



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas



“Eficacia de un fitogénico comercial (Coxsan) para el control de una infección bacteriana dirigida (*Vibrio harveyi*) en lobina rayada (*Morone saxatilis*)”

T E S I S

Para obtener el título de:
Licenciada en Biotecnología en Acuicultura

Presenta:
Sasha Ian Pereira Rodriguez

Ensenada, B.C, México.

Abril, 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA



"Eficacia de un fitogénico comercial (Coxsan) para el control de una infección bacteriana dirigida (*Vibrio harveyi*) en lobina rayada (*Morone saxatilis*)"

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

PRESENTA:

Sasha Ian Pereira Rodriguez
359419

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:


Samuel Sanchez Serrano
DIRECTOR


Natalie Millán Aguiñaga
CODIRECTORA


Mónica Torres Beltrán
SINODAL

"Por la Realización Plena del Ser"

C.c.p.- Archivo
C.c.p.- Minutario

DEDICATORIA

A mis padres, Walter Pereira y Mariela Rodríguez por acompañarme en este camino, por enseñarme a que siempre debo fijarme metas, las cuales se van cumpliendo. Por alentarme a siempre seguir adelante y luchar por lo que quiero, además de recordarme que los procesos en esta vida se deben de disfrutar y tomarlo del lado positivo a pesar de que algunas ocasiones los resultados no son como lo esperamos, por su comprensión y consejos en los momentos difíciles gracias a su apoyo incondicional el día estoy culminando mi etapa universitaria, los amo.

A mi familia, abuela, abuelo, hermanos, suegros, cuñada por siempre creer en mí, motivarme en seguir adelante, escucharme y compartir conmigo esta experiencia.

A Osvaldo López, por ser una pareja incondicional que desde el primer momento me apoyó y acompañó, por todas las noches de desvelo en el laboratorio, por creer en mí, en lo que soy capaz, por amarme. Por todo el apoyo brindado, a pesar de todos los retos o complicaciones presentados siempre me motivaste a terminar con éxito este proyecto, mi cómplice hasta el final.

A mis amigos, Marilyn C., Marian G., Ángel B., Fernando M., Jesús R., América D., Alejandra Z., Andrea Z., por ser parte de este importante paso en mi vida académica, por estar presente siempre en los momentos difíciles, ser pacientes, aconsejarme cuando no encontraba el camino, y distraerme cuando era justo y necesario.

Y a todas las personas que directa o indirectamente formaron parte de este proyecto, colaborando, aconsejando y ayudando de una u otra forma para que se lleve a cabo con éxito.

¡MUCHAS GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California, en especial a la Facultad de Ciencias Marinas por permitir mi desarrollo profesional mediante todo su conocimiento brindado a lo largo de mi carrera.

A la Unidad de Biotecnológica de Piscicultura (E-20), por facilitarme el espacio donde llevé a cabo los bioensayos.

A la empresa Pacífico Aquaculture, por brindarme los organismos de *Morone saxatilis* para el desarrollo de esta investigación.

A mi director de tesis el Dr. Samuel Sánchez Serrano, por su confianza y sobre todo por su paciencia, por permitirme formar parte de este increíble proyecto. Por guiarme en mi formación profesional y brindarme nuevas habilidades para mi desarrollo, por fomentar en mí el gusto hacia el bienestar animal y el uso de fitogénicos, muchas gracias.

A la Dra. Natalie Millán Aguiñaga, gracias por todo el conocimiento acerca del mundo de la microbiología, a pesar de que usted está del lado positivo se inclinó hacia el lado negativo para guiarme en este proyecto.

A mi sinodal Dra. Mónica Torres Beltrán, por su tiempo dedicado a enriquecer este proyecto, por su paciencia al revisar y escuchar acerca del mismo, además de brindar una perspectiva más amplia acerca del uso de los fitogénicos.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
Listado de figuras.....	7
Listado de tablas.....	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 ANTECEDENTES.....	9
1.1.1 Lobina Rayada (<i>Morone saxatilis</i>).....	9
1.1.2 Bacterias del Género <i>Vibrio</i>	11
1.1.3 Fitogénicos.....	12
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo General.....	14
3.2 Objetivo Específico.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1 Aislamiento y purificación.....	15
4.2 Determinación de Cinética Bacteriana.....	15
4.3 Identificación Bacteriana.....	16
4.3.1 Identificación Bioquímica.....	16
4.3.2 Identificación Molecular.....	16
4.4 Reto Bacteriano.....	16
4.5 Determinación de Concentración Mínima Infecciosa.....	17
4.5.1 Concentración Mínima Infecciosa.....	17
4.5.2 Signología Macroscópica y Microscópica.....	17
4.5.2.1 Macroscópica.....	17
4.5.2.2 Microscópica.....	17
4.6 Evaluación de la Eficacia del Fitogénico con el Control Bacteriano.....	18
4.6.1 Preparación de Alimento con Adición de Fitogénico (Alicina, Timol y Carvacrol).....	18
4.6.2 Preparación de Organismos.....	18
4.6.3 Proceso de Infección.....	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Crecimiento de Cepa Bacteriana.....	20
5.2 Cinética Bacteriana.....	20
5.3 Identificación Bacteriana.....	21
5.4 Reto Bacteriano.....	22
5.6 Evaluación de la Eficacia del Fitogénico en el Control Bacteriano.....	25
5.6.1 Postulado de Koch.....	25
5.7 Análisis de Supervivencia.....	26
6. DISCUSIÓN.....	28

7. CONCLUSIONES.....	32
8. REFERENCIAS.....	33
9. ANEXOS.....	38

Listado de figuras

Figura 1. Especimen de lobina rayada (*Morone saxatilis*) donde se observa su morfología externa.

Figura 2. A) Aislamiento de cepa bacteriana obtenido de la UBP, inoculadas en medio específico Cytophaga™, con crecimiento tipo enjambre característico de bacterias del género *Vibrio*. B) Resiembra de cepa bacteriana inoculada en medio Cytophaga™ con crecimiento normal.

Figura 3. Medición de crecimiento de *Vibrio harveyi* en 14 y 48 horas por triplicado. A) *Vibrio harveyi* con medición cada 2 horas por 14 horas con tasa de duplicación de 48.63 min. B) *Vibrio harveyi* con medición cada 6 horas por 48 horas con tasa de duplicación de 80.93 min.

Figura 4. A) Signología a las 72 horas post-infección con erosión muscular (círculos) y en la aleta caudal (flecha negra). B) Signología a las 72 horas post-infección con lesiones en opérculos con apariencia algodonosa (flecha amarilla)

Figura 5. A) Bazos superiores con apariencia normal (óvalo amarillo) y bazo inferior con turgencia (fuera del óvalo). B) Bazo turgente e hiperémico de organismos post-infección con CMI

Figura 6. Muestra de bazo de infección con dosis 1×10^5 UFC/mL se presenta infiltración de proteínas (flechas blancas), acumulación de centros de melanomacrófagos (círculo amarillo) y posible presencia de bacterias en forma de coma (flecha amarilla). Tinción H & E. Aumento a 100x.

Figura 7. A) Muestra bacteriológica de bazo en medio tiosulfato citrato sacarosa bilis (TCBS) sacarosa positivo indicativo de la bacteria correspondiente a *V. harveyi* donde se observa colonias aisladas post-infección. B) Muestra bacteriológica de bazo en medio *Vibrio* ChromoSelect Agar con colonias del color característico de *V. harveyi* con colonias aisladas post-infección. C) Muestras bacteriológicas de bazo en medio ChromAgar *Vibrio* con crecimiento tipo enjambre post-infección. Seguimiento al postulado de Koch.

Figura 8. Supervivencia obtenida en 144 horas en la infección por tratamientos.

Figura 9. Riesgo de mortalidad de los organismos en la infección por tratamiento en un periodo de 144 horas.

Listado de tablas

Tabla I. Signología presentada en los organismos en la identificación del cuadro clínico

RESUMEN

Las infecciones bacterianas han sido uno de los principales problemas sanitarios a los cuales la acuicultura mundial se ha enfrentado. Una de las líneas que en los últimos años retomó fuerza ha sido el uso de extractos de plantas conocidos como fitogénicos o fito bióticos, por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar y determinar la eficacia de un fitogénico comercial a base de alicina, timol y carvacrol en el control de una infección dirigida con *Vibrio harveyi* en lobina rayada (*Morone saxatilis*). Para ello, se realizó la preparación del alimento con tres diferentes concentraciones: baja (1.0 mL/Kg), media (1.5 mL/Kg) y alta (2.0 mL/Kg) del fitogénico comercial el cuál se le proporcionó a los organismos durante dos meses. De igual forma, se realizó la identificación bioquímica y molecular de la bacteria, después realizar una curva de crecimiento para determinar el tiempo de crecimiento exponencial de la bacteria y posteriormente mediante su fase exponencial se determinó la concentración mínima infecciosa diluyendo el concentrado bacteriano. Para el bioensayo se inocularon a los organismos de forma individual por inyección intraperitoneal y post-infección se determinaron los signos cada 12 horas hasta su recuperación o muerte. En cuanto a los resultados, en las primeras 12 horas se obtuvo una mortalidad del 1% en la concentración baja (CB), del 1% en la concentración media (CM) y del 0% en la concentración alta (CA); en general, todos los organismos presentaron dermatitis en aleta caudal. Comparados con otros trabajos el fitogénico comercial utilizado previene que se forme una infección aguda y siendo benéfico para los organismos.

Palabras clave: Lobina rayada (*Morone saxatilis*), *Vibrio harveyi*, antibióticos, fitogénicos, alicina, timol, carvacrol, mortalidad, signología, concentración mínima infecciosa.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se puede definir como un conjunto de técnicas, actividades y conocimientos de crianza de diversas especies acuáticas, tanto animales como vegetales, para que éstas se desarrollen en diversas condiciones controladas de cultivo, en medios de agua salada y dulce (INES, 2018). Actualmente, se encuentra el desafío mundial para la producción de alimentos, donde la acuicultura presenta una opción de crecimiento como industria generadora de alimento. Por ejemplo, la FAO (2022) prevé que la acuicultura para el año 2050 se intensifique llegando casi a duplicar la producción que se tiene actualmente, esto debido a la alimentación y nutrición que se le deberá de dar a la población mundial (estimada a alcanzar 10,000 millones de personas).

En la actualidad, la acuicultura forma parte de un desarrollo sostenible y rápido con un futuro garantizado en el cultivo y comercialización de diversas especies. Sin embargo, el traslado y comercialización internacional de organismos acuáticos a gran escala ha ocasionado el progresivo crecimiento de problemas patológicos, lo cual provoca rendimientos bajos y grandes pérdidas económicas en diversos países que se dedican a realizar dicha actividad (Cuéllar, 1984; Sanz, 2001). Uno de los agentes con potencial patogénico que actualmente ha tomado mayor relevancia son las bacterias. Para su control, se han implementado diversas terapias con antibióticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos antimicrobianos ha dado origen a la generación de cepas resistentes a los antibióticos que son utilizados mayormente en la industria de producción acuícola (García et al, 2022). Dada esta situación la búsqueda de tratamientos alternativos para el control bacteriano ha puesto a la terapia con compuestos a base de plantas (fitogénicos) como una alternativa viable.

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Lobina Rayada (*Morone saxatilis*)

La lobina rayada (*Morone saxatilis*) es un pez anádromo por lo que vive mayormente en agua salada pero migra a aguas dulces para desovar. La lobina se puede encontrar a lo largo de la costa Atlántica de América del Norte y fue introducida en la costa del Pacífico, por lo que actualmente puede encontrarse

desde México hasta Columbia Británica en Canadá. Este organismo tiene un cuerpo alargado y una boca grande oblicua sin barbillas, ojos pequeños y una línea lateral que se extiende hasta la aleta caudal. En cuestión de sus aletas, la primera aleta dorsal cuenta con alrededor de 8 espinas dorsales diferenciadas y la segunda presenta aproximadamente de 10 a 15 espinas cubiertas con membranas y la aleta anal tiene un primer rayo espinoso corto. (CESAIBC, 2016).



Figura 1. Especimen de lobina rayada (*Morone saxatilis*) donde se observa su morfología externa.

Este organismo puede llegar a tener una talla de hasta 150 cm y pesar alrededor de 25 a 35 kg, puede llegar a vivir hasta 25 años y alcanza su madurez sexual entre los 2 y 4 años de edad. Dadas su capacidades anádromas, su migración para su reproducción se da entre los meses de abril y junio, donde la temperatura estimada del agua para su desove se establece entre 10-23°C. Cabe destacar que es una especie omnívora por lo que se alimenta de invertebrados y otros peces. En su etapa adulta suelen alimentarse de calamares, moluscos bivalvos y pequeños crustáceos, mientras que larvas se alimentan de zooplancton (DOF, 2022).

Las infecciones bacterianas son comunes en los cultivos de peces marinos causando grandes pérdidas de producción, dentro de los patógenos bacterianos es posible que no se produzca una enfermedad clínica; sin embargo, pueden estresar y llegan a lesionar a los organismos ocasionando mortalidades. Por ejemplo, dentro de las bacterias patógenas para la lobina rayada (*Morone saxatilis*) se encuentran las bacterias del género *Vibrio*, estos llegan afectar a los peces ocasionando úlceras y hemorragias en piel, aletas y branquias (Smith, 2020).

1.1.2 Bacterias del Género *Vibrio*

Las bacterias conocidas como “*Vibrios*” son pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* en donde se clasifican en seis distintos géneros los cuales son: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Enterovibrio*, *Salinivibrio* y *Grimontia*. Las bacterias del género *Vibrio* son gram negativas, mayormente cuentan con movilidad, son anaerobios facultativos, oxidasa positivos, mesófilos y quimioorganotróficos (Bravo et al, 2007; Cuéllar, 2018).

Dentro del género *Vibrio* abundan microorganismos que habitan ecosistemas marinos y fluviales. Son consideradas bacterias móviles que llegan a crecer a 35°C en ambiente aerobio y anaerobio; además, cuentan con la particularidad de su morfología curvada en forma de coma y su dependencia al ion sodio, este ion es capaz de estimular la rapidez de su crecimiento (García Bermejo, 2001).

Thompson y colaboradores (2004) mencionan que los vibrios son bacterias oportunistas que generalmente crecen en medios como agar marino y medio selectivo de agar con tiosulfato-citrato-sal-biliar-sacarosa (TCBS) los cuales suelen ser en su mayoría oxidasa positivos. Estos son abundantes en ambientes acuáticos como lo son estuarios y aguas marinas costeras, además de encontrarse presentes en actividad acuícola como lo es la acuicultura, encontrándose en altas concentraciones en cultivos de peces, crustáceos como camarones y en zooplancton.

Dentro de los vibrios patógenos de importancia en la acuicultura se encuentran *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus* y *V. harveyi*, causando mortalidad en estadios larvales y juveniles en cultivo de peces marinos, en ocasiones provocando la muerte de toda la producción. A las afectaciones de organismos por este género de bacterias se le conocen como vibriosis y dentro de las más comunes se encuentra *V. harveyi*, este suele alojarse en la microbiota intestinal de peces marinos, también como es un patógeno primario oportunista suele provocar en ocasiones altas mortalidades (Austin et al., 2003; Diggles et al., 2000; Joshi et al., 2014).

Sin embargo, la utilización de antibióticos para el control de enfermedades es una solución parcial debido a la aparición de bacterias resistentes. Por lo que desde hace algunos años se ha comenzado con la búsqueda de soluciones alternativas y

que a la vez tengan un menor impacto al medio ambiente y es en este tema donde ha surgido el uso de los fitogénicos.

1.1.3 Fitogénicos

A partir del uso indiscriminado de los antibióticos comerciales, se buscan medicamentos alternativos a base de plantas y sus extractos, que pueden llegar a contribuir en el fortalecimiento del sistema inmunológico. Los fitogénicos son extractos de plantas que han resultado una gran fuente microbiana que pueden llegar a inhibir el crecimiento de ciertas bacterias o patógenos, esto debido a sus componentes naturales. Estos extractos proveen componentes químicos que pueden llegar a contribuir de diferente forma en la actividad antibacteriana; es decir, pueden afectar a la célula bacteriana completa ya que no tiene un mecanismo de acción específico. Por ejemplo, llegan a afectar desde la degradación de la pared celular, daños a la membrana citoplasmática, daño en proteínas de membrana, salida del contenido celular o coagulación del citoplasma (Burt, 2004; Carson et al, 2002).

Además, mediante diversos estudios se ha demostrado que los compuestos fitogénicos mejoran la respuesta inmunitaria no específica, y mejoran el crecimiento y supervivencia ante enfermedades en peces. La funcionalidad de los fitogénicos se debe al contenido de metabolitos secundarios de los vegetales de los cuales derivan. Estos compuestos bioactivos se localizan principalmente en los extractos de plantas aromáticas como lo son los aceites esenciales. Dentro de las plantas aromáticas más comunes en todo el mundo se encuentran el orégano, el ajo, la albahaca, el tomillo, la salvia, el olivo entre otras que son consumidas en diversas partes del mundo (Christaki et al, 2020; Reveter et al, 2021).

Las plantas aromáticas contienen compuestos concentrados llamados aceites esenciales los cuales son mezclas de metabolitos secundarios en los cuales se encuentran los terpenos y fenilpropenos de bajo punto de ebullición, donde existe una variedad de hidrocarburos alifáticos como lo son los fenoles donde se encuentran el timol, carvacrol, eugenol y gaiacol. Estos compuestos presentan actividades conocidas como citotóxicas lo cual se debe principalmente a los fenoles, aldehídos y alcoholes, lo cual resulta relevante para su aplicación contra diversos

microorganismos como las bacterias, virus, hongos, protozoos o patógenos (Bakkali et al, 2008; Sacchetti et al, 2005).

El orégano contiene metabolitos secundarios activos (timol y carvacrol) que poseen actividad antibacteriana, insecticida, antioxidante y antimicótica. Se ha reportado que estos interrumpen la integración de la membrana, afecta la homeostasis del pH e iones inorgánicos liberando los materiales de la membrana externa de la célula lo cual podría tener un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano (Lambert et al, 2001). El orégano ha sido ampliamente estudiado debido a su actividad antimicrobiana, esto ocasionado por su alto contenido de compuestos fenólicos, lo cual puede ser atribuido principalmente a la existencia de timol y carvacrol. Comúnmente, el carvacrol se ve relacionado con la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, mayormente en bacterias Gram positivas y una proporción de bacterias Gram negativas lo cual dependerá de la concentración del compuesto activo (Cetin et al., 2011) .

Otra planta aromática es el ajo, el cual al ser machacado activa una enzima (alinas) que al entrar en contacto con alina se produce el compuesto activo alicina el cual es un antimicrobiano natural actualmente utilizado en acuicultura. Se ha demostrado que la alicina tiene un amplio espectro con potencial antibacteriano contra bacterias Gram negativas ya que estimula células killer y macrófagos, debido a que la alicina produce una reacción química con grupos tiol de las enzimas afectando la actividad de la proteinasa de la cisteína la cual se ve involucrada en la virulencia de las bacterias (Levkovich et al, 2013; Nuñez, 2011). La alicina que es uno de los principales componentes activos del ajo tiene la capacidad de transformarse fácilmente en químicos azufrados capaces de circular por la sangre siendo el responsable de la actividad antimicrobiana.

De acuerdo con lo anterior resulta de relevancia el desarrollo de pruebas y la generación de antibióticos a base de fitogénicos para disminuir las infecciones bacterianas en la acuicultura, promoviendo el uso de medidas preventivas ante posibles infecciones en los sitios de cultivo obteniendo mayores sobrevivencias (Christaki et al, 2012). Por ejemplo, el fitogénico comercial "Coxsan" producido por laboratorios Karizoo, está formulado con los compuestos activos del ajo (alicina) y el orégano (timol y carvacrol) con su reciente aplicación dentro de la acuicultura.

2. HIPÓTESIS

La utilización de un fitogénico comercial a base de extractos de alicina, timol y carvacrol en la alimentación de la lobina rayada (*Morone saxatilis*) previo a una infección bacteriana incrementará la sobrevivencia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la eficacia del fitogénico Coxsan en el control de una infección de una cepa bacteriana aislada en lobina rayada (*Morone saxatilis*).

3.2 Objetivo Específico

- Identificar a nivel bioquímico y molecular la cepa bacteriana aislada durante un evento patológico en cultivo.
- Determinar la curva de crecimiento de la especie bacteriana de interés.
- Establecer la concentración mínima infecciosa de la bacteria identificada.
- Establecer e identificar el cuadro clínico a nivel macroscópico y microscópico ocasionada por la bacteria en la lobina rayada (*Morone saxatilis*) siguiendo los postulados de Koch.
- Determinar la eficacia del fitogénico (Coxsan) para aumentar la sobrevivencia de los organismos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento y purificación

A partir de un evento de mortalidades registrado en el hatchery de la Unidad de Biotecnología en Acuicultura, se aisló una cepa bacteriana del bazo de organismos moribundos con signos (erosión en piel, exoftalmia, y dermatitis). Esta bacteria se sembró en medio cromogénico (Cytophaga™) para obtener colonias puras y aisladas.

4.2 Determinación de Cinética Bacteriana

Para determinar las diferentes etapas de crecimiento de la bacteria se preparó un inóculo en medio Mueller-Hilton (MH) líquido al 2%, el cual se inoculó con una azada de una colonia aislada y purificada de la cepa bacteriana, y se dejó incubando por 24 horas. Posteriormente, en un matraz erlenmeyer de 125 mL se adicionó 49.5 mL de medio líquido MH 2% y 500 µL del inóculo, este procedimiento se realizó por triplicado. Se dejó crecer en un cuarto con temperatura de 30°C y con agitación de 180 rpm tomando mediciones de crecimiento a las 0, 6, 12, 18, 24, y 30 horas. Las mediciones de crecimiento se realizaron colocando 1 mL de cultivo bacteriano en un celda de plástico y midiendo su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (N4S-UV-VIS Spectrophotometer). Posteriormente, se consideró pertinente determinar con mayor precisión el intervalo de tiempo correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, por lo que se realizó una nueva curva de crecimiento, siguiendo los pasos antes mencionados pero con un intervalo de mediciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, y 14 horas.

En cada medición, se realizó una dilución seriada 9:1 (V:V) colocando 900 µL de medio por 100 µL de cultivo bacteriano en tubos Eppendorf de 2 mL. De estas diluciones se inocularon 100µL en placas de agar Mueller-Hilton 2% donde se obtuvo el recuento de las unidades formadoras de colonias, los conteos se realizaron dentro del rango de valores establecidos con mínimo 30 y máximo 300 UFC. Los datos se analizaron en el programa Excel, donde se obtuvo la fase exponencial del crecimiento bacteriano y se calculó de la tiempo de duplicación bacteriana de la cepa de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de duplicación (Td)} = 0.693 / k$$

$$\text{Donde: } \ln 2 = 0.693$$

$$k = \text{Constante de crecimiento}$$

4.3 Identificación Bacteriana

4.3.1 Identificación Bioquímica

A partir de la cepa aislada, se realizó una identificación bioquímica mediante el kit bioquímico GEN III MicroPlate™ de Biolog, el cual tiene 94 pruebas fenotípicas de las cuales 71 corresponden a sustratos de carbono y 23 de sensibilidad química (Anexo 1). Se llevó a cabo la siembra de la bacteria en placas de agar Mueller-Hilton al 2% y se dejó incubando por 24 horas a 30°C, después de la incubación se tomó una azada de una colonia aislada y se inoculó en el medio líquido B del protocolo del kit. Se midió la transmitancia mediante el turbidímetro de Biolog, se inocularon 200 µL en los 94 pozos y se incubó a 30°C por 48 horas. Posteriormente, se observó la asimilación de la bacteria a las fuentes de carbono o sensibilidad química de cada pozo mediante colorimetría, considerando los tintes redox de tetrazolio de cada pozo donde un color morado representa resultado positivo e incoloro un resultado negativo. Una vez terminada la identificación colorimétrica se revisaron los datos con el software de Biolog Gen III y se contrastaron con su base de datos, con valor de referencia del 0.0-1.0% de similitud.

4.3.2 Identificación Molecular

Se preparó un inóculo siguiendo el protocolo utilizado para determinar la cinética bacteriana. Se dejó crecer y posterior al tiempo óptimo de crecimiento se utilizó una centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5430 R) a 10, 000 rpm por 10 minutos donde se obtuvo un precipitado de la bacteria (pellet bacteriano). La extracción se realizó de acuerdo al protocolo establecido para el Kit DNeasy Blood & Tissue(QIAGEN). El ADN genómico se envió a secuenciar a la compañía SeqCenter (<https://www.seqcenter.com/>) utilizando la metodología de secuenciación Illumina NextSeq 2000. La asignación taxonómica del genoma completo se obtuvo mediante la comparación con la base de datos GTDB (Genome Taxonomy DataBase, <https://gtdb.ecogenomic.org/>).

4.4 Reto Bacteriano

Se llevó a cabo la comprobación de la patogenicidad y virulencia de la cepa bacteriana, para lo que se preparó un inóculo bacteriano de acuerdo al resultado de la cinética bacteriana. La infección se llevó a cabo en una pecera de 20 L donde se

tenían a 4 organismos, estos fueron inyectados intraperitonealmente con 200 µL del inóculo directo de bacteria, posteriormente se observaron cada 24 horas hasta su posible recuperación o muerte.

4.5 Determinación de Concentración Mínima Infecciosa

4.5.1 Concentración Mínima Infecciosa

De acuerdo al resultado de la cinética bacteriana se preparó un inóculo inicial para obtener un concentrado. A partir de este inóculo inicial se realizó una dilución seriada en tubos falcon de 10 mL. Se adicionaron 9 mL de medio líquido MH 2% y 1 mL del inóculo inicial, posteriormente se agitó y de esta primera dilución (1×10^{-1}) se tomó 1 mL y se agregó al siguiente tubo falcon con 9 mL de medio líquido MH 2% este procedimiento se repitió hasta completar una seriación de 1×10^{-7} . De estas diluciones se inocularon 100 µL en placas de agar MH 2% donde se obtuvo el recuento de las unidades formadoras de colonias por dilución. Para establecer la dosis mínima infecciosa (DMI) se inocularon 1.30 µL/gr de peso de forma intraperitoneal a cuatro organismos por dilución y 4 controles inoculados con medio MH2%. Los peces fueron colocados en peceras diferentes de acuerdo a la dilución a la que fueron inoculados. En la dilución donde se presentó el curso evolutivo de la infección se consideró la DMI descartando las diluciones donde los organismos murieron dentro de un periodo de 24 horas o no presentaron ninguna signología.

4.5.2 Signología Macroscópica y Microscópica

4.5.2.1 Macroscópica

A partir de la concentración donde se presentó el curso evolutivo de la infección se llevó a cabo el registro del comportamiento, signología o mortalidad cada 24 horas. De forma externa se observaron las lesiones aparentes, las mortalidades fueron removidas para realizar la necropsia donde se evaluó la condición visual del bazo.

4.5.2.2 Microscópica

Las mortalidades registradas en la DMI durante el periodo de observación, fueron extraídas inmediatamente y se les realizó una necropsia para obtener el bazo. Del bazo colectado se tomó una parte para bacteriología y el restante fue

utilizado para evaluar a nivel tejido el efecto directo del posible agente infeccioso realizando un análisis histológico.

Las muestras obtenidas fueron fijadas en formaldehído al 10% por 48 horas, después de este tiempo se colocaron en etanol al 70% dentro de cassettes histológicos. Posterior a esto, se colocaron los cassettes en el histoquinete en el programa 1. Una vez listas las muestras se cortaron los órganos y fueron embebidos en parafina mediante el inclusor automático de tejidos (LEICA, EG-1160). Después de tener los bloques histológicos se realizaron los cortes en un micrótopo (RM2125-RTS-LEICA) a 4µm. Los cortes fueron colocados en agua destilada con grenetina para extender la muestra para posteriormente colocarlos en un portaobjetos. Concluido este proceso, los portaobjetos se colocaron en un horno a 60°C por 24 horas. Se procedió a concluir la desparafinación de las muestras mediante el protocolo establecido en el Anexo 2. Una vez realizada la desparafinación, se llevó a cabo el proceso de tinción hematoxilina y eosina según el protocolo modificado de Megías et al (2018) (Anexo 3).

4.6 Evaluación de la Eficacia del Fitogénico con el Control Bacteriano

4.6.1 Preparación de Alimento con Adición de Fitogénico (Alicina, Timol y Carvacrol)

El fitogénico se adicionó en tres diferentes concentraciones de acuerdo a lo recomendado por el fabricante (Alivira Karizoo): 1.0, 1.5 y 2.0 mL por 1 kg de alimento. A partir del alimento formulado EWOS con pellet de 5 mm, se pesó 1 kg de alimento para cada concentración y se colocó en una charola esparciendo proporcionalmente. Después se roció con la mezcla de Coxsan y se homogeneizó, se dejó secar y se almacenó el alimento final.

4.6.2 Preparación de Organismos

Se contó con un total de 40 organismos de 150 gr promedio, los cuales fueron colocados en 8 diferentes tanques con un total de 5 organismos por tanque considerando control y los tratamientos con su duplicado. Estos organismos fueron alimentados por aproximadamente dos meses con el alimento preparado previamente.

4.6.3 Proceso de Infección

Concluidos los dos meses, los peces fueron infectados de forma individual por medio de inyección intraperitoneal siguiendo el protocolo para la determinación de la dosis mínima infecciosa.

Después de realizar la infección en los peces, estos fueron observados cada 24 horas durante 15 días registrando en la bitácora su comportamiento (pérdida del apetito y nado errático), apariencia (oscurecimiento de piel) y signos (lesiones aparentes) que presentaron hasta su recuperación, y en su caso las mortalidades (considerando la signología del cuadro clínico previamente establecido). En el caso de las mortalidades, los organismos fueron extraídos para la obtención del bazo en el cuál se les tomó una muestra para bacteriología y comprobar los postulados de Koch.

4.7 Análisis Estadístico

Para determinar el efecto del fitogénico sobre la mortalidad se realizaron pruebas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) con $p \leq 0.05$. Las gráficas y análisis se realizaron mediante el programa IBM SPSS Statistics V26.

5. RESULTADOS

5.1 Crecimiento de Cepa Bacteriana

La cepa bacteriana de *Vibrio harveyi* (Vh) utilizada en este estudio, comenzó a registrar un crecimiento bacteriano a partir de las 8 horas de sembrado en el medio cromogénico (Cytophaga™) resultando en una coloración crema lechosa. El crecimiento observado inicialmente fue el fenómeno swarming o también conocido como tipo enjambre, el cual colonizó la placa en un tiempo de 24 horas. Al realizar una resiembra se obtuvo un crecimiento normal de la cepa bacteriana siguiendo el estriado cruzado (Fig.2).

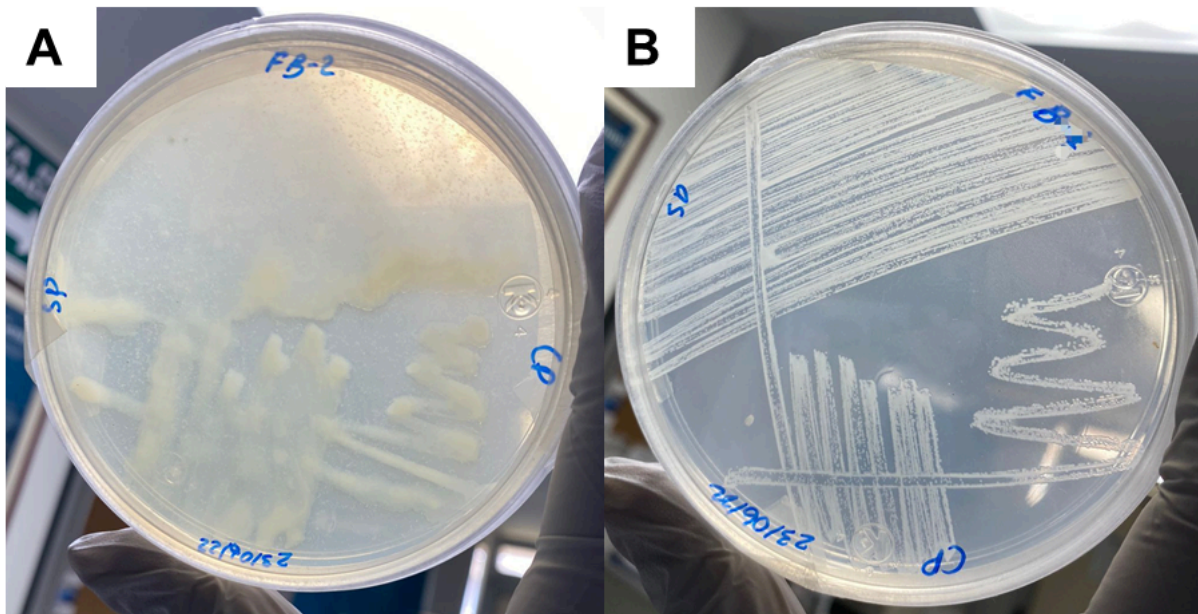


Figura 2. A) Aislamiento de cepa bacteriana obtenido de la UBP, inoculadas en medio específico Cytophaga™, con crecimiento tipo enjambre característico de bacterias del género *Vibrio*. B) Resiembra de cepa bacteriana inoculada en medio Cytophaga™ con crecimiento normal.

5.2 Cinética Bacteriana

La cepa bacteriana presentó tres fases de crecimiento (fase exponencial, estacionaria y de muerte) donde se observaron notables diferencias en sus lecturas máxima de absorbancia (Fig.3). Mediante la fase exponencial de las curvas de crecimiento se obtuvo el tiempo de duplicación el cual fue de 48.63 minutos con $k=0.8551$ (Fig.3A) y de 80.93 min con $k=0.5138$ (Fig. 3B).

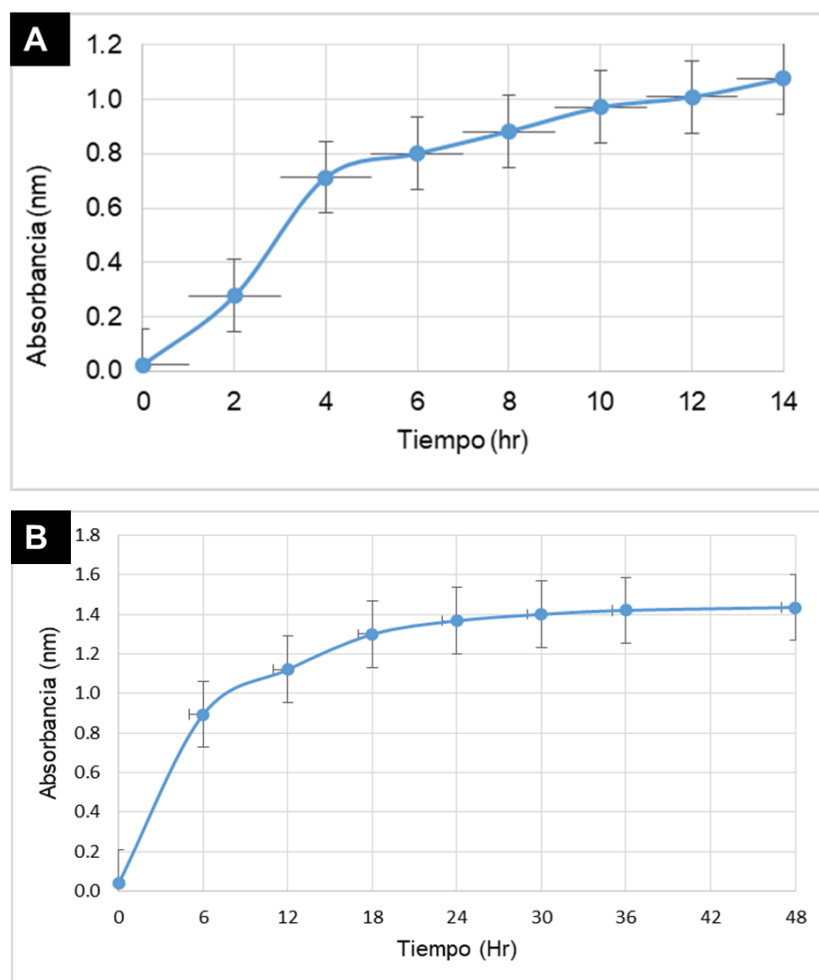


Figura 3. Medición de crecimiento de *Vibrio harveyi* en 14 y 48 horas por triplicado. A) *Vibrio harveyi* con medición cada 2 horas por 14 horas con tasa de duplicación de 48.63 min. B) *Vibrio harveyi* con medición cada 6 horas por 48 horas con tasa de duplicación de 80.93 min.

5.3 Identificación Bacteriana

A partir de la descripción bioquímica la cepa bacteriana Vh se identificó como bacilo Gram negativo. Se comparó la identificación en la biblioteca de GEN III, el cual resaltó ser bacteria perteneciente al género *Vibrio*, donde la huella fenotípica obtuvo una similitud de 0.756% con *V. harveyi* y de 0.023% con *V. parahaemolyticus* (Anexo 1).

Con base a la anotación taxonómica con la Base de Datos de Taxonomía del Genoma (GTDB) se determinó que la mayor similitud basada en el promedio de identidad nucleotídica genómica fue de 98.68% con el genoma de *Vibrio harveyi*

perteneciente a la clase Gamma proteobacteria. Cabe mencionar que el genoma de la cepa de estudio tiene un tamaño de genoma de 5,583,643 pb con un promedio de tamaño de contigs (N 50) de 92,314 pb y un porcentaje de guanina/citosina del 44.9%.

5.4 Reto Bacteriano

En el bioensayo de patogenicidad y virulencia, se inoculó una concentración directa del inóculo inicial (5×10^8 UFC/mL) donde se obtuvo una mortalidad del 100% de los organismos en menos de 24 horas post-infección (HPI).

5.5 Determinación de Concentración Mínima Infecciosa

5.5.1 Concentración Mínima Infecciosa

Para la determinación de la concentración mínima infecciosa se realizaron siete diluciones seriadas a partir de un inóculo inicial de 5×10^8 UFC/mL, las diluciones seriadas consideradas fueron 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} UFC/mL, donde en la dilución 1×10^{-5} UFC/mL se obtuvo una mortalidad del 100% de los organismos en menos de 24 HPI. La dilución 1×10^{-6} UFC/mL presentó en los organismos el desarrollo progresivo de la enfermedad, en el cual se obtuvo el registro del comportamiento y signología. En la dilución 1×10^{-7} UFC/mL no se presentó ningún comportamiento, signología o mortalidad, por lo que se descartó y se estableció la dilución de 1×10^{-6} UFC/mL como la concentración mínima infecciosa (CMI).

5.5.2 Signología Macroscópica y Microscópica

A partir de la CMI se estableció el cuadro clínico presentado en los organismos donde desde las 24 horas se presentó signología como oscurecimiento de piel y coloración rojiza en aletas. A las 48 horas ya se observó dermatitis en piel y hasta las 72 horas se obtuvo mortalidades, erosiones en piel y lesiones en forma algodonosa (Tabla I; Figura 4). De las mortalidades se realizó un análisis interno en el cual se observaron bazos hiperémicos y turgentes (Figura 5).

Tabla I. Signología presentada en los organismos en la identificación del cuadro clínico.

	Intervalo de tiempo		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
Signología presente en los organismos	<ul style="list-style-type: none"> • Coloración más oscura. • Presencia de Petequias en boca. • Coloración rojiza en aleta caudal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Regiones hiperémicas en músculo. • Dermatitis y Petequias en boca. 	<ul style="list-style-type: none"> • Erosión de piel. • Erosión de aleta caudal. • Presencia de lesiones circulares con apariencia algodonosa en opérculos. • Mortalidades (dos organismos).

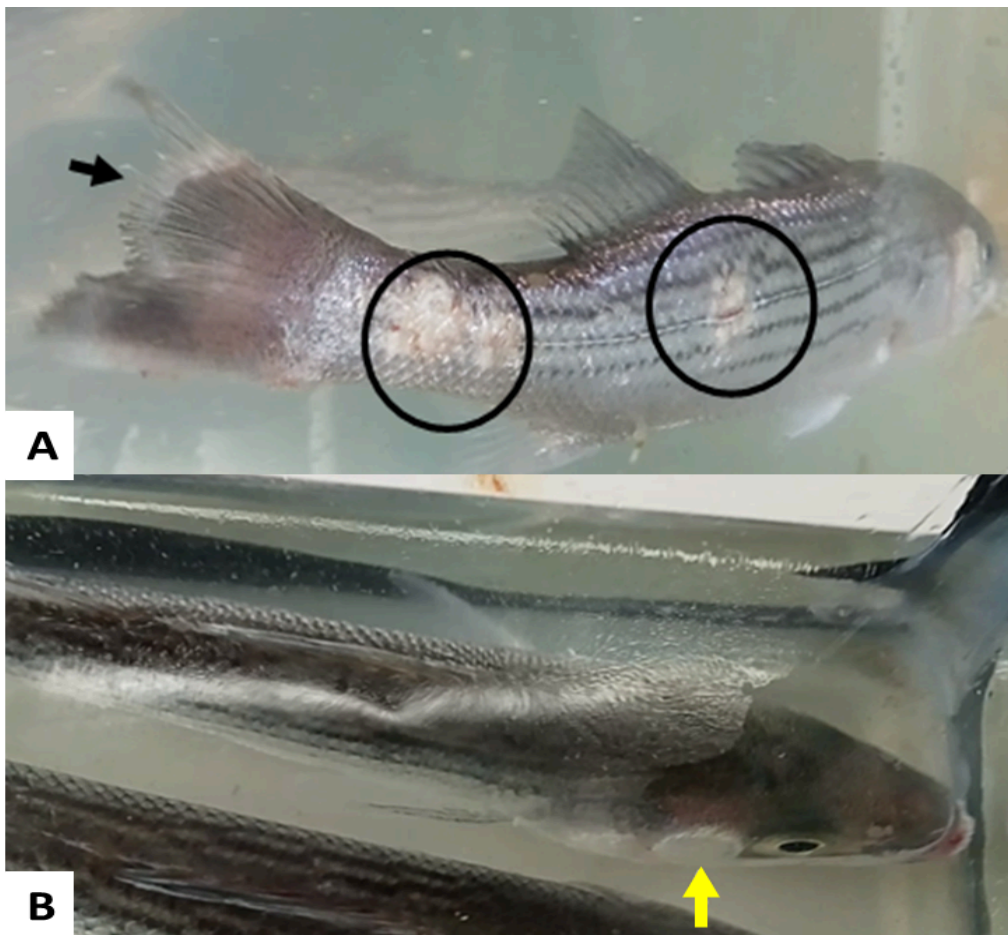


Figura 4. A) Signología a las 72 horas post-infección con erosión muscular (círculos) y en la aleta caudal (flecha negra). B) Signología a las 72 horas post-infección con lesiones en opérculos con apariencia algodonosa (flecha amarilla).

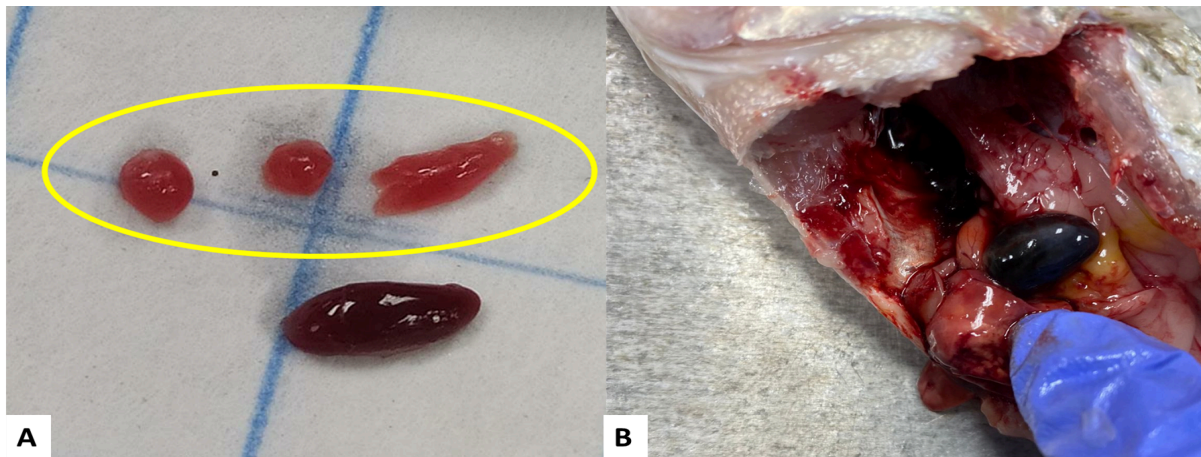


Figura 5. A) Bazos superiores con apariencia normal (óvalo amarillo) y bazo inferior con turgencia (fuera del óvalo). **B)** Bazo turgente e hiperémico de organismos post-infección con CMI.

A nivel tejido se encontró en el bazo una infiltración de proteínas, así como, acumulación de centros de melanomacrófagos donde dentro de los mismos se observó la posible presencia de bacterias en forma de coma característico de las bacterias del género *Vibrio* (Figura 5).

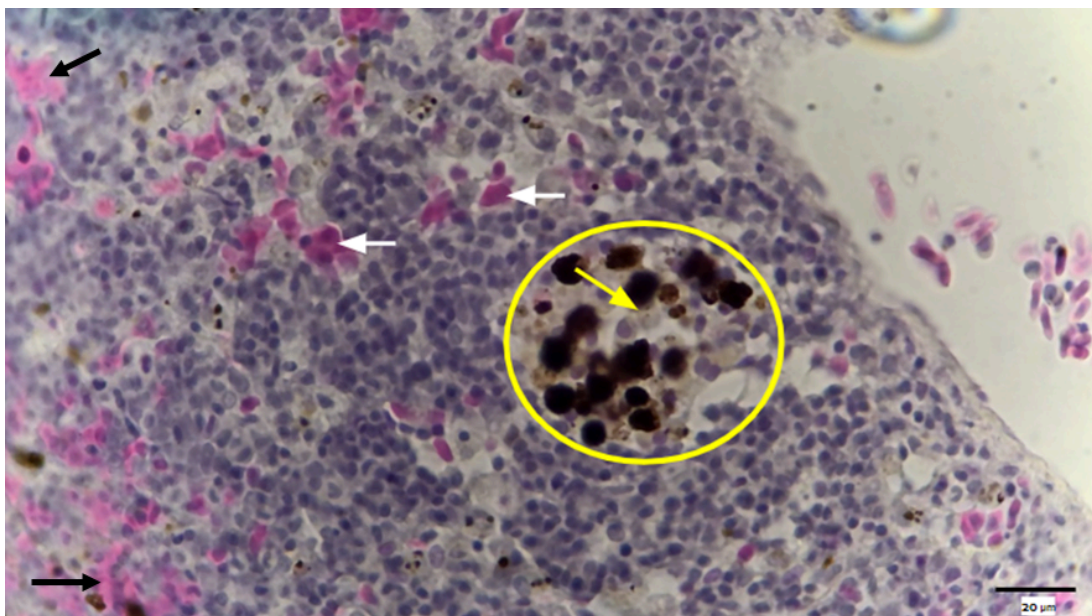


Figura 6. Muestra de bazo de infección con la dilución del inóculo utilizada de 1×10^{-6} UFC/mL. Se presenta infiltración eritocitrica (flechas blancas), infiltración de proteínas (flechas negras), acumulación de centros de melanomacrófagos (círculo amarillo) y posible presencia de bacterias en forma de coma (flecha amarilla). Tinción H & E. Aumento a 100x.

5.6 Evaluación de la Eficacia del Fitogénico en el Control Bacteriano

5.6.1 Postulado de Koch

Dentro de las primeras 24 horas post-infección por tratamiento se obtuvo la mortalidad de tres organismos de control positivo, un organismo de concentración baja (1.0 mL/kg) y un organismo de concentración media (1.5 mL/kg). A las 48 horas se obtuvo mortalidad de uno del control y dos de la concentración baja, posteriormente únicamente se reportó mortalidad total de los organismos en control hasta las 144 horas, teniendo sobrevivencias en los tratamientos. De las mortalidades obtenidas por tratamiento dentro de las 24 horas fueron extraídos y se tomó muestra del bazo, la cual fue sembrada en tres diferentes medios de cultivo cromogénicos que fueron: Tiosulfato Citrato Sacarosa Bilis (TCBS), Vibrio ChromoSelect Agar y ChromAgar Vibrio, en los cuales se presentó el crecimiento y color característico de *Vibrio*, de esta forma comprobando el postulado (Figura 6).

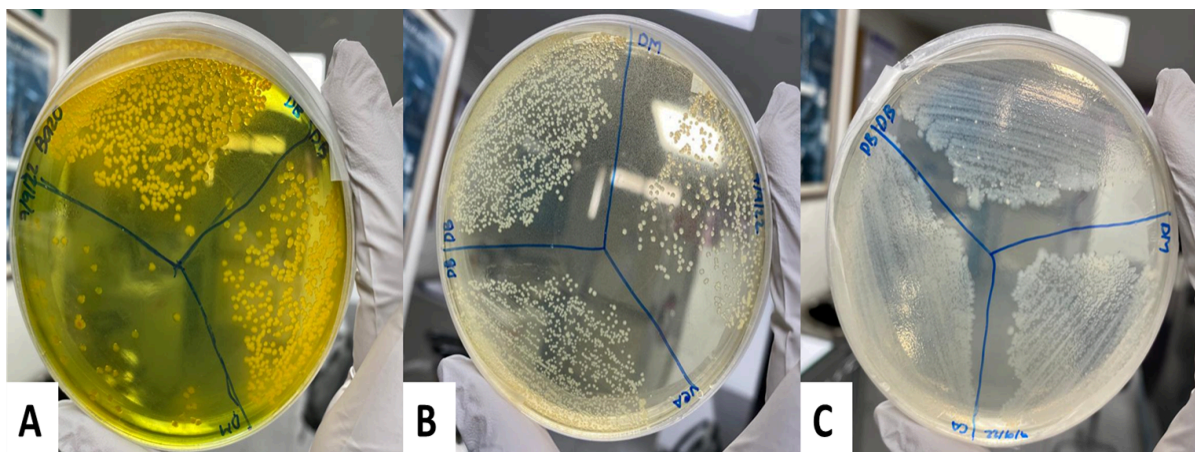


Figura 7. A) Muestra bacteriológica de bazo en medio Tiosulfato Citrato Sacarosa Bilis (TCBS) sacarosa positivo indicativo de la bacteria correspondiente a *V. harveyi* donde se observa colonias aisladas post-infección. **B)** Muestra bacteriológica de bazo en medio Vibrio ChromoSelect Agar con colonias del color característico de *V. harveyi* con colonias aisladas post-infección. **C)** Muestras bacteriológicas de bazo en medio ChromAgar Vibrio con crecimiento tipo enjambre post-infección. Seguimiento al postulado de Koch.

5.7 Análisis de Supervivencia

Durante el periodo de infección dentro de las primeras 24 horas post-infección (hpi) se comenzaron a presentar signos de enfermedad y cambios en el comportamiento en todos los organismos, se presentaron mortalidades en control, dosis baja y media. Después de 48 horas sólo se presentó y registró mortalidad únicamente en organismos de grupo control cada 24 horas hasta las 120 hpi, obteniendo la supervivencia del 0% de los organismos. En los tratamientos se obtuvo una supervivencia constante después de las 48 horas hasta el final, contemplando las mortalidades de las primeras horas post-infección se obtuvo una supervivencia en la dosis baja del 70%, dosis media del 90% y dosis alta del 100% (Fig. 8). El riesgo que se presenta en los tratamientos es menor al 0.5%, en el control el riesgo aumenta conforme avanza el tiempo, aunque posterior a las 96 horas se mantiene constante (Fig. 9).

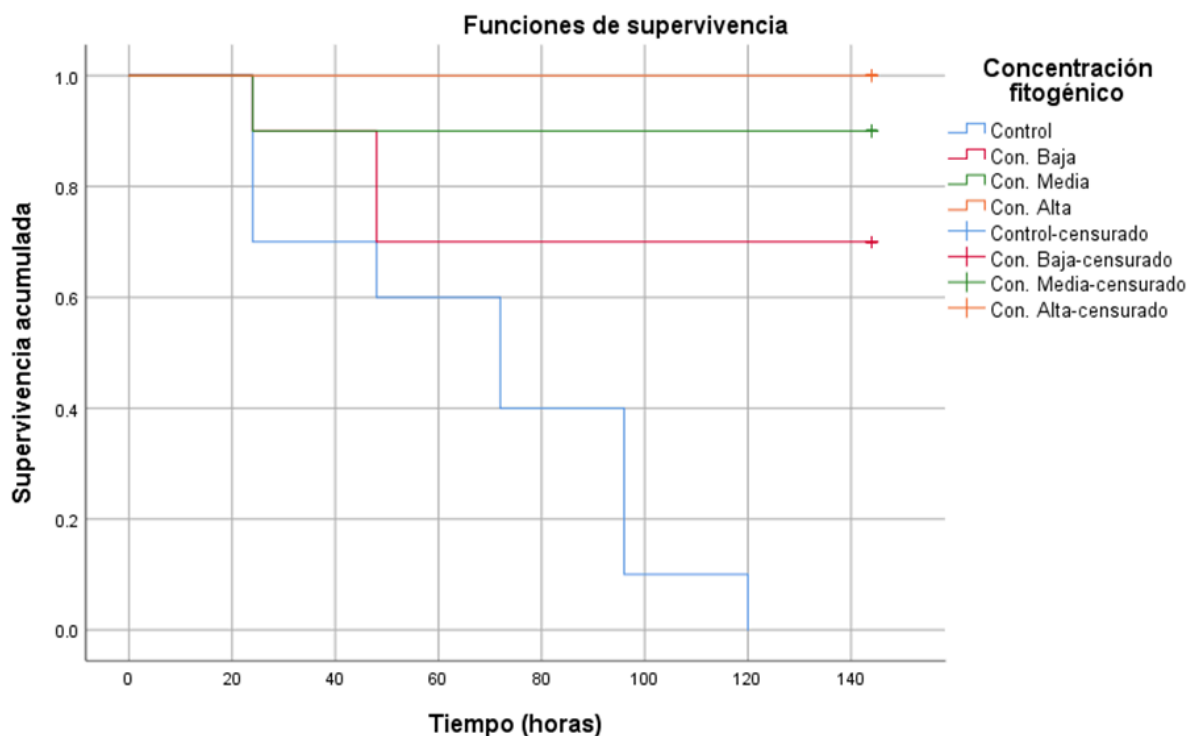


Figura 8. Supervivencia obtenida en 144 horas en la infección por tratamientos.

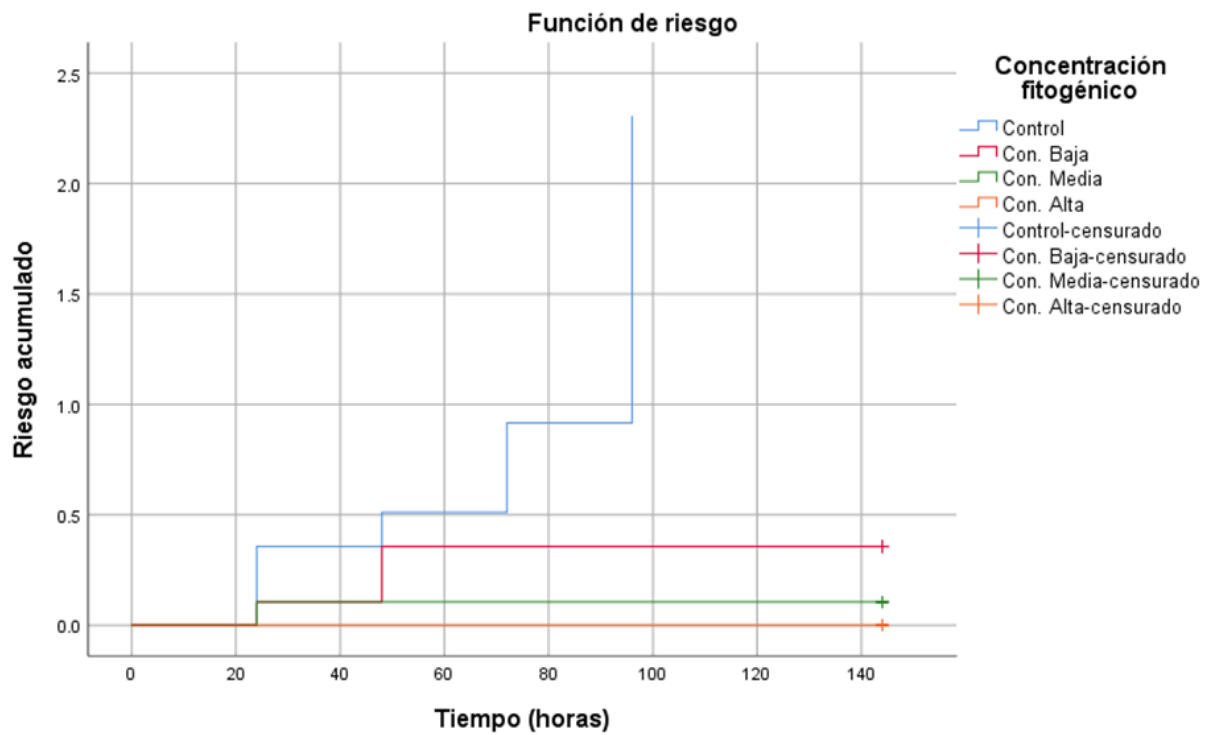


Figura 9. Riesgo de mortalidad de los organismos en la infección por tratamiento en un periodo de 144 horas

6. DISCUSIÓN

Se estableció el crecimiento de *Vibrio harveyi* en un periodo de 48 horas siendo a las 8 horas su máximo crecimiento (fase exponencial) a 30°C. Otros estudios han revelado que *V. harveyi* tarda aproximadamente de 120 a 144 horas para alcanzar su máximo crecimiento a temperaturas de 15°C; sin embargo, Zhou et al., (2012) mencionan que puede alcanzar un crecimiento máximo en 28 horas con temperaturas de 27°C ajustando la concentración de cloruro de sodio al 2% (NaCl). Por lo que el tiempo de crecimiento de *V. harveyi* dependerá de las condiciones óptimas de cultivo y el enriquecimiento del medio de cultivo con cloruro de sodio. Esto también es sustentado por Baumann et al. (1984) al mencionar que *V. harveyi* es una bacteria que cuenta con un metabolismo fermentativo y depende de compuestos químicos orgánicos para la obtención de su energía, además de los iones sodio para su efectivo crecimiento.

Fernández et al. (2017) han reportado que el *V. natriegens* tiene un tiempo de duplicación rápido (20 minutos); por otro lado, Mata (2022) reportó que el crecimiento de tres cepas de *Vibrio* registrando un tiempo de duplicación lento (90-130 minutos). Por lo que, la cepa de *V. harveyi* aislada en este trabajo podría considerarse como una cepa de crecimiento intermedio al registrar un tiempo de duplicación de 48.63 minutos. El tiempo de duplicación se considera un factor de virulencia, ya que dentro de los factores de virulencia se encuentran los mecanismos de adhesión, motilidad, secreción de componentes líticos, pero también la habilidad de crecer rápidamente en condiciones desfavorables (Prescott et al, 2002; Thompson et al, 2005).

Por otra parte, para la identificación de las cepas bacterianas se utilizan diversos métodos convencionales como lo son las pruebas bioquímicas, fisiológicas o en su caso histológicas, aunque también se realizan pruebas más específicas como los métodos moleculares para identificación de patógenos que caracterizan e identifican mediante ADN/ARN (Amman et al, 1995; Vivares y Guesdon, 1992). En el presente trabajo se realizó una prueba bioquímica para la identificación de la cepa aislada obteniendo una similitud del 0.756% con *Vibrio harveyi*, y se corroboró realizando una prueba molecular de ADN donde se secuenció el genoma

obteniendo un 98.68% de similitud de identidad nucleotídica promedio con el genoma de *Vibrio harveyi* (GCF_001591145.1).

Beaz et al., (2012) realizaron pruebas bioquímicas para identificar fenotípicamente un grupo de vibrios aislados de un cultivo de almeja, donde se logró identificar un 54% de las cepas, dentro de las cuales las cepas más abundantes eran de *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. lentus*, confirmando sus resultados con amplificaciones de ADN. En la secuenciación del genoma de nuestra cepa de estudio de *V. harveyi*, se obtuvo un tamaño de genoma de 5,583,643 pb con el 45% del contenido guanina/citosina; otros estudios han reportado tamaño de genoma para la cepa de *Vibrio harveyi* 345 de 6,185,822 pb con un contenido de guanina/citosina del 44.7% (Deng et al, 2019).

En el reto bacteriano donde se determinó la patogenicidad y virulencia de *V. harveyi* se obtuvo el 100% de mortalidad en menos de 24 horas post-infección con una concentración directa del inóculo, posteriormente se determinó la concentración mínima infecciosa obteniendo que en la dilución de 1×10^{-6} UFC/mL se registraba el desarrollo progresivo de la enfermedad. Sin embargo, González (2022) realizó un bioensayo con ejemplares de *T. macdonaldi* a 12°C inoculando 1×10^{-5} cel/mL de *V. harveyi*, en donde no se observó ninguna anomalía con respecto al estado de salud del organismo. En contraste, cuando se realizó un segundo bioensayo con *V. harveyi* a 22 °C, después de un periodo de 5 horas comenzaron a observar cambios de comportamiento en los ejemplares y a las 8 horas se presentó la muerte de los organismos. Esto indica que la temperatura fue un factor de gran importancia para el crecimiento/replicación de *V. harveyi*, siendo patogénica a mayores temperaturas.

La concentración mínima infecciosa inoculada para determinar la patogenicidad y virulencia se puede comparar con la dosis mínima letal encontrada por Colorni et al., (1981) donde a una dorada (*S. aurata*) le inyectan una concentración de 1×10^9 cel/mL de *Vibrio spp.*, sin reportar una mortalidad pero, existe otro estudio realizado en cabrilla donde se inoculó una concentración de 1×10^8 cel/mL donde se obtuvo la mortalidad del 100% de los organismos, aunque concentraciones tan elevadas sólo pueden encontrarse en cultivos cuando existe una variación medio-ambiental que lo detone o un mal manejo (Saeed, 1995).

En cuanto a la signología presentada en el cuadro clínico se observó de forma general pérdida del apetito, cambios de coloración, descamación, algunas lesiones y erosión en piel, así como la muerte de los organismos. Internamente se presentó daño en bazo donde histológicamente se observó una gran acumulación de centros de melanomacrófagos, una infiltración eritrocítica y la presencia de posibles bacterias en forma de coma. Austin y Austin (2007) mencionan que los peces que se encuentran bajo efecto de vibriosis suelen presentar letargia y pérdida del apetito al inicio de la infección, pero conforme avanza la enfermedad se puede llegar a presentar un oscurecimiento de piel, zonas de la piel necróticas o el desarrollo de úlceras rojizas, así como también, el desprendimiento de escamas en la piel. Así como se presenta la signología externa, los peces también pueden desarrollar una infección interna que puede provocar necrosis intestinal, anemia, ascitis, hemorragia de órganos internos, hinchazón de intestinos o palidez de hígado, aunque también se pueden presentar daños al bazo no especificados (Austin y Austin, 2007; Thompson et al, 2004).

Vibrio harveyi es una cepa patógena que ha causado enfermedades a organismos acuáticos tanto silvestres como cultivados ocasionando grandes pérdidas al sector acuícola, se encuentra asociado como el patógeno involucrado en ocasionar gastroenteritis o enteritis necrosante en peces marinos cultivados, entre se encuentran el mero, la dorada, lubina japonesa entre otros (Liu et al, 2003; Soffientino et al, 1999; Yii et al, 1997). Otro estudio menciona que *V. rotiferianus* es considerado parte del clado *harveyi*, el cual se ha encontrado en peces y aislado de muestras de bazo, riñón e hígado obtenidos de juveniles de pargo rosado (*Lutjanus guttatus*) cultivado en el Pacífico noroeste de México, además de ser considerado un patógeno para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) causando mortalidades del 30 al 100% (Austin et al, 2005; Gómez-Gil et al, 2007). Esto con respecto a lo obtenido en el reto de patogenicidad puede indicar que el daño encontrado en el bazo (centro de melanomacrófagos) puede deberse a la presencia de *V. harveyi* como agente infeccioso.

Por otra parte, en la evaluación de la eficacia del fitogénico se puede observar la infección realizada con *V. harveyi*, el cual se demostró ser el agente causal de las mortalidades de los tratamientos, lo cual se comprobó re-aislando de

bazo nuevamente a *V. harveyi* siguiendo el postulado de Koch. De esta infección en tratamientos se presentó dos mortalidades de dosis baja y una mortalidad de dosis media, esto indica que los compuestos activos del fitogénico Coxsan (alicina, timol y carvacrol) presente en el alimento ayuda a contrarrestar los signos de la enfermedad, aumentando la sobrevivencia de los organismos cuando existe una infección en curso. Prieto et al., (2005) menciona que el efecto antibacteriano del compuesto del ajo (alicina) es similar al obtenido por la penicilina actuando específicamente contra bacterias Gram-negativas convirtiéndose en fitogénico eficaz como tratamiento. Otro estudio revela que el uso de tratamiento con base ajo tiene un efecto en la reducción de microorganismos patógenos y estimula las defensas de los organismos reduciendo de esta manera las enfermedades (Villamar Ochoa,). Blanco (2013) realizó un estudio en tilapias aplicando ajo en forma de baño donde observó un fortalecimiento del sistema inmunológico de los organismos protegiéndolos de esta forma ante posibles bacterias patógenas aumentando su supervivencia. La alicina contenida en el ajo aumenta la oxidación del proteoma de bacterias además de inhibir la actividad de la ADN girasa y se identificó la subunidad A de la ADN girasa como objetivo de oxidación por la alicina (Reiter J et al, 2020).

Por otra parte, los mecanismos antimicrobianos que contienen los aceites esenciales del orégano (timol y carvacrol) desempeñan un papel fundamental en la inhibición del crecimiento bacteriano por sus propiedades lipófilas, el timol y el carvacrol desintegran la membrana de las bacterias lo cual provoca la liberación del material asociado a la membrana de las células al medio externo, los terpenoides y fenilpropanoides penetran la membrana de la bacteria llegan al interior de la célula debido a su lipofilicidad (Helander et al, 1998). Una investigación realizada con bacterias del género *Vibrio* indica que aceite de orégano donde se combina el timol y el carvacrol debido a su aromaticidad son responsables de inhibir la actividad bacteriana (Bowles y Miller, 1993).

Ardila et al., (2009) realizó un estudio con aceites esenciales que inhibiera el crecimiento tanto de bacterias como hongos, virus y parásitos. En todos aquellos compuestos que presentaron una mayor capacidad inhibitoria fueron sometidos, se encontró que compuestos como alicina, timol, carvacrol, linalool, aldehído cinámico,

y eugenol inhiben el crecimiento bacteriano. Esto debido a la acción lipofílica, la cual les brinda la capacidad de pasar las membranas celulares, romper los polisacáridos, ácidos grasos y lípidos, la permeabilidad de la membrana celular es conducida por la pérdida de iones, el colapso de la bomba de protones (bomba de eflujo) y la disminución de ATP lo que conduce la muerte celular, aunque también reportó que a nivel citoplasma puede actuar coagulando los lípidos y proteínas.

7. CONCLUSIONES

- Se aisló, purificó y determinó el crecimiento de la cepa bacteriana.
- Se comprobó que la bacteria identificada como *V. harveyi* presentó potencial patogénico.
- A partir del inóculo inicial (5×10^8 UFC/mL) se determinó como la concentración mínima infecciosa la dilución 1×10^{-6} cel/mL.
- El cuadro clínico que se presentó por *V. harveyi* externamente fue el desprendimiento de escamas, erosión de piel y aleta caudal, y lesiones algodonosas en opérculo, internamente bazoos turgentes e hiperémicos.
- Histológicamente se encontró hiperplasia de centros melanomacrófagos, infiltración de proteínas y posibles bacterias en forma de coma.
- La concentración media del fitogénico (1.5 mL/kg) es la más recomendable para utilizar como preventivo a eventos patológicos.
- Se comprobó que la bacteria aislada en el presente estudio identificada como *Vibrio harveyi* cuenta con potencial patogénico y virulento en la lobina rayada (*M. saxatilis*) registrando todo el cuadro clínico que se presenta, y que el fitogénico comercial implementado en su alimentación ayuda a contrarrestar los signos de enfermedad cuando se presenta una infección bacteriana, aumentando la sobrevivencia por tratamiento.

8. REFERENCIAS

- Amann, R, Ludwig, W., Schleifer, K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1): 143-169 pp.
- Ardila M., Vargas A., Pérez J., Mejía L. 2009. Actividad preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Revista de biosalud* 8: 47-57.
- Austin B , Austin DA (2007) *Patógenos bacterianos de peces: enfermedad de los peces silvestres y de cultivo* , 4ª ed . Springer-Verlag, Berlín.
- Austin B , Austin D , Sutherland R , Thompson F , Swings J (2005) Patogenicidad de los vibrios en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* , Walbaum) y nauplios de *Artemia* . *Microbiología ambiental* 7 : 1488 – 1495 .
- Austin, B., AC Pride y GA Rhodie. 2003. Asociación de un bacteriófago con virulencia en *Vibrio harveyi* . *J. Pescado Dis.* 26 : 55-58 pp.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Efectos biológicos de los aceites esenciales-Una revisión. *Química alimentaria Toxicol.* 46 , 446–475 pp.
- Baumann P, Furniss AL, Lee JV. 1984. Section 5. Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods- Genus *Vibrio*. En: Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1, pp. 518-538. Edited by NR Krieg & JR Holt. London: Williams & Wilkins.
- Blanco Silvia. 2013. Efecto de la inclusión de extractos de ajo (*Allium sativum*) en una ración balanceada sobre el crecimiento y sobrevivencia de peces de cultivo. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República de Pamplona. 83 pp.
- Bravo Fariñas, Laura, Fernández, Anabel, Ramírez, María M., Llop, Alina, Martínez, Gerardo, Hernández, Raquel I., Cabrera, Luis E., Morier, Luis, Fraga, Jorge, Núñez, Fidel A., & Aguila, Adalberto. 2007. Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(3)
- Bowles B., Miller. 1993. Propiedades antibotulinales de aromáticos y alifáticos aldehídos seleccionados. *Revista de protección de alimentos* 51 (1): 788-794.

- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223– 253
- Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(6), 1914–1920.
- CESAIBC. 2016. Ficha técnica de Lobina Rayada (*Morone saxatilis*). Comité Estatal de Sanidad e Inocuidad de Baja California. 2 pp.
- Cetin, B., Çakmakçı, S., & Cakmakci, R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(2), 145–154.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Paneri P. 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture 2*: 228-243 pp.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Paneri P. 2020. Chapter 2- Innovative uses of aromatic plants as natural supplements in nutrition. *Feed Additives*, Academic Press. 19-34 pp.
- Colorni, A., Paperna, I. y Gordin, H. 1981. Bacterial infections in gilt-head sea bream *Sparus aurata* cultured at Elat. *Aquaculture*, Elsevier, 23(1–4), 257–267. doi:10.1016/0044-8486(81)90019-3
- Cuéllar, L. 1984. Acuicultura e ictiopatología. *Actas de la Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid*. Vol. II. 205-221 pp.
- Deng, Y., Xu, H., Su, Y., Liu, S., Xu, L., Guo, Z., Wu, J., Cheng, C., & Feng, J. (2019). Horizontal gene transfer contributes to virulence and antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* 345 based on complete genome sequence analysis. *BMC Genomics*, 20(1).
- Diggles, BK, J. Carson, PM Hine, RW Hickman y MJ Tait. 2000. Especies de *Vibrio* asociadas con mortalidades en rodaballo (*Colistium nodipennis*) y rémol (*C. guntheri*) criados en criaderos en Nueva Zelanda. *Acuicultura* 183 : 1-12.
- FAO. 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Fernández Espinel, C., Flores Dominick, V., & Medina Morillo, M. (2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista Peruana de Biología*, 24(1), 93–100. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103>

- García Bermejo I.,M. 2001. Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. Servicio de Microbiología. Control de Calidad SEIMC. 4 pp.
- García M., Lapeña A., Gonzalez E., Langarita E., Monteverde J. 2022. La resistencia a los fármacos antimicrobianos desde la perspectiva de “One Health”. DKV Instituto de la vida saludable. ECODES. 172 pp.
- Gomez-Gil B , Fajer-Ávila E , Garcia-Vargas F (2007) Vibrios del pargo rosado *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 del noroeste de México . *Revista de Microbiología Aplicada* 102 : 1518 – 1526 .
- González- Torres M.F. 2022. Patogenicidad de *Vibrio harveyi* en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 84 pp.
- Helander IM., Lakomi HL., Latva-Kala K., Sandholm T., Pol M., Gorris GL., Von Wright A. 1998. Caracterización de la acción de componentes seleccionados de aceites esenciales sobre bacterias Gram negativas. *Revista de Agricultura y Alimentación Química*. 46: 3590-3595.
- Instituto Nacional de la Economía Social. 2018. La acuicultura se enfoca en la crianza de especies acuáticas y sus primeras referencias remontan al año 3800 a.c. Recuperado de: <https://www.gob.mx/inaes/articulos/acuicultura-historia-y-actualidad-en-mexico?Consultado> Consultado el: 12/01/2023.
- Lambert RJW , Skandamis PN , Coote P , Nychas GJE. 2001. Un estudio de la concentración inhibitoria mínima y el modo de acción del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol . *Revista de Microbiología Aplicada* 91 : 453 – 462 pp.
- Mata-Torres, F. G. (2022). Identificación y caracterización de tres cepas de *Vibrio spp.* potencialmente patógenas aisladas en sistemas de cultivo cerrados de *Penaeus vannamei*. Repositorio Institucional UABC , 1–80 pp.
- Megías, M., Molist, P. & Pombal, M. A. 2018. Técnicas histológicas : Protocolos. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- Prescott, L., Harley, J. y Klein. D. 2002. Microbiology, 5th ed. The McGraw-Hill Companies., Boston.

- Prieto A., Ocampo AA., Fernández A., Pérez MB. 2005. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Anim. Sci.*, 8(1): 38-49.
- Reiter J., Hubbers A.M., Albrecht F., Ole Leichert L.O. 2020. Allicin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 310 (1): 1-13.
- Reverter M., Tapissier N., Sarter S., Sasal P., Caruso D. 2021. Moving towards more sustainable aquaculture practices: a meta-analysis on the potential of plant enriched diets to improve fish growth, immunity and disease resistance. *Reviews in Aquaculture* 13: 537-555 pp.
- Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. 2005. Evaluación comparativa de 11 aceites esenciales de diferente origen como antioxidantes funcionales, antirradicales y antimicrobianos en alimentos. *Química alimentaria*. 91, 621–632 pp.
- Saeed, M. O. 1995. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture*, Elsevier, 136(1–2), 21–29. doi:10.1016/0044-8486(95)01045-9
- Sanz, F. 2001. La alimentación en Piscicultura. En: Rebollar, G., de Bias, C., Mateos, G. (eds.) XVII Curso de Especialización: Avances en nutrición y alimentación animal. Madrid, FEDNA. 317-327 pp.
- Sivaram, V., Babu, M.M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadass, S., Marian, M.P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237(1-4), 9-20.
- Smith, S. 2020. Common Diseases of Cultured Striped Bass, *Morone saxatilis*, and its Hybrid (*M. saxatilis* x *M. Chrysops*). Department of Biomedical Sciences and Pathobiology. Virginia Cooperative Extension. 5 pp.
- Stenholm, A.R., Dalsgaard, I., Middelboe, M. 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol*, 74(13), 4070-4078 pp.
- Thompson, J., Marcelino, L. y Polz. M. 2005. Diversity, Sources, and Detection of Human Bacterial Pathogens in the Marine Environment. En *Oceans and*

- Health: Pathogens in the Marine Environment. S. Belkin y R. Colwell (ed.)
29-68 pp.
- Thompson, F., I, Tetsuya., S, Jean. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431
- Villalobos A, V.M. 2022. Anexo Único “Carta Nacional Acuícola”. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de:
https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5668529 Consultado el:
12/01/2023.
- Vivares, C. and Guesdon, J _ 1992. Nucleic acid probes in aquatic bacteriology. *Aquaculture*. 107: 147-154
- Zhou, K., Gui, M., Li, P., Xing, S., Cui, T., & Peng, Z. (2012). Effect of Combined Function of Temperature and Water Activity on the Growth of *Vibrio Harveyi*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1365–1375.

9. ANEXOS

Anexo 1. Lista de sustratos carbono y sensibilidad química de la identificación bioquímica de la cepa bacteriana y su correspondiente resultado.

Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado
Control Negativo	(-)	D-Rafinosa	(-)	α -D-Glucosa	(-)	D-Sorbitol	(-)
Dextrina	(+)	α D-Lactosa	(-)	D-Manosa	(-)	D-Manitol	(-)
D-Maltosa	(-)	D-Malibiosa	(-)	D-Fructosa	(-)	D-Arabitol	(-)
D-Trehalosa	(-)	β -Metil-D-Glucósido	(-)	D-Galactosa	(-)	Myo-Inositol	(-)
D-Celobiosa	(-)	D-Salicina	(-)	3-Metil-Glucosa	(-)	Glycerol	(+)
Gentibiosa	(-)	N-Acetil-D-Glucosamina	(-)	D-Fucosa	(-)	D-Glucosa-6-PO4	(+)
Sacarosa	(-)	N-Acetil- β -D-Manosamina	(-)	L-Fucosa	(-)	D-Fructosa-6-PO4	(+)
D-turanosa	(-)	N-Acetil-D-Galactisamina	(-)	L-Ramnosa	(-)	D-Ácido Aspártico	(-)
Estaquiosa	(-)	N-Acetil-Ácido Neurámico	(-)	Inosina	(-)	D-Serina	(-)
Control Positivo	(+)	NaCl al 1%	(+)	Lactato de sodio al 1%	(+)	Troleandomicina	(+)
pH 6	(+)	NaCl al 4%	(+)	Ácido Fusídico	(+)	Rifamicina SV	(+)
pH 5	(-)	NaCl al 8%	(-)	D-Serina	(+)	Minociclina	
Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado
Gelatina	(+)	Pectina	(-)	P-Ácido Hidroxifenilacético	(-)	Polisorbato 40	(+)
Glicilo-L-Prolina	(+)	D-Ácido Galacturónico	(-)	Piruvato de Metilo	(-)	γ -Amino-Ácido Butírico	(-)
L-Alanina	(+)	L-Galactónico-Ácido Lactona	(-)	D-Ácido Láctico-Metilo de éster	(-)	α -Hidroxy-Ácido Butírico	(+)
L-Arginina	(-)	D-Ácido Glucónico	(-)	L-Ácido Láctico	(+)	β -Hidroxi-D-L-Ácido Butírico	(-)
L-Ácido Aspártico	(-)	D-Ácido Glucurónico	(-)	Ácido cítrico	(+)	α -Keto-Ácido Butírico	(-)
L-Ácido Glutámico	(+)	Glucuronamida	(-)	α -Ácido Glutámico	(-)	Ácido Acetoacético	(+)
L-Histidina	(+)	Ácido Múxico	(-)	D-Ácido Málico	(-)	Ácido Propiónico	(-)
L-Ácido Piroglutámico	(-)	Ácido Quínico	(-)	L-Ácido Málico	(-)	Ácido Acético	(+)
L-Serina	(+)	D-Ácido Sacárico	(-)	Ácido Bromo-Succínico	(-)	Ácido Fórmico	(-)
Lincomicina	(-)	Vancomicina	(+)	Ácido Nalidixico	(-)	Aztreonam	(-)
Guanidina HCl	(+)	Violeta de Tetrazolio	(-)	Cloruro de Litio	(-)	Butirato de Sodio	(-)
Niaproof 4	(+)	Azul de Tetrazolio	(+)	Telurito de Potasio	(-)	Bromato de Sodio	(-)

Anexo 2. Proceso para desparafinación

Reactivo	Tiempo (minutos)
Xileno I	10
Alcohol 100%	5
Alcohol 96%	5
Alcohol 90%	5
Alcohol 80%	3
Agua destilada	7

Anexo 3. Protocolo de tinción hematoxilina y eosina (H & E).

Reactivo	Tiempo (minutos)
Hematoxilina	12
Agua corriente	2
Carbonato de litio	2
Agua destilada	2
Alcohol 70%	1
Eosina	5 sumergidas
Alcohol 70%	2
Alcohol 80%	2
Alcohol 90%	2
Alcohol 96%	3
Alcohol 100%	5
Alcohol 100%	5
Xileno I	5
Xileno II	5