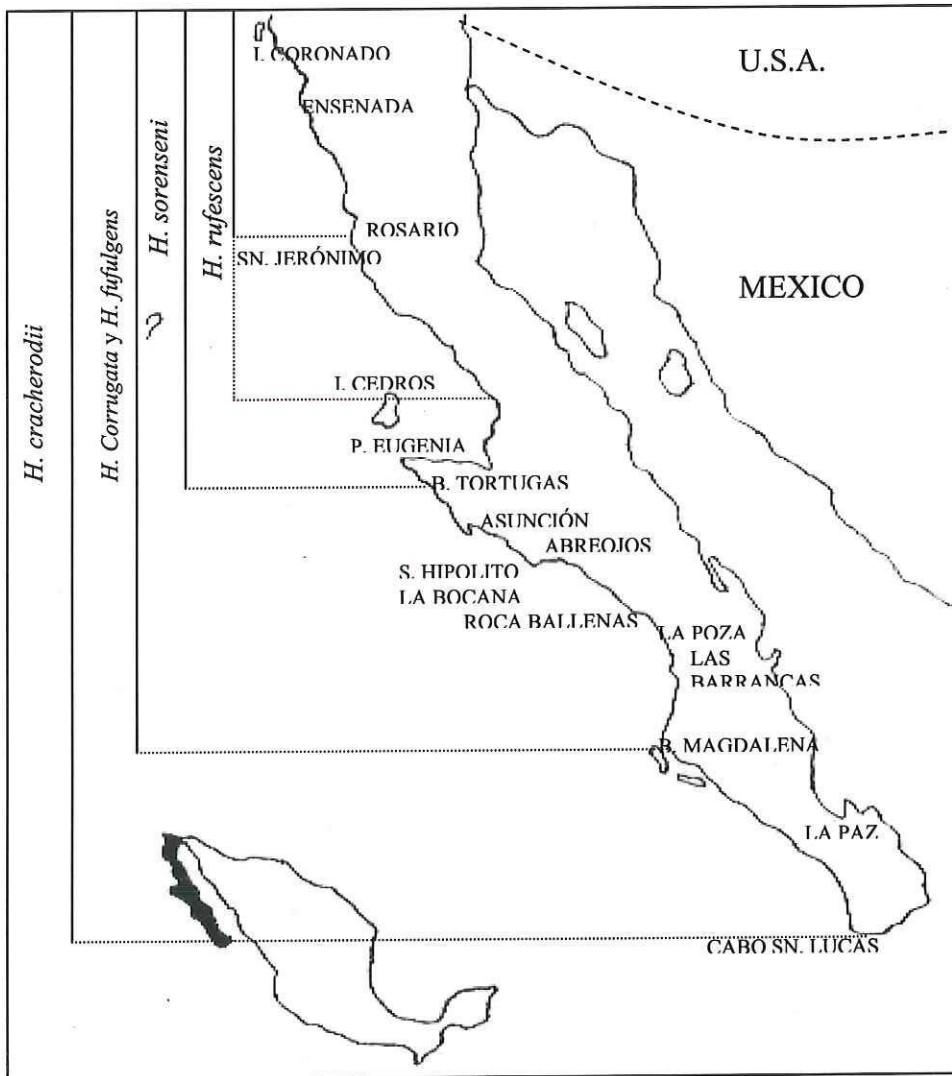


Figura 1. Distribución de cinco especies de abulón en Baja California (tomado de Guzmán del Proo, 1992).

I. 3. Pesquería y Cultivo del Abulón en México

La pesquería de abulón en México comenzó en Baja California por el año de 1960. El área de captura se extendía desde las Islas Coronado hasta la Isla de Cedros (Cox, 1962). Sin embargo, el registro oficial de captura más antiguo de la pesquería mexicana de abulón en Baja California se remonta al año de 1929, en este año se capturaron 1,721 toneladas, alcanzándose una producción máxima de 6,000 toneladas en 1950 (Guzmán del Proo, 1992). En la actualidad, la pesquería de abulón se ha visto reducida debido a la sobre explotación (Oakes y Ponte, 1996), cambios climáticos (Shepherd *et al.* 1998) y baja tasa de recuperación de las poblaciones naturales (Leighton, 2000).

Debido al agotamiento de las poblaciones naturales de abulón, el cultivo de este gasterópodo en México se ha visto favorecido. En sus inicios, el cultivo de abulón se limitó a la producción de larvas por medio de desoves inducidos y su liberación en el medio natural. Actualmente, las sociedades cooperativas se dedican a la producción y engorda de larvas de abulón tanto para su liberación, como para su comercialización (Garza-Salas, y Bernal *et al.* 1992). Asimismo, el cultivo comercial de abulón también se ha visto impulsado por laboratorios y granjas particulares. En Baja California unas de las empresas importantes en la producción de abulón son la granja Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V.; Productores Marinos Baja Pescadores Nacionales de Abulón (Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera, SCPP); Buzos y Pescadores de Isla Natividad (SCPP) y La Purísima (SCPP).

La combinación de la alta demanda y la sobreexplotación del recurso, ha generado un interés en la acuicultura del abulón. Esta actividad proporciona una alternativa para

mitigar la problemática del daño ecológico que representa la disminución de las poblaciones naturales de abulón y al mismo tiempo mantener el producto en el mercado.

El cultivo de abulón se ha convertido en una industria que crece rápidamente no sólo en México, sino en todo el mundo debido a que es uno de los moluscos de mayor valor comercial en los mercados internacionales (Johansson *et al.*, 1999).

I. 4. La Criopreservación como Herramienta en la Acuicultura y la Conservación de Recursos Génicos

El Banco de Germoplasma de especies acuáticas de Baja California del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), tiene como meta el preservar especies acuáticas con características biológicas y comerciales únicas, con el propósito de resguardar cualquier tipo de células con capacidad de reproducirse o dar origen a otras células, tales como esperma, ovocitos y embriones (Com. Pers. Carmen Paniagua* 2006). La criopreservación del esperma se considera una valiosa técnica para la reproducción artificial y el mejoramiento genético de especies comercialmente importantes. La producción de organismos acuáticos a escala comercial necesita contar con una buena cantidad y calidad de productos sexuales durante el año. La criopreservación no sólo asegura la disponibilidad de esperma de buena calidad sino que además es menos costosa que mantener un stock de reproductores. También permite usar un reducido número de machos en los criaderos y repetir el uso de ciertos machos cuando las hembras se encuentran en condición de desove (Billard *et al.*, 1995).

* CICESE Tel. 1750500 Correo electrónico: cpaniagu@cicese.mx

La criopreservación de espermatozoides es una herramienta muy práctica para aumentar el tamaño de la población genéticamente efectiva, especialmente cuando se establece un nuevo almacén de reproductores; ya que ayuda a mantener la diversidad genética y las características de los reproductores. Más aún, el espermatozoides congelado de especies en peligro y de almacenes locales como los ya descritos anteriormente, puede ser colectado para el establecimiento de bancos de germoplasma (Bergan *et al.*, 1991). Además, es una forma de inyectar nuevo material genético, pues facilitaría la realización de cruzamientos selectivos, ya que el traslado de un espécimen para su reproducción requiere de condiciones adecuadas y resultaría más costoso que trasladar una muestra con espermatozoides congelado.

En los últimos años, la conservación de recursos genéticos de organismos ha sido objeto de muchos estudios. El mayor trabajo se ha enfocado en la criopreservación de peces tales como el salmón del atlántico (Mounib, 1978 citado por Stoss y Refstie 1983), en trucha (Holtz, 1978; Stoss *et al.*, 1978; Stoss and Holtz, 1981; citados por Stoss & Refstie, 1983; Piironen, 1993, y Geffen y Evans, 2000) y en carpa (Hulata & Rothbard, 1979; Billard *et al.*, 1995). Sin embargo los resultados obtenidos son altamente variables, por lo que se necesita modificaciones específicas para aplicar la técnica en una especie en particular (Billard *et al.*, 1995).

I. 5. Ventajas de la Criopreservación

Las ventajas que ofrece la criopreservación, ya sea para el cultivo de especies de interés comercial, como para especies en peligro de extinción son: almacenamiento a largo plazo de gametos, mejoramiento genético mediante programas de cruces selectivas,

producción de híbridos, reducción en los costos de mantenimiento de reproductores, sincronización y repetición de desoves, fácil manejo de muestras en el transporte nacional e internacional, y que conlleva a la creación y conservación de bancos de germoplasma (Mongkonpunya *et al.*, 2000).

La variedad de materiales y técnicas de congelamiento utilizadas para la criopreservación de células es muy amplia. Las muestras se pueden empaquetar en pajillas de 0.25 mL, 0.50 mL, o volúmenes mayores y éstas a su vez se pueden congelar en cámaras programables o en cámaras manuales, ambas enfriadas con vapor de nitrógeno líquido. Sin embargo, cada uno de estos métodos requiere tiempo y se vuelve ineficiente si se trata de criopreservar grandes volúmenes de esperma (Wayman y Tiersch, 2000). Por lo tanto, es necesario recurrir a los métodos comerciales de criopreservación. Un ejemplo es la industria lechera. En esta área se han implementado exitosamente las técnicas de criopreservación mediante el etiquetado computarizado de pajillas, llenado de pajillas automatizado, cámaras de congelación para grandes volúmenes y bases de datos organizadas para el manejo y distribución de muestras (Riley, 2002). Por lo anterior, se considera que la criopreservación del esperma de abulón puede realizarse tanto a pequeña escala como a escala comercial.

I. 6. Verificación de viabilidad de Esperma

La viabilidad del esperma criopreservado se puede evaluar de diversas formas como lo son la tasa de eclosión de huevecillos fertilizados con esperma congelado (Tsai y Chao, 1994; Gwo, 2000b; Lahnsteiner, 2000), la motilidad (Doi *et al.*, 1982; Matsunaga *et al.*, 1983; Tiersch *et al.*, 1994; Leffler y Walters, 1996; Wilhem *et al.*, 1996; Gwo, 2000a),

el contenido de ATP (Perchee *et al.*, 1995) y la integridad del acrosoma (Wilhem *et al.*, 1996). Cada medida de verificación de calidad espermática presenta ventajas y desventajas. La elección de una o una combinación de éstas, depende del tiempo y el presupuesto con el que se cuente.

La motilidad es el parámetro más utilizado para evaluar la calidad del esperma. Para la evaluación de dicho parámetro, es necesario colocar el esperma en una solución fisiológica y observarlo al microscopio (Bromage y Roberts, 1995). Algunos autores han establecido categorías numéricas de clasificación de muestras de esperma, donde el cero se refiere a muestras con nula motilidad y el número máximo de la clasificación se refiere a muestras con motilidad entre 80 y 100% (Doi *et al.*, 1982; Gwo *et al.*, 2002).

I. 7. Transferencia de microorganismos patógenos.

Las enfermedades por microorganismos patógenos constituyen una de las mayores amenazas para la acuicultura a nivel mundial (Wedemeyer y Wood, 1974), existiendo una amplia diversidad de procesos patológicos implicados. La presencia de microorganismos en muestras de gametos provee un riesgo potencial en la transferencia de estos agentes y este riesgo se vuelve mayor cuando la liberación de los gametos de estos organismos es externa y es necesario colectar los gametos del agua donde desovaron.

En el mar la reproducción y el desarrollo de los animales se llevan a cabo en condiciones muy diferentes que las de los terrestres. La mayoría de los organismos acuáticos liberan sus gametos en el agua (fecundación externa). En este tipo de fecundación, los

organismos expulsan sus gametos en el agua. En estas condiciones existe un alto riesgo de que los gametos estén en contacto con microorganismos patógenos.

En adición al tratamiento de agentes infecciosos, la presencia de microorganismos en muestras resguardadas, pone en peligro el valor del germoplasma, disminuyendo la capacidad de fertilización y minimizando la cantidad celular (óvulos o esperma) y su viabilidad (Jenkins 2000). Diferentes antibióticos son típicamente añadidos a gametos humanos para extender el tiempo de almacenamiento y disminuir la transferencia de microorganismos (Cotell *et al.*, 1997). Sin embargo, su aplicación no ha sido investigada sistemáticamente para el uso y desarrollo de especies acuáticas (Jenkins 2000a).

La importancia clínica del procedimiento de eliminación de bacterias de las muestras de semen y la bacteriospermia es evidente (Willen *et al.*, 1996; Cottell *et al.*, 1997). Existe una tendencia de algunas bacterias de adherirse al esperma (Friberg y Fullan, 1983; Wolff *et al.*, 1993; Diemer *et al.*, 1996), afectar la movilidad (Kaur *et al.*, 1986) y la reacción del acrosoma (Mulla *et al.*, 1996). En humanos, es sorprendente que la presencia por medio natural de bacterias en las muestras de semen no tiene efecto en la fertilización (Riedel *et al.*, 1984; Forman *et al.*, 1987; Stovall *et al.*, 1993; Liversedge *et al.*, 1996; Bussen *et al.*, 1997); sin embargo, en cultivos contaminados con bacterias, los ovocitos de humanos son degradados (Huyser *et al.*, 1991). El papel que desempeñan los antibióticos que son adicionados al medio de cultivo celulares para estos estudios no ha sido claro. El único microorganismo reportado que disminuye el porcentaje de embarazo en humanos es *Ureaplasma urealyticum* (Montagut *et al.*, 1991).

I. 8. *Vibrio harveyi* como Patógeno de especies acuáticas.

I. 8. 1. Vibriosis

La vibriosis es una enfermedad causada por un grupo de bacterias del género *Vibrio*. Quizá la especie más notoria es *Vibrio cholerae*, bacterias que causa la enfermedad del cólera. El género *Vibrio* es uno de los más comunes encontrados en aguas superficiales en el mundo. Por lo tanto, los moluscos filtróalimentadores, pueden filtrar al *vibrio* más fácil que otros organismos acuáticos. Estos organismos los podemos encontrar de vida libre o como simbioses de organismos acuáticos.

I. 8. 2. Biología del Género

Las bacterias de la Familia Vibrionaceae son gram-negativas, no esporuladas. Miden ~0.5 micrómetros x 2 micrómetros, tienen organelos locomotores llamados flagelos. Los *Vibrios* presentan un grupo de flagelos en un extremo de su cuerpo (flagelos polares). Los flagelos se ubican en una envoltura que es una continuación de la membrana externa de la pared celular bacteriana. Tienen la capacidad de fluorecer, lo cual depende de la concentración de los organismos en el sustrato (agua de mar o medio especial de crecimiento en el laboratorio). Las reacciones de generación requieren de oxígeno, y el producto final de las reacciones de la luminiscencia es la excitación de la luciferaza.

I. 8. 3 Medio de crecimiento TCBS

El medio de cultivo agar tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa (TCBS) fue propuesto por Nakanishi 1962 y modificado por Kobayashi 1963 para el aislamiento y cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros vibrios enteropatógenos. Según Kampelmacher et al. (1969)

este medio es recomendable para el aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus* de peces. La alta concentración de tiosulfato y citrato, más la alcalinidad del medio inhiben el crecimiento de las enterobacteriáceas. Cualquier bacteria coliforme que pueda crecer, no puede metabolizar la sacarosa. Las sales biliares inhiben la flora gram positiva acompañante. Los indicadores azul timol y azul de bromotimol viran al amarillo en presencia de ácido (Version 2003-01-21 Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania).

I. 8. 4. Importancia del genero *vibrio* en acuicultura

Mundialmente las enfermedades ocasionadas por bacterias del género *Vibrio* son importantes en peces (Muroga, 1975; Austin y Austin, 1993); y en camarones marinos (Lightner y Lewis, 1975, Lightner, 1994; Mohny et al., 1994); porque causan verdaderos estragos. *Vibrio harveyi* se encuentra como habitante normal de aguas tropicales (Austin y Austin, 1993). Entre las especies del género *Vibrio* consideradas de importancia sanitaria en acuicultura se pueden mencionar: *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, entre otras. Algunas de estas bacterias están asociadas con problemas en laboratorios productores de larvas de crustáceos y moluscos, en camarones de cultivo intensivo, y en algunas regiones de Ecuador, en las lagunas de engorde (Riquelme et al., 1995). El síndrome de “bolitas”, cuyo agente etiológico es *Vibrio harveyi* esta asociado a grandes mortalidades de larvas de *Penaeus vannamei* y de *P. stylirostris* (Morales, 1992; en Zherdmant, 1996).

I. 9. Características de la solución antibiótico/antimicótico (100×) Sigma-Aldrich®

Esta solución es un antimicrobial de amplio espectro: que actúa sobre bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, hongos y levaduras. Contiene 10,000 unidades/mL penicilina G, 10 mg/mL sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL anfotericina B en solución amortiguadora de citrato. Es una suspensión estéril probada en cultivos celulares.

I. 9. 1. Penicilina G

La penicilina es un antibiótico del grupo de los beta-lactámicos (Figura 2), cuyo primer representante fue la penicilina G. Es particularmente activa contra bacterias gram positivas, en especial en infecciones producidas por estafilococos, estreptococos, neumococos, algunos *Clostridium* y *Lactobacillus*; ejerce también acción contra *Treponema pallidum*. Fue el primer antibiótico descubierto y su descubrimiento ha sido atribuido a Alexander Fleming en 1928.

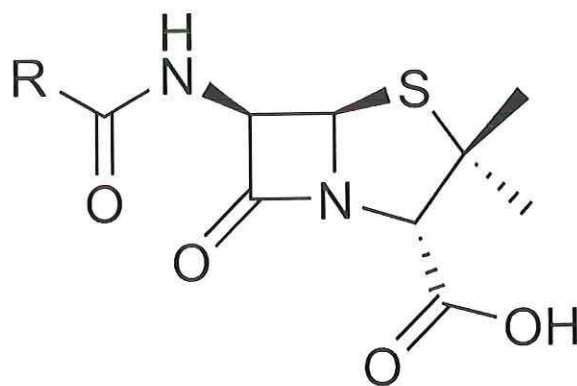


Figura 2. Estructura Química de la Penicilina G
(www.steve.gb.com/science/molecules.html).

I. 9. 1-1 Modo de acción

La penicilina como el resto de los betalactámicos, ejerce una acción bactericida por alterar la pared celular bacteriana, eliminando a las bacterias susceptibles, provocando un choque osmótico, especialmente durante las fases activas de la multiplicación.

1. 9. 2. Estreptomomicina

La estreptomomicina (Figura 3) es un antibiótico bactericida de espectro pequeño, del grupo de los aminoglucósidos, derivado de la actinobacteria *Streptomyces griseus*. La estreptomomicina es transportada en forma activa a través de la membrana bacteriana. Inhibe la síntesis proteínica a nivel de los ribosomas bacterianos induciendo errores en la lectura del ARN ribosomal.

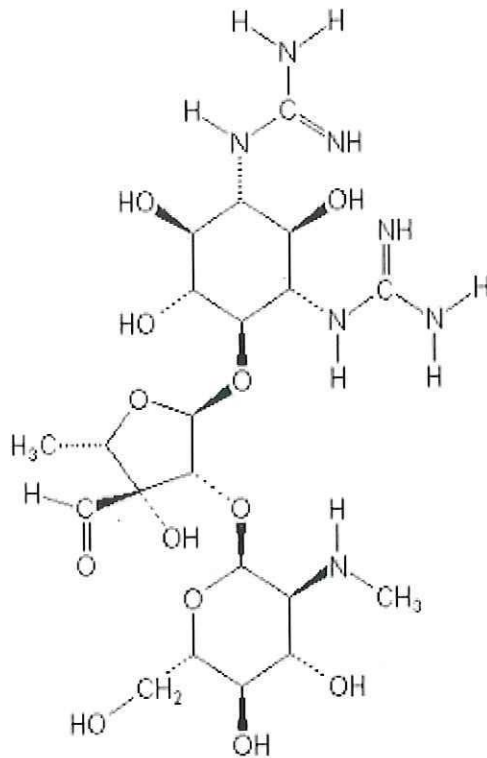


Figura 3. Estructura Química de la Estreptomomicina (www.biosite.dk).

I. 9. 2-1 Modo de acción

Actúa a nivel de ribosomas en la subunidad 30S bacteriana, y por ende, a nivel de síntesis de proteínas. A pesar de actuar sobre la síntesis proteínica, por lo que se tendería a clasificar como bacteriostáticos, su efecto es tan potente y de forma irreversible en la subunidad 30S, que son considerados como bactericidas. Tienen variados usos, siendo más efectivos contra bacterias Gram negativas.

I. 9. 3. Anfotericina B

La anfotericina B (Figura 4) es un antifúngico obtenido por fermentación del *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto del suelo, descrito por primera vez en 1948. La anfotericina B, está químicamente emparentada con la nistatina, siendo un antimicótico poliénico. La denominación de este antimicótico se debe a sus propiedades anfóteras, debidas a la presencia de un grupo ácido y de un grupo amino, lo que permite que el producto sea relativamente soluble en agua.

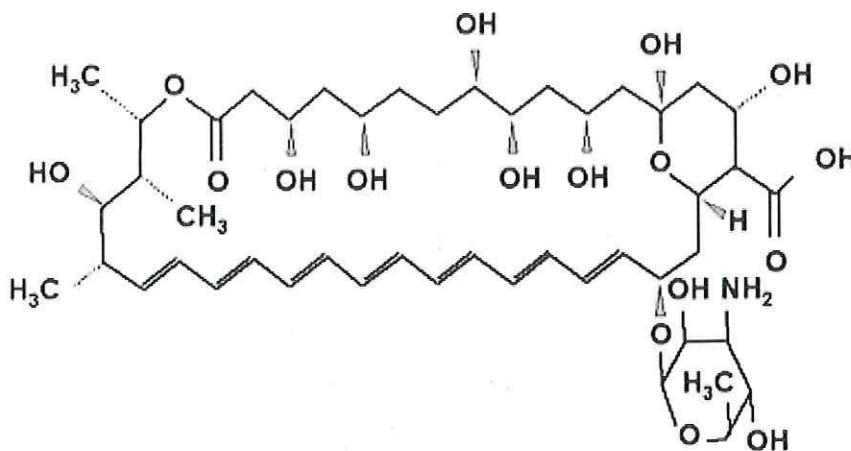


Figura 4. Estructura Química de la Anfotericina B (<http://www.powerpak.com>).

I. 10. 3-1 Modo de acción

La anfotericina B se une a los esteroides de las membranas celulares de los hongos, deteriorando la integridad de las mismas. Esto se traduce en una pérdida de potasio y otros contenidos celulares.

La mayor afinidad de la anfotericina B hacia el ergosterol, un esteroide encontrado en las membranas de los hongos es la clave de su acción antifúngica. Sin embargo, también se une al colesterol en membranas de las células humanas.

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se estima que en el mundo se inseminan artificialmente más de 200 millones de vacas y puercos, entre otros animales de granja. Los países que se destacan son Holanda, Japón, Dinamarca e Israel, donde se insemina el 100% de las vacas lecheras (Wiltbank 1997). En contraste, en los países en desarrollo donde se introdujo la técnica de inseminación artificial, usando semen refrigerado, durante los años 1960 y semen congelado, en la década de los años 70, sólo se insemina <10% de su ganadería. En México no se dispone de cifras estadísticas confiables al respecto; sin embargo, la inseminación artificial se utiliza en las grandes cuencas lecheras (Sosa y Apodaca, 1998). En México se producen por inseminación artificial aproximadamente 1 o 2 millones de cabezas de ganado al año y por transferencia embrionaria ~20 a 30 mil embriones de ganado por año (Com. Pers. Di-Bella*, 2005).

La contaminación bacteriana del semen, es uno de los factores que ocurren durante el proceso de la recolección, así como en el manejo de los instrumentos en laboratorio. La contaminación del semen por microorganismos puede reducir movilidad, fertilidad y

* Engormix.com Tel: 01833 2101879 Fax: Pedir Tono. Correo electrónico: dibella@prodigy.net.mx

viabilidad y puede dañar seriamente la membrana acrosomal en aquellos organismos que contienen acrosoma. Por lo que la adición de un antibiótico apropiado, podría prolongar la viabilidad y la fertilidad del esperma (Auroux *et al.*, 1991).

Aun no se cuenta con suficiente información para determinar el daño de los microorganismos, ni el nivel de citotoxicidad de los antibióticos sobre la viabilidad del esperma en organismos acuáticos. Dicha información es muy importante debido al surgimiento de nuevos bancos de germoplasma para especies acuáticas de gran importancia ecológica, genética y económica donde las muestras deben mantenerse libres de patógenos.

III. HIPOTESIS

El tratamiento con antibióticos en muestras de abulón rojo *Haliotis rufescens* permite reducir el riesgo de contaminación bacteriana en las muestras refrigeradas y criopreservadas.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el mejor tratamiento de esterilización en las muestras refrigeradas y criopreservadas de esperma de abulón rojo *Haliotis rufescens*.

IV. 1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la sobrevivencia y crecimiento de *Vibrio harveyi* incluida previamente en muestras de esperma de abulón rojo *Haliotis rufescens* refrigeradas a 4° C y criopreservadas.

2. Evaluar la citotoxicidad del antibiótico/antimicótico 100x de SIGMA® sobre la viabilidad de las muestras de esperma de abulón rojo *Haliotis rufescens* refrigeradas a 4° C y criopreservadas.
3. Determinar el mejor tratamiento con antibiótico/antimicótico 100x de SIGMA® para la eliminación de *Vibrio harveyi* de las muestras de esperma a 4° C y criopreservadas.
4. Identificar bacterias *Vibrio harveyi* por medio del método bioquímico y molecular de RCP (Reacción en cadena de la polimerasa).

V. MATERIALES Y METODOS

V. 1. Obtención y Mantenimiento de los Organismos

Los abulones se obtuvieron de la compañía Abulones Cultivados S. de R. L. de C. V. y se transportaron dentro de bolsas plásticas con oxígeno en hieleras enfriadas (4-8° C) al Departamento de Acuicultura del CICESE. Los organismos se mantuvieron en un sistema de recirculación con un volumen de agua de mar natural de 250 L, con una salinidad de 35‰ ± 2 y una temperatura de 15°C ± 1. Además, los organismos fueron alimentados ad libitum con la macroalga *Macrocystis pyrifera*.

V. 2. Obtención de muestra de esperma de abulón rojo *Haliotis rufescens*

Se utilizaron 4 machos, identificados por el color amarillento en las gónadas, y se colocaron en un recipiente de plástico con 3 L de agua de mar filtrada (AMF). Para la inducción de la liberación del esperma, se aplicó un estrés químico irreversible a nivel neurológico. Luego se agregó TRIS 2M (Sigma Co., St. Louis Missouri) por 15 minutos,

antes de añadir 6.6 mL/L de peróxido de hidrógeno al 30% (Clarkson Laboratory and Supplies, Chula Vista, CA). Los organismos se dejaron en estas condiciones por ~2.5 h y después cada organismo fue enjuagado con AMF y colocado en recipientes individuales conteniendo 50 mL de AMF, para la liberación del gameto. El esperma fue colocado en tubos en tubos de fondo cónico para centrifuga de 50 mL (Corning Inc., Corning, NY) y se conservaron a 4°C para su uso posterior.

V. 3. Estimación de la densidad espermática y motilidad

Para determinar la densidad celular se diluyeron los espermias 1:1000 y el número de células espermáticas fueron contadas en un hematocitómetro en un microscopio (Nikon, modelo Eclipse 80-i; Tokio, Japón) con un aumento total de 400x. La motilidad fue expresada en porcentaje del movimiento total del esperma.

V. 4. Obtención y cultivo de *Vibrio harveyi*

Las muestras de la bacteria *Vibrio harveyi* fueron proporcionadas por el Dr. Bruno Gómez del CIAD Mazatlán. Las muestras de *Vibrio harveyi*, se descongelaron, y 25µl de esta bacteria fue sembrada por medio de espatulado en cajas Petri conteniendo medio marino Zobell. Las bacterias se dejaron incubando durante 24 h a 29°C. Una vez reactivada la bacteria, se tomó una alícuota (25µl) y se resembró por medio de estriado en cajas de Petri conteniendo medio Zobell. La bacteria se dejó crecer durante 24 h a 29°C. Una vez que se obtuvo una buena separación de las colonias de *Vibrio harveyi*, se tomó una colonia por medio de picado, con puntillas estériles de 10µl y se añadió a tubos cónicos de 15mL, conteniendo medio liquido Zobell. El cultivo se mantuvo a 29°C por

24 h. Al día siguiente, 200 μ l del cultivo bacteriano se agregó a 380 μ l del medio líquido Zobell y se dejó crecer hasta fase exponencial (~4 h) a 29°C. Para realizar la curva de crecimiento, se tomaron lecturas de absorbancia a 600 nm con un espectrofotómetro cada hora.

V. 5. Identificación de *Vibrio harveyi*

La identificación bacteriana se llevo acabo por método bioquímico y por técnicas moleculares, reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

V. 5. 1. Método bioquímico

Las muestras bacterianas fueron sembradas por triplicado, 25 μ l del cultivo bacteriano fue sembrado en cajas petri con medio selectivo para bacterias del género *Vibrio*, medio Agar Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa (TCBS) y se dejaron crecer a 29°C durante 24 h. Las colonias de *Vibrio harveyi*, dependiendo de la ruta metabólica de dicha especie, pueden fermentar diferentes azucres dando como resultado un cambio de pH y formando halos de color amarillo o verde.

V. 5. 2. Método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó una extracción de ADN genómico utilizando el método DNAzol® y se corroboró por medio de electroforesis de un gel de Agarosa 1.2% en solución amortiguadora TE 0.5X que contiene 10 mM Tris ajustado a pH 7.0 con HCl (Ambion, Inc., Woodward St. Austin, TX, USA). La cuantificación se realizó con ayuda de un de espectrofotómetro basándose en la absorbancia a 260 nm. Una vez obtenido el ADN, se

realizó una amplificación por medio de PCR utilizando un termociclador (BioRad). Los parámetros utilizados para la realización del PCR fueron 1 ciclo a 95°C por 6min, 25 ciclos a 95°C por 1 min, 48° C por 1 min, 72°C por 2 min, 1 ciclo a 72°C por 10min y 4°C infinito. Los oligonucleótidos utilizados fueron FluxN-CTGTGTACTCACTGTTTATC RluxN- GTCTAATTCGCGTTCTCCA (G. Hernández y J. Olmos 2004) que codifican para los genes *luxN* y LuxN de una proteína auto inductora (Bassler *et al.* 1993). Se utilizo como control positivo ADN de una cepa comercial 14126 American Type Culture Collection (ATCC).

V. 6. Diseño experimental

Alícuotas de esperma (1mL) fueron obtenidas de cada organismo por triplicado y se les agregó una solución Antibiótico/antimicótico (A/A) en tres diferentes concentraciones (5, 10 y 15µl/mL), a otro grupo de muestras se les agregó el A/A en las mismas concentraciones mas 10µl/mL de la bacteria *Vibrio harveyi*. Como control positivo se prepararon alícuotas (1mL) de esperma inoculadas con la bacteria *Vibrio harveyi* (10µl/mL). Como control negativo se utilizaron alícuotas de 1mL de esperma sin A/A o bacteria. Estas muestras fueron refrigeradas a 4°C o criopreservadas (-196°C).

V. 7. Refrigeración de las muestras de esperma

Después de colocar las muestras en los diferentes tratamientos, fueron refrigeradas a 4°C, por 4 días.

V. 7. 1. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma refrigerado (4°C)

Las muestras refrigeradas (4°C) fueron trasladadas a la Universidad de San Diego California (UCSD) y alícuotas (10 µl) de cada tratamiento fueron observadas en el microscopio a 400X estimando la motilidad de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Las alícuotas fueron revisadas a las 24, 48 y 72 h.

V. 7. 2. Efecto del A/A en el crecimiento bacteriano en muestras de esperma refrigerado (4°C)

Después de almacenamiento a 4°C, alícuotas de 25 µl se colocaron en cajas seriadas de 96 pozos conteniendo 225 µl de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Con estas muestras se realizaron 4 diluciones en serie y se incubaron a 29°C por 24 h. Después de la incubación se tomaron alícuotas de 25 µl de cada dilución y se sembraron por triplicado en medio de cultivo Todd Heweit Broth (THA) y se dejaron crecer por 24 h a 29°C. La evaluación de crecimiento y sobrevivencia de las mismas se realizaron a las 24, 48, 72 h.

V. 8. Criopreservación del esperma de abulon rojo

La criopreservación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Salinas Flores *et al.* (2005). El mismo día que se tomaron las muestras para los tratamientos a 4°C, otro grupo de muestras se resuspendido en DMSO 10%. Las muestras se dejaron incubar en el crioprotectante por 10 min a 19°C. Las muestras fueron colocadas en popotes franceses de 0.5 mL. Los popotes fueron cerrados con polvo sellador, y congelados en la cámara programable (KRYO 560-16, Planer Products, Sunbury-on-thames,UK), con una

temperatura inicial de 15°C, y una tasa de congelamiento de -1°C min, hasta alcanzar una temperatura final de -30°C. Posteriormente se mantuvieron a esta temperatura por 10 min (Salinas-Flores *et al.*, 2005), antes de ser depositadas en el tanque de almacenamiento a -196°C (Taylor-Wharton, HC-35) por 15 días.

V. 8. 2. Descongelación

Las muestras almacenadas en los popotes a -196°C se descongelaron 14 días después, en un baño de agua a 45°C durante ~8 segundos y se colocaron en tubos de microcentrífuga con un volumen igual (10 µl) de agua de mar filtrada.

V. 8. 3. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma criopreservado

(-196°C)

Para determinar el efecto citotóxico del A/A en las muestras de esperma criopreservado, los popotes fueron descongelados y se tomaron alícuotas (10 µl) de cada tratamiento. La motilidad fue evaluada de acuerdo a la metodología descrita anteriormente, para las muestras refrigeradas. Debido a que las muestras criopreservadas pierden la motilidad después de su descongelamiento, solo se revisó la motilidad al descongelar y no después de las 24, 48 y 72 h, como se realizó con las muestras refrigeradas.

V. 8. 4. Efecto del A/A en el crecimiento bacteriano en las muestras de esperma criopreservado (-196°C)

Una vez descongeladas las muestras, se tomaron alícuotas de 25 µl de cada tratamiento y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para las muestras refrigeradas.

V. 9. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) de 3 vías, usando tiempo, tratamiento y concentración como una covariable en las muestras refrigeradas. Para las muestras criopreservadas se utilizó un modelo ANOVA de 2 vías, usando como variables el tratamiento y la concentración. El paquete estadístico para el análisis de los datos se realizó con SAS (SAS Institute, Cary, North Carolina, 1989). El valor de $P < 0.05$ fue el escogido para dar el valor de significancia.

VI. RESULTADOS

VI. 1. Movilidad de esperma de Abulón Rojo *Haliotis rufescens* en muestras refrigeradas (4°C)

La motilidad de las muestras de esperma de abulón rojo refrigeradas (4°C), fue afectada ($P=0.0001$) por los diferentes tratamientos (Figura 6). La motilidad del esperma en el control negativo (solo esperma) tuvo una disminución de ~40% a las 24. Para las 72 horas tuvo una motilidad casi nula. El tratamiento que mantuvo la más alta motilidad (77%) después de 24 horas de almacenamiento fue la concentración de 5 µl/mL de antibiótico/antimicótico (A/A). No obstante, el tratamiento que contiene solo la bacteria

(control positivo), fue el que tuvo el efecto más negativo en la motilidad del esperma. Después de 24 horas de almacenamiento a 4°C, <10% del esperma había mantenido la motilidad (Figura 6). A las 48 horas de almacenamiento el esperma mantuvo ~30% de motilidad en todos los demás tratamientos. Sin embargo, la motilidad fue nula después de 72 horas de almacenamiento sin la solución A/A.

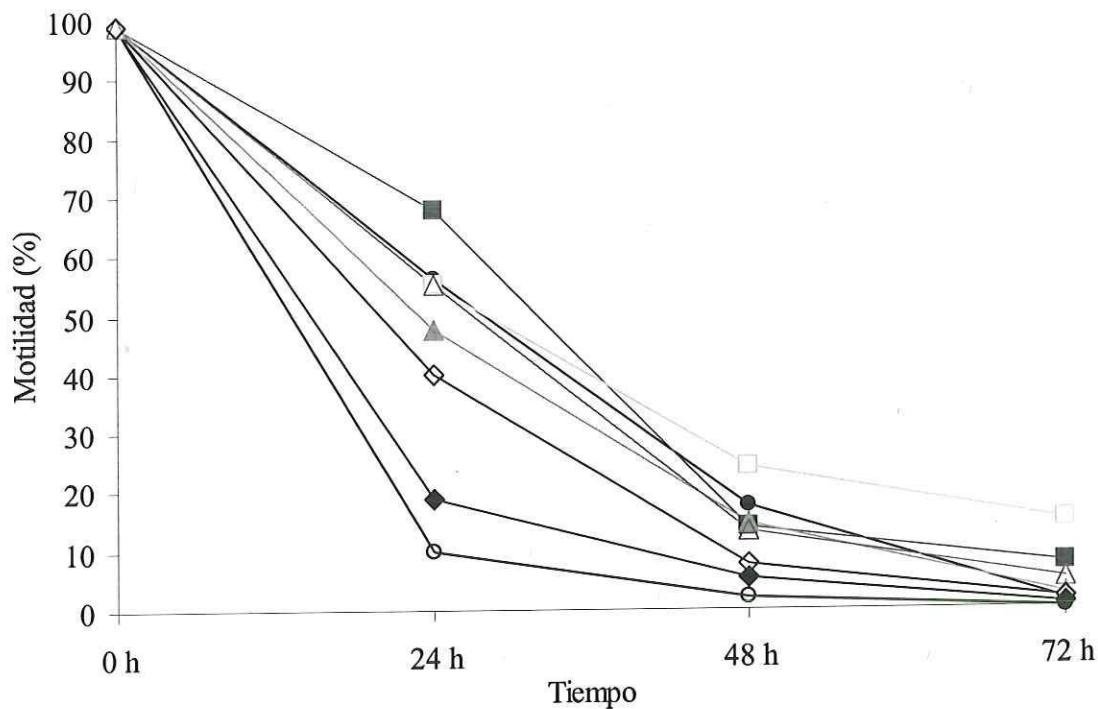


Figura 5. Movilidad de las muestras de esperma almacenadas de 0 a 72 h a 4°C
 Control negativo, círculo cerrado; Antibiótico/Antimicótico (A/A) (5µl/mL), cuadro cerrado; A/A (10µl/mL), triángulo cerrado; A/A (15µl/mL), rombo cerrado; control positivo (solo bacteria), círculo abierto; A/A (5µl/mL) más bacteria (10µl/mL), cuadro abierto; A/A (10µl/mL) más bacteria (10µl/mL), triángulo abierto; A/A (15µl/mL) más bacteria (10 µl/mL), rombo abierto.

VI. 1. 2. Motilidad de esperma de Abulón rojo *Haliotis rufescens* en muestras criopreservadas (-196°C)

El proceso de criopreservación disminuyó la motilidad del esperma de abulón rojo. El control negativo (solo esperma) es el que tuvo mejor motilidad (~13%) después de la criopreservación (Figura 7). El análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre la movilidad de esperma mantenido en los diferentes tratamientos.

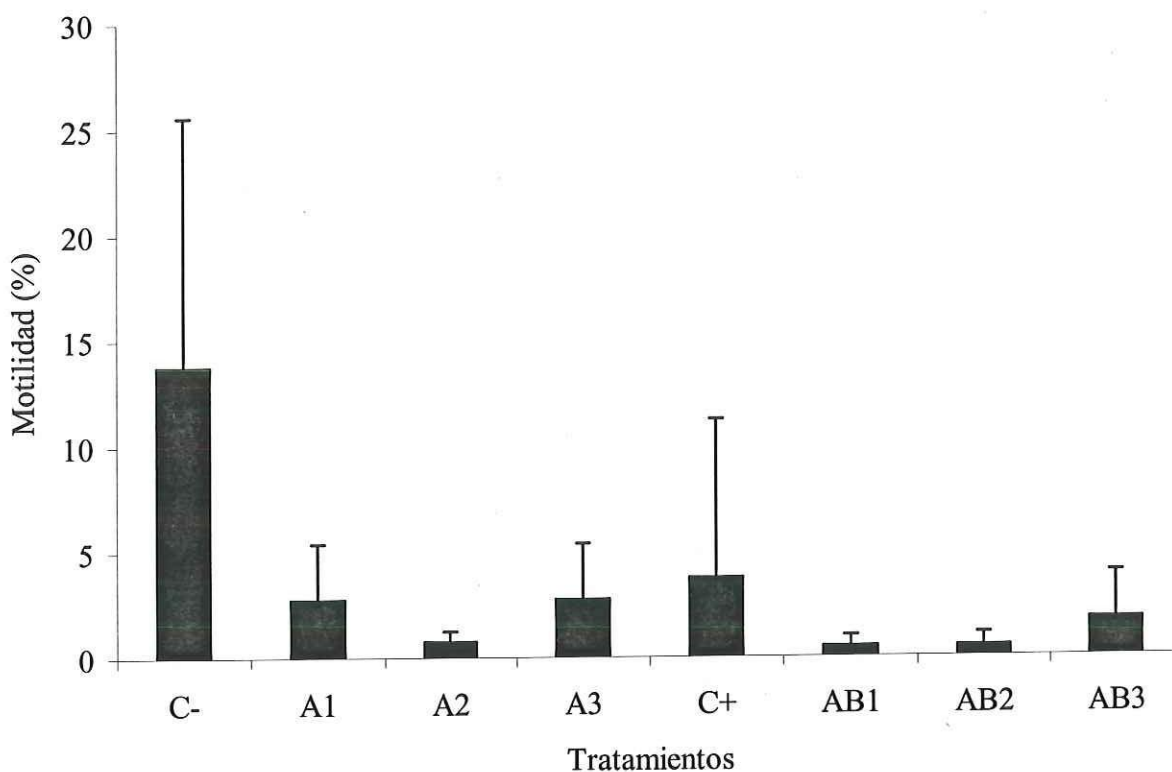


Figura 6. Motilidad en muestras de esperma Criopreservado. Control negativo (solo esperma); esperma con Antibiótico/Antimicótico (A/A) a diferentes concentraciones A1, 5 μ l/mL; A2, 10 μ l/mL; A3, 15 μ l/mL; control positivo (esperma con bacteria) (10 μ l/mL); esperma con A/A y bacteria AB1, 5 μ l/mL; AB2, 10 μ l/mL; AB3, 15 μ l/mL.

VI. 3. Crecimiento bacteriano de *Vibrio harveyi* en muestras de esperma de Abulón rojo *Haliotis rufescens* refrigeradas (4°C)

El crecimiento bacteriano fue encontrado solo en las muestras inoculadas con *Vibrio harveyi*. El mayor número de colonias bacterianas dentro de los tres tratamientos con la solución antibiótico/antimicótico (A/A) se registró en las muestras conteniendo la más alta concentración (15µl/mL) de A/A después de 72 horas de almacenamiento. El mejor tratamiento fue con la solución A/A a una concentración de 5µl/mL. Este tratamiento disminuyó gradualmente el número de colonias bacterianas a través del tiempo, hasta eliminarlas por completo al cabo de 72 horas.

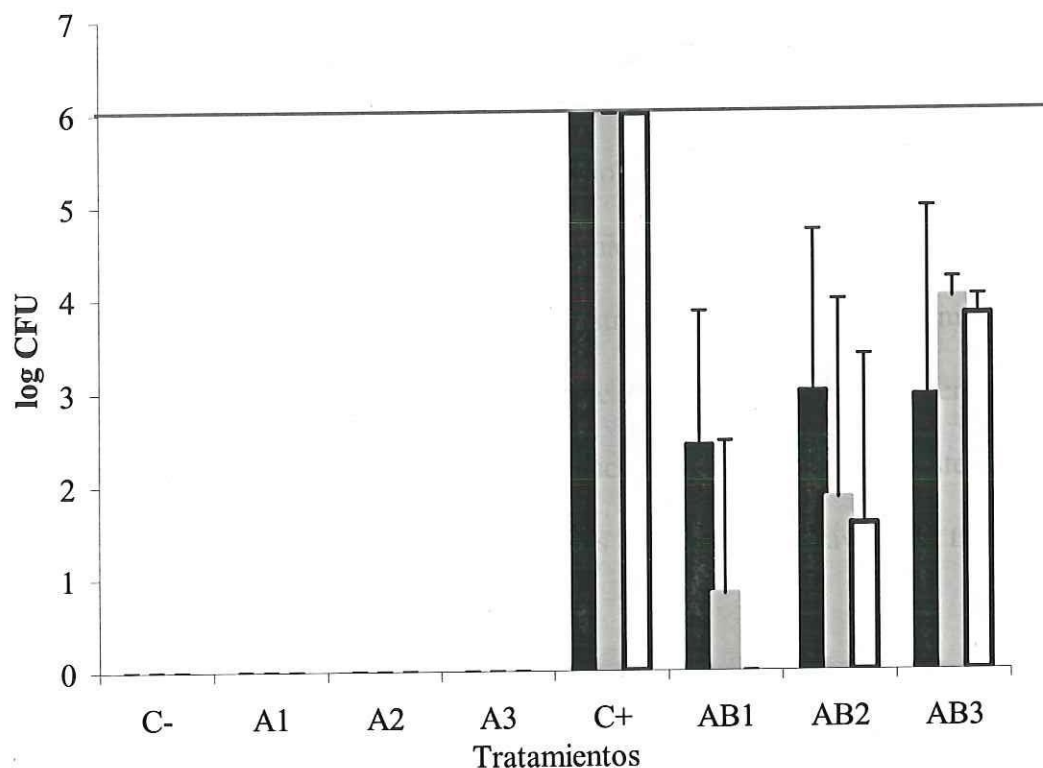


Figura 7. Sobrevivencia de bacterias (logCFU) en medio THA en muestras Refrigeradas (4°C). Después de: 24 h de almacenamiento (barras negras) 48 h (barras

gris) y 72 h (barras blancas). C-, control negativo (solo esperma); esperma con Antibiótico/Antimicótico (A/A) a diferentes concentraciones A1, 5µl/mL; A2, 10µl/mL; A3, 15µl/mL; control positivo (esperma con bacteria) (10µl/mL); esperma con A/A y bacteria AB1, 5µl/mL; AB2, 10µl/mL; AB3, 15µl/mL.

VI. 4. Crecimiento bacteriano de *Vibrio harveyi* en muestras criopreservadas

(-196°C) de esperma de Abulón Rojo *Haliotis rufescens*

Los resultados demostraron una disminución del número de bacterias inoculadas en el control positivo (esperma con bacteria), sin embargo, el proceso de criopreservación no eliminó las bacterias de las muestras que no contenían la solución antibiótico/antimicótico A/A (Figura 9). Los tres tratamientos que contienen esperma con bacteria y las tres concentraciones (5, 10 y 15 µl/mL) de la solución A/A, no presentan crecimiento bacteriano por parte del inóculo de *Vibrio harveyi*, lo cual demuestra que el proceso de criopreservación con la adición de A/A impide el crecimiento de las bacterias *V. harveyi*.

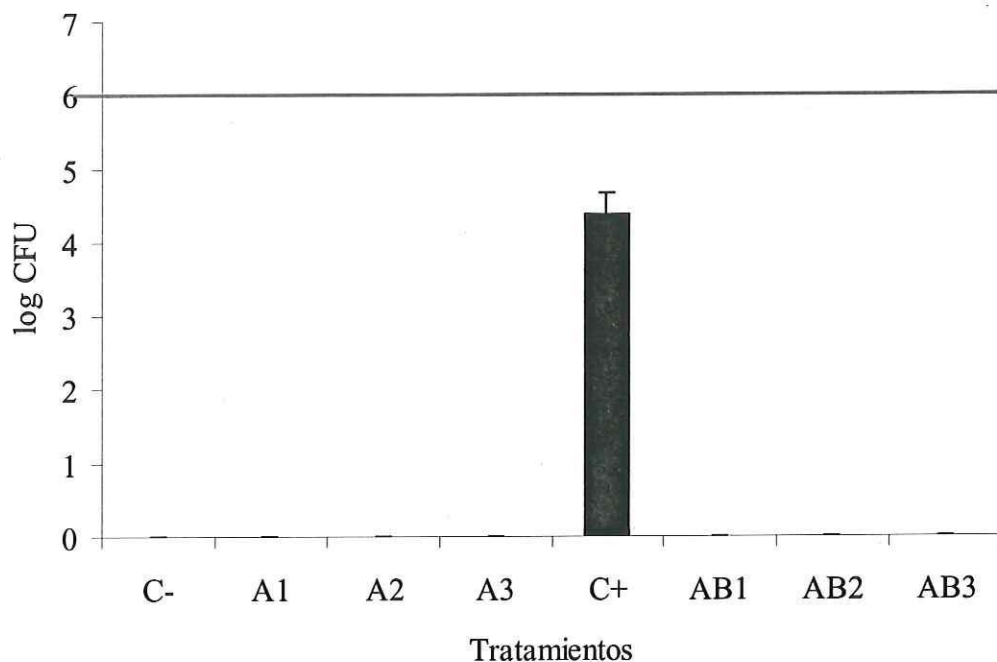


Figura 8. Sobrevivencia de bacterias (logCFU) en medio THA en muestras Criopreservadas (-196°C). Control negativo (solo esperma); esperma con Antibiótico/Antimicótico (A/A) a diferentes concentraciones A1, 5µl/mL; A2, 10µl/mL; A3, 15µl/mL; control positivo (esperma con bacteria) (10µl/mL); esperma con A/A y bacteria AB1, 5µl/mL; AB2, 10µl/mL; AB3, 15µl/mL.

VII. DISCUSIÓN

VII. 1. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma refrigerado (4°C)

Los resultados de este estudio demostraron que el tratamiento con la solución antibiótico/antimicótico A/A tiene un efecto sobre la motilidad del esperma de abulón rojo *H. rufescense*. El esperma tratado con la concentración mas baja de la solución A/A (5µl/mL) presenta un mayor porcentaje de motilidad en comparación con el control negativo (solo esperma). Sin embargo, la disminución de la movilidad a concentraciones más altas de A/A, sugiere un efecto tóxico de la solución antibiótico/antimicótico A/A. En estudios realizados en el bagre de canal *Ictalurus punctatus*, se encontró que la

solución A/A tuvo un efecto tóxico en el esperma, ya que este perdió la motilidad después de 14 h de almacenamiento (Christensen, Tiersch., 1996). Estos autores sugieren que el efecto tóxico pudo haber sido debido a la interacción de los antibióticos y la anfotericina B, los cuales se encuentran incluidos en la mezcla de la solución A/A. La anfotericina B es un compuesto que se une a los esteroides de las membranas celulares tanto de los hongos como en células humanas, deteriorando la integridad de las mismas, produciendo una pérdida de potasio y otros contenidos celulares (Beyer *et al.* 1994). La mayor afinidad de la anfotericina B hacia el ergosterol, un esteroide encontrado en las membranas de los hongos es la clave de su acción antifúngica. Sin embargo, como el fármaco se une también al colesterol (esteroide preferente de las membranas de las células humanas), este presenta algunos efectos tóxicos a nivel celular (Robinson *et al.* 1999).

De esta manera, de acuerdo a los resultados obtenidos de este trabajo, es probable que la anfotericina B también estuviera actuando en la membrana celular del esperma, provocando un daño de tal manera que forme poros que den como resultado pérdida de la viabilidad del esperma. Hasta la fecha poca información se tiene sobre el efecto de la anfotericina B en la viabilidad del esperma de especies acuáticas. Por lo que sería importante averiguar el efecto de estas sustancias, ya que el uso de la solución A/A en los quehaceres de la acuicultura es muy común.

VII. 2. Efecto citotóxico del A/A en la motilidad del esperma criopreservado

(-196°C)

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la motilidad del esperma que no contenía la solución antibiótico/antimicótico (A/A) fue mejor. Esto sugiere que de alguna manera, al igual que en el experimento de muestras refrigeradas la solución A/A tuvo un efecto tóxico en el esperma. El proceso de criopreservación produce diferentes tipos de daño (Jamieson, 1991). Cuando la temperatura baja, el agua dentro de las células tiende a salir para compensar la presión osmótica ejercida. El uso de los crioprotectantes ayuda a disminuir este daño (Jamieson y Barri, 1991). Sin embargo, es posible que cuando la célula se este deshidratando la concentración de la solución A/A en la muestra aumente y esto haga que se produzca un efecto tóxico en las muestras congeladas. Al igual como se vio en las muestras refrigeradas, ya existe una posibilidad de que el compuesto anfotericina B este causando daño a la membrana del esperma, sin embargo, el proceso de congelación podría aumentar este daño. Por lo tanto, sería importante revisar por separado el efecto tóxico de los antibióticos o antimicóticos derivados del fenómeno de concentración en muestras congeladas.

VII. 3. Efecto de la solución antibiótico/antimicótico (A/A) en el crecimiento bacteriano en muestras de esperma refrigerado (4°C)

Las especies microbianas del género *Vibrio* son bacterias patógenas para organismos utilizados en acuicultura (Austin *et al.* 1993). Las especies de *Vibrio* asociadas con enfermedades en animales marinos, incluyen *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. salmonicida*, *V.*

splendidus, y *V. vulnificus* (Austin *et al.* 1993). El crecimiento bacteriano puede ser un grave problema cuando se intenta coleccionar muestras de esperma para ser transportada de una granja a otra o cuando se pretende refrigerarlas para ser utilizada posteriormente. La administración de la solución antibiótico/antimicótico (A/A) ha demostrado tener efectos positivos en esperma refrigerado de la carpa común *Cyprinus carpio* (Saad *et al.* 1996) ya que disminuyó el crecimiento bacteriano en estas muestras. Los resultados obtenidos en este trabajo con esperma de abulón rojo demostraron que efectivamente *V. harveyi* tiene un efecto negativo en la motilidad del esperma y que es importante eliminar este patógeno de las muestras. En este trabajo, la inhibición del crecimiento bacteriano por medio de la solución A/A mejoró la movilidad del esperma del abulón rojo además de prolongar el tiempo de almacenamiento a 4°C. Auroux *et al.* (1991), demostró el efecto de la relación esperma y bacteria sobre la disminución de la motilidad del esperma en humanos utilizando *E. coli*. Un resultado importante encontrado en este trabajo es el referente a la mejor concentración para inhibir el crecimiento bacteriano en muestras refrigeradas, correspondió a la concentración más baja (5µl/mL), en vez de la más alta (15µl/mL). Esto es debido a que la concentración más alta de la solución A/A produce un efecto tóxico sobre el esperma de tal manera que lo inactiva, es posible que la bacteria aprovecha esto y utilice al esperma como sustrato o bien los crioprotectores protegen la bacteria del daño celular (Sato *et al.* 2006), ya que a menor concentración de la solución A/A tenemos menor crecimiento bacteriano y mayor motilidad (figura 7).

VII. 4. Efecto de la solución antibiótico/antimicótico (A/A) en el crecimiento bacteriano en las muestras de esperma criopreservado (-196°C)

El uso de la solución A/A en las muestras congeladas de esperma de abulón fue muy efectiva ya que los resultados mostraron una reducción drástica en el crecimiento de *Vibrio harveyi*. Sin embargo, *V. harveyi* no fue eliminado de las muestras donde se encontraba sin la adición de la solución A/A. Esto demuestra que el proceso de criopreservación utilizado para el esperma también protegió a las bacterias y por lo tanto al momento de descongelar las muestras de esperma, existe un peligro potencial de introducir bacterias viables al momento de fertilizar con esperma descongelado. En este trabajo se ha demostrado el gran riesgo que se puede correr respecto a la transferencia de patógenos de muestras congeladas en bancos de germoplasma, laboratorios que utilizan esperma descongelado para experimentación y en granjas de producción. Hasta la fecha no se conocen trabajos relacionados a la posible contaminación cruzada en esperma de especies acuáticas. Sin embargo, después de los resultados encontrados en este trabajo es de primordial importancia detectar si se ha transferido alguna bacteria en las muestras de esperma, ya sea refrigeradas o criopreservadas. El trabajo relacionado a la transferencia de patógenos en muestras de esperma de otras especies tales como mamíferos son pocas, y esto es debido a que a diferencia de muchas especies acuáticas el tipo de fertilización es interna a diferencia del abulón rojo la cual es externa (Vega y Michel, 1992) y cuando se hace la recolecta de esperma, por ejemplo, de toros, se realiza simulando la fertilización interna. De esta manera, la contaminación cruzada es reducida grandemente. Por lo contrario, en muchas especies acuáticas, la fertilización es externa; es decir, los gametos son liberados en el agua (Babcock y Keesing, 1999). Este tipo de fertilización aumenta el

riesgo de una contaminación cruzada. Por lo tanto es de suma importancia realizar protocolos de seguridad para minimizar o impedir tal contaminación de las muestras de esperma previas a la criopreservación.

VIII. CONCLUSIONES

1. El antibiótico/antimicótico en concentraciones de 5 μ l/mL mantuvo la mejor movilidad y extendió el tiempo de almacenamiento del esperma del abulón rojo *Haliotis rufescens* en muestras refrigeradas a 4°C.
2. El antibiótico/antimicótico tiene un efecto negativo en la movilidad del esperma descongelado.
3. La solución antibiótico/antimicótico en concentración de 5 μ l/mL eliminó efectivamente las bacterias *Vibrio harveyi* en muestras refrigeradas después de 72 horas.
4. La solución antibiótico/antimicótico en todas sus concentraciones eliminó efectivamente a *Vibrio harveyi* de las muestras criopreservadas.
5. Existe un potencial de contaminación cruzada en las muestras criopreservadas, si éstas contienen un patógeno y si no han sido tratadas con un antibiótico.
6. Se deben de desarrollar protocolos para prevenir la contaminación cruzada en muestras de esperma de especies acuática.

IX. PERSPECTIVAS

1. Es necesario realizar un estudio bioquímico sobre el efecto de la anfotericina B en células espermáticas. La anfotericina B puede ser la responsable de la falta de movilidad del esperma ya sea refrigerado o congelado.
2. Probar por separado los 3 componentes de la solución antibiótico/antimicótico sobre la motilidad del esperma de abulón rojo.
3. Utilizar otros tipos de antibióticos para prevenir de una contaminación cruzada en esperma de especies acuáticas.
4. Es necesario desarrollar programas de prevención y protocolos para determinar la posible contaminación cruzada con patógenos que se encuentren en el agua en donde se cultivan los organismos y de donde se colecta la muestra de esperma.
5. Desarrollar un método de detección de bacterias del género *Vibrio* por medio del uso de marcadores moleculares.

X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Allen, SK, Jr., y D. Bushek. 1992. Large scale production of triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin) using "stripped" gametes. *Aquaculture*, 103, 241-251.
2. Auroux, M.R., L. Jacques, D. Mathieu y Auer J. 1991. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study in man with *Escherichia coli*. *Int J Androl* 14: 264-270
3. Austin, B. y Austin, D. A. 1993. Bacterial fish pathogens—disease in farm and wild fish. 2nd Ed. Ellis Horwood, Ltd. New York. 384 p.

4. Babcock R., y Keesing John. 1999. Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevis*: laboratory and field studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci./J. can. sci. halieut. aquat.* 56(9): 1668-1678.
5. Bergan, P.I., D. Gausen y Hansen L. P. 1991. Attempts to reduce the impact of reared Atlantic salmon on wild in Norway. *Aquaculture* 98, 319 -324.
6. Beyer J, Schwartz S, Barazen G. 1994. Use of amphotericin B aerosols for the prevention of pulmonary aspergillosis. *Infection.* 22:143-8.
7. Billard, R., J. Cosson, G. Perchee y Linhart O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* 129: 95-112.
8. Bromage, N. R. y Roberts R. J. 1995. Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science Ltd. Malden, MA. 424 pp.
9. Bussen, S., Mulfinger, L., Sutterlin, M., Schleyer, M., Kress, W. y Steck, T. 1997. Dizygotic twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of 1 day old unfertilized oocytes. *Hum. Reprod.*, 12: 2560–2562.
10. Cotell, E., Lennon B. y McMorro J. 1997. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 67: 98–103
11. Christensen M. y Tiersch T. 1996. Refrigerated Storage of Channel catfish Sperm. *Journal of world Aquaculture society.* 27: 3.
12. Cox, K. W. 1962. California Abalones, Family Haliotidae. The Resources Agency of California Department of Fish and Game. Fish Bulletin No. 118. 133 pp.

13. Díaz, F., Del Río Portilla M. A, Sierra E., Aguilar M. y Re Araujo A. D. 2000. Preferred Temperature and Critical Termal Máxima of Red Abalone *Haliotis rufescens*. *Journal of Thermal Biology*. 25: 257 – 261.
14. Diemer, T., W. Weidner y Michelmann H. W. 1996. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. *Int. J. Androl.*, 19, 271–277.
15. Doi, M., T. Hoshino, Y. Taki, y Ogasawara Y. 1982. Activity of the Sperm of the Bluefin Tuna *Thunnus thynnus* under Fresh and Preserved Conditions. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 48 (4): 495 – 498.
16. Forman, R., F. Guillett Rosso y Fari A. 1987. Importance of semen preparation in avoidance of reduced *in vitro* fertilization results attributable to bacteria. *Fertil. Steril.*, 47: 527–530.
17. Friberg, J. y Fullan N. 1983. Attachment of *Escherichia coli* to human spermatozoa. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 146: 465–467
18. Garza Salas, A. E. y Searcy-Bernal, R. 1992. Desarrollo y Estado Actual del Cultivo de Abulón en México. En: *Abalone of the World*. Shepherd, S. A., M. J. Tegner y S. A. Guzmán del Proo (ed). *Proceedings of the 1st International Symposium on Abalone*, 538 - 546.
19. Geffen, A.J. y Evans, J.P. 2000. Sperm traits and fertilization success on male and sex-reversed female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 182: 61-72
20. Guzmán del Proo, S. A. 1992. A Review of the Biology of Abalone and its Fishery in Mexico. En: *Abalone of the World*. Shepherd, S. A., Tegner M. J. y

- Guzmán del Proo S. A. (ed). Proceedings of the 1st International Symposium on Abalone. 341 – 360.
21. Guzmán del Proo, S.A. y Ortiz Quintanilla M. 1972. Descripción y diagnóstico de la pesquería del abulón. Instituto Nacional de la Pesca. México PNUD/FAO: 227-258.
 22. Gwo, J. C. 2000a. Cryopreservation of Aquatic Invertebrate Semen: a Review. *Aquaculture Research*. 33: 259 – 271.
 23. Gwo, J. C. 2000b. Cryopreservation of Sperm of Some Marine Fishes. En: Tiersch, T. R. y P. M. Mazik, (ed). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, 138 – 160.
 24. Gwo, J. C., C. W. Chen y Cheng H. Y. 2002. Semen Cryopreservation of Small Abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology*. 58: 1563 – 1578.
 25. Hahn, K. 1989. Handbook of Culture of Abalone and other Marine Gastropods. CRC Press Ed. 135-153 pp.
 26. Hernández G. y Olmos J. 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 722-727.
 27. Huyser, C., F. L. Fourie, M. Oosthuizen, y Neethling A. 1991. Microbial flora in semen during *in vitro* fertilization. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.*, 8: 260–264.
 28. Hulata, G. y Rothbard S. 1979. Cold storage of carp sperm for short periods. *Aquaculture* 16: 267 – 269.

29. Jamieson, G. M. Barrie. 1991. With a survey of lophophorate echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press. 19: 231-243.
30. Jenkins, J.A. 2000a. Minimizing microbial contamination of sperm samples. Pages 276-279 T.R. Tiersch and P.M. Mazik, editors. *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
31. Jenkins, J.A. 2000b. Regulatory considerations for the global transfer of cryopreserved fish gametes. Pages 364-379 T. R. Tiersch y P. M. Mazik, editors. *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
32. Johansson, J., Stefansson S. E., Gudnason A. y Steinarsson A. 1999. Genetic Variation for Survival and Shell Length of Cultured Red Abalone (*Haliotis rufescens*) in Iceland. *Journal of Shellfish Research*. 18 (2): 621 – 625.
33. Kampelmacher E. H., Mossel, D.A.A., Van Noorle-Jansen, y Vicente A. H. 1970. A survey on the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* on fish and shellfish, marketed in the Netherlands. *-J. Hyg. Camp.*, 68: 189-196.
34. Kaur, M., Tripathi K. K. y Bansal M. R. 1986. Bacteriology of cervix in cases of infertility: effect on human sperm. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 12: 21–27.
35. Lahnsteiner, F. 2000. *Cryopreservation Protocols for Sperm of Salmonid Fishes*. En: *Cryopreservation in Aquatic Species*. Tiersch, T. R. y P. M. Mazik, (ed). World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, 91 – 100.

36. Leighton, D. L. 2000. The Biology and Culture of the California Abalones. Pittsburgh, PA, Dorrance Publishing Co., Inc. 216pp.
37. Leffler, K. S. y Walters C. A. 1996. A Comparison of Time, Temperature, and Refreezing Variables on Frozen Sperm Motility Recovery. Fertility and Sterility. 65 (2): 272 – 274.
38. Lightner, D. V. 1994. Patología del camarón. Enfermedades de mayor importancia para la industria camaronícola en las Américas. En: Memorias Seminario Internacional de Camaronicultura en México. Camarón 1994. (Editor: J. Z. Hernández). Ralston Purina International, Mazatlán, México. 1-53.
39. Lightner, D. V. y Lewis D. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. Mar. Fish. Rev. 37: 25-28.
40. Liversedge, N. H., Jenkins J. M. y Keay S. D. 1996 Antibiotic treatment based on seminal cultures from asymptomatic male partners in in-vitro fertilization is unnecessary and may be detrimental. *Hum. Reprod.*, 11: 1227–1231
41. Matsunaga, H., Iwata N., Kurokura H. y Hirano R. 1983. A Preliminary Study about Cryopreservation of Abalone Sperm. *J. Fac. Appl. Biol. Sci.* 22: 135 – 139.
42. Mohny, L. L., Lightner D. V. y Bell T. A. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* boone (Crustacea: Decapoda). *Journal of the World Aquaculture Society.* 25: 116-125.
43. Mongkonpunya, K., Pupipat T. y Tiersch T. R. 2000. Cryopreservation of Sperm of Asian Catfishes Including the Endangered Mekong Giant Catfish. En:

- Tiersch, T. R. y P. M. Mazik, (ed). Cryopreservation in Aquatic Species, World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, 108 – 116.
44. Montagut, J.M., Leprêtre S, Degoy J. y Rousseau M. 1991. Ureaplasma in semen and IVF. *Hum. Reprod.*, 6:727–729
45. Mulla, K.F., Köhn F. M y Dandal M. 1996. *In vitro* effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. *Arch. Androl.*, 37: 73–78.
46. Muroga, K. 1975. Studies on *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum* infection. Hiroshima Univer. 14: 101-205.
47. Oakes, F. R. y Ponte R. D. 1996. The Abalone Market: Opportunities for Cultured Abalone. *Aquaculture*. 140: 187 – 195.
48. Paniagua-Chavez, C. G., and Tiersch T. R. 2006. Laboratory Studies of Cryopreservation of Sperm and trochophore Larvae of the Oyster *Cryobiology*, Vol. 7: 31-37
49. Perchec, G., Jeullin C., Cosson J., André F. y Billard R. 1995. Relationship Between Sperm ATP Content and Motility of Carp Spermatozoa. *Journal of Cell Science*. 106: 747 – 753.
50. Piironen, J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m.lacustris* L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture* 16: 275-285.
51. Riedel, H.H., Baukloh V., y Mettler L. 1984. Minimal requirements for ejaculates used for *in vitro* fertilization. *Arch. Androl.*, 12: 69–77.

52. Riley, K. L. P. 2002. Refrigerated Storage and Cryopreservation of Sperm for the Production of Red Snapper and Snapper Hybrids. Tesis Doctoral. . School of Forestry, Wildlife, and Fisheries. Louisiana State University. 192 pp.
53. Riquelme, C., Toranzo A. E., Barja J. L., Vergara N. y Araya R. 1996. Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of Scallop (*Argopecten purpuratus*). J. Invert. Pathol. 67: 213-218.
54. Robinson R. F. y Nahata M. C. 1999. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. *J Clin Pharm Ther.* 24: 4 249-57.
55. Saad A., Billiard R., Theron M. C. y Hollebecq M. G. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture* 71: 133-150.
56. Salinas-Flores L, Paniagua-Chavez CG, Jenkins JA and Tiersch TR. 2005. Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*). *Journal of Shellfish Research* 24: 415-420.
57. Shepherd, S. A., Turrubiates-Morales J. R. y Hall K. 1998. Decline of the Abalone Fishery at La Natividad, México: Overfishing or Climate Change?. *Journal of Shellfish Research.* 17 (3): 839 – 846.
58. Sosa, C.F. y Apodaca C. 1998. Estrategias de mejoramiento genético de los ovinos para el centro de México. Memorias del curso: Bases de la Cría Ovina IV. Ed. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. 161-169.
59. Stoss, J. y Refstie T. 1983. Short term and cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30: 229-236.
60. Stovall, D.W., Bailey L.E., y Talbert L. M. 1993. The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing *in vitro*

- fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. *Fertil. Steril.*, 59: 197–201.
61. Vega V., y Michel E. 1992. Contribución al conocimiento de la biología reproductiva del abulón azul (*Haliotis fulgens* Philippi 1845), en el litoral de Punta Eugenia, B.C.S. México. Res. IX Simp. Biol. Mar. UABCS, La Paz, México.
62. Tiersch, T. R., Goudie C. A. y Carmichael G. J. 1994. Cryopreservation of Channel Catfish Sperm: Storage in Cryoprotectants, Fertilization Trials, and Growth of Channel Catfish Produced with Cryopreserved Sperm. *Transactions of the American Fisheries Society*. 123: 580 – 586.
63. Tsai, H. P. y Chao N. H. 1994. Cryopreservation of Small Abalone Sperm (*Haliotis diversicolor*) Sperm – Technique and Its Significance. *J. Fish. Soc. Taiwan*. 21 (4): 347 – 360.
64. Wayman, W. R. y Tiersch T. R. 2000. Research Methods for Cryopreservation of Sperm. En: Tiersch, T. R. y P. M. Mazik, (ed). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, 264 - 275.
65. Wedemeyer, G. A. y Woo J. W. 1974. Stress as a predisposing factor in fish diseases. United States Department of the Interior. Fish Disease Leaflet 38, Washington, U.S.A. 8 p.
66. Wilhem, K. M., Graham J. K. y Squires E. L. 1996. Effects of Phosphatidylserine and Cholesterol Liposomes on the Viability, Motility, and Acrosomal Integrity of Stallion Spermatozoa Prior to and after Cryopreservation. *Reprod. Suppl.* 33: 320 – 329.

67. Willén, M., Holst E., Myhre E. B. y Olsson A. M. 1996. The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 30: 387–393.
68. Wiltbank, M. 1997. How information of hormonal regulation of the ovary has improved understanding of times breeding programs. Proceeding of the Annual Meeting of the Society for theriogenology pp 83 - 97
69. Wolff, H., Panhans A., Stolz W. y Meurer M. 1993. Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E.coli*. *Fertil. Steril.*, 60: 154–158
70. Zherdemant, M. T. 1996. Caracterización de una cepa bacteriana de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de Bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio in vitro con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis de Grado para optar al título de Acuicultor. Guayaquil, Ecuador. Escuela Superior y Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. 80 p.

Internet:

- www.steve.gb.com/science/molecules.html
- www.biosite.dk
- www.powerpak.com