



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DEL  
BACTERIÓFAGO vB\_Pd\_PDCC-1 EN EL DESARROLLO  
TEMPRANO DEL JUREL *Seriola rivoliana* Y SU IMPACTO  
SOBRE LA DINÁMICA MICROBIANA.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura )

P r e s e n t a

**Bernardo Veyrand Quirós**

La Paz, Baja California Sur, junio de 2021.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 17 del Mes de Junio del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DEL BACTERIÓFAGO vB\_Pd\_PDCC-1 EN EL DESARROLLO TEMPRANO DEL JUREL *Seriola rivoliana* Y SU IMPACTO SOBRE LA DINÁMICA MICROBIANA "**

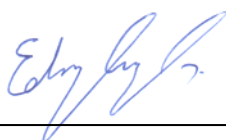
Presentada por el alumno:

**Bernardo Veyrand Quirós**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA



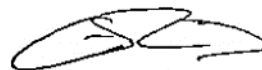
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Co-Director de Tesis



Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Co-Director de Tesis



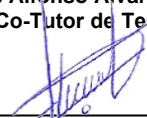
Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva  
Co-Tutora de Tesis



Dr. Alberto Peña Rodríguez  
Co-Tutor de Tesis



Dr. Carlos Alfonso Álvarez González  
Co-Tutor de Tesis

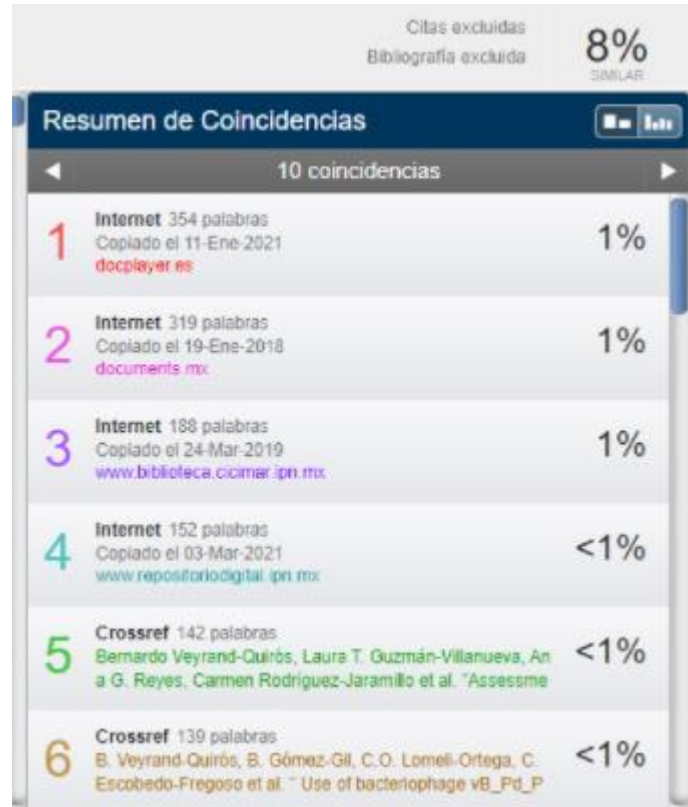


**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,**  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 16 de Junio de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante BERNARDO VEYRAND QUIRÓS del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate
- Filtros utilizados:  
Bibliografías
- Porcentajes de similitud:  
8 %



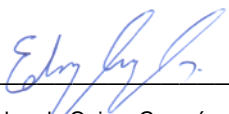
Citas excluidas  
Bibliografía excluida  
8% SIMILAR

**Resumen de Coincidencias**

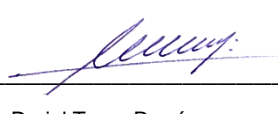
10 coincidencias

Rank	Source	Words	Copy Date	Similarity
1	Internet	354 palabras	Copiado el 11-Ene-2021 docplayer.es	1%
2	Internet	319 palabras	Copiado el 19-Ene-2018 documents.mx	1%
3	Internet	188 palabras	Copiado el 24-Mar-2019 www.biblioteca.cicimar.ipn.mx	1%
4	Internet	152 palabras	Copiado el 03-Mar-2021 www.repositoriodigital.ipn.mx	<1%
5	Crossref	142 palabras	Bernardo Veyrand-Quirós, Laura T. Guzmán-Villanueva, Ana G. Reyes, Carmen Rodríguez-Jaramillo et al. "Assesme	<1%
6	Crossref	139 palabras	B. Veyrand-Quirós, B. Gómez-Gil, C.O. Lomeli-Ortega, C. Escobedo-Fregoso et al. " Use of bacteriophage vB_Pd_P	<1%

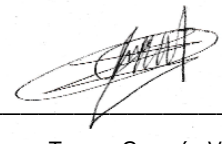
### Firmas del comité



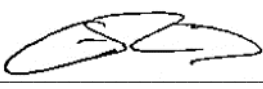
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Co-Director de Tesis




Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Co-Director de Tesis



Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva  
Co-Tutora de Tesis



Dr. Alberto Peña Rodríguez  
Co-Tutor de Tesis



Dr. Carlos Alfonso Álvarez González  
Co-Tutor de Tesis



## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
Co-Director de Tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González  
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
Co-Tutor de Tesis

Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
Co-Tutora de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Dr. Carlos Alfonso Álvarez González  
Dr. Alberto Peña Rodríguez  
Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva

### **Jurado de Examen**

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Dr. Carlos Alfonso Álvarez González  
Dr. Alberto Peña Rodríguez  
Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva

### **Suplentes**

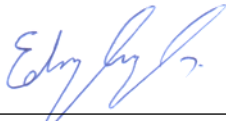
Dra. Minerva Concepción Maldonado García  
Dra. Regina Elizondo González

## Resumen

El género *Seriola* representa un grupo de peces con potencial para su cultivo debido a su alto valor comercial, rápido crecimiento y fácil adaptabilidad al confinamiento. Sin embargo, se producen grandes mortalidades durante sus primeras etapas de vida, donde los principales problemas son causados por bacterias oportunistas. Por lo tanto, la terapia con fagos se presenta como una alternativa para reducir la mortalidad en los sistemas de acuicultura, basada en el uso de virus que reconocen e infectan bacterias patógenas incluso aquellas resistentes a los antibióticos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la fagoterapia sobre la eclosión de huevos y el desarrollo temprano del jurel *Seriola rivoliana*, así como su efecto sobre las comunidades microbianas. Un fago lítico (vB\_Pd\_PDCC-1) contra *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* fue aislado y caracterizado. Este fago de amplio rango de huéspedes se agregó al cultivo cada 3 días a partir de la etapa de huevo hasta 12 días después de la eclosión a una concentración de  $1.41 \times 10^{10}$  UFP por ml y a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. La presencia del fago vB\_Pd\_PDCC-1 aumentó la tasa de eclosión de los huevos y redujo las presuntas especies de *Vibrio* a números no detectables, incluso en huevos no desinfectados. El análisis de secuenciación de alto rendimiento del gen de ARNr 16S reveló que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 provocó cambios significativos en la composición y estructura de la microbiota asociada, permitiendo que los miembros de la clase Gammaproteobacteria (Vibrionaceae) sean desplazados por miembros de la clase Alphaproteobacteria. En el caso de larvas se observaron efectos positivos ( $p < 0.05$ ) en la supervivencia, crecimiento y áreas de pigmentación. El análisis de secuenciación masiva del gen de ARNr 16S mostró que la administración de fagos no produjo cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en la composición y estructura de la microbiota asociada en larvas. Sin embargo, las bacterias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria fueron desplazadas por las pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria a lo largo del tiempo. A nivel familia, presentaron disminución en Rhodobacteraceae, Pseudoalteromonadaceae y Flavobacteriaceae en ambos grupos a lo largo del tiempo. Este estudio representa el primer intento de evaluar el efecto de un fago como agente de control biológico durante el desarrollo ontogenético de las larvas de jurel *S. rivoliana*.

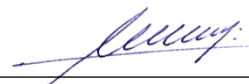
**Palabras clave:** *Seriola rivoliana*, bacteriófagos, dinámica microbiana, larvicultura, eclosión.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9251-5025>



---

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Co-Director de Tesis



---

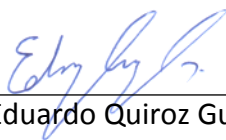
Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Co-Director de Tesis

## Summary

The *Seriola* genus represents a potential group for cultivation due to its high commercial value, rapid growth, and easy adaptability to confinement. However, large mortalities occur during their early stages of life, where opportunistic bacteria cause the main problems. Therefore, phage therapy is presented as an alternative to reduce mortality in aquaculture systems, based on the use of viruses that recognize and infect pathogenic bacteria, including those resistant to antibiotics. The present study aimed to evaluate the efficacy of phage therapy on egg hatching and early development of longfin yellowtail *Seriola rivoliana*, as well as its effect on microbial communities. A lytic phage (vB\_Pd\_PDCC-1) against *P. damselae* subsp. *damselae* was isolated and characterized. This phage with a wide host range was added to the culture every from the egg stage up to 12 days after hatching at a concentration of  $1.41 \times 10^{10}$  PFU per ml and a multiplicity of infection (MOI) of 1. The presence of the phage vB\_Pd\_PDCC-1 increased the hatching rate of the eggs and reduced the suspected *Vibrio* species to undetectable numbers, even in non-disinfected eggs. High-throughput sequencing analysis of the 16S rRNA gene revealed that the phage vB\_Pd\_PDCC-1 caused significant changes in the composition and structure of the associated microbiota, allowing members of the Gammaproteobacteria class (Vibrionaceae) to be displaced by members of the class Alphaproteobacteria. In the case of larvae, positive effects ( $p < 0.05$ ) were observed on survival, growth and pigmentation area. The massive sequencing analysis of 16S rRNA genes showed that phage administration did not produce significant changes ( $p > 0.05$ ) in the composition and structure of the associated microbiota in larvae. However, those belonging to the Alphaproteobacteria class, over time displaced bacteria affiliated to the Gammaproteobacteria class. At the family level, they showed a decrease in Rhodobacteraceae, Pseudoalteromonadaceae and Flavobacteriaceae in both groups over time. This study represents the first attempt to evaluate the effect of a phage as a biological control agent during the ontogenetic development of the larvae *S. rivoliana*.

**Key words:** *Seriola rivoliana*, bacteriophages, microbial dynamics, larviculture, hatching. ORCID:

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9251-5025>



---

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Co-Director de Tesis



---

Dr. Daríel Tovar Ramírez  
Co-Director de Tesis

**Dedicatoria**

A mis abuelos Esperanza y Rodolfo, quienes ya bailan juntos por el cosmos. Por esa herencia que ahora transformaré en mi propio hogar.

A todos ellos que se adelantaron por esta situación de pandemia tan difícil para todos en el mundo. Espero que con este trabajo pueda demostrar que no todos los virus causan problemas y dolor.

El hecho de que un misterio esté más allá del alcance de la comprensión humana no significa que no debamos intentar comprenderlo, hasta donde ello sea posible, dentro del dominio del intelecto.

**Taimni**

## Agradecimientos

Para llegar a este punto se recorrió un gran camino. Cuatro años que se pasaron muy rápido pero que para llegar a ello fue un trabajo en conjunto de situaciones y hechos enlazados, sucesos complejos y significativos. Sobre todo, en la última parte, donde vivimos en la situación de pandemia. Cumpliendo una meta personal como cometido de vida al querer obtener un doctorado desde que supe que quería estudiar. Considero este arduo trabajo como un peldaño más en mi formación como investigador, culminando un gran sueño. Cabe mencionar que este proyecto reúne el esfuerzo y trabajo de muchas personas, que se relacionaron a lo largo de estos años por lo que el crédito no puede ser solo mío.

Quisiera agradecer el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por permitirme realizar este trabajo Doctoral. Gracias por las instalaciones y áreas de trabajo prestadas, así como el apoyo brindado para la realización del proyecto. Así como a los proyectos 1) “Sistema súperintensivo para la producción de camarón basado en regímenes continuos de reactivación microbiana” (1922-0); 2) “Desarrollo y validación de alimentos funcionales para el control de enfermedades en el camarón *Litopenaeus vannamei*” (60068).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de Posgrado otorgada durante la realización de la Tesis (Número de Beca: 486626).

A mi Comité Tutorial, de verdad muchas gracias por apoyarme durante estos tiempos difíciles de pandemia y siempre haber estado al pendiente de mí. Al Dr. Alfonso Álvarez, pese a la distancia siempre estuvo al pendiente de nuestras reuniones, dando valiosos puntos de vista y formas de seguir mejorando el trabajo, tanto experimental como escrito. El Dr. Alberto Peña por siempre involucrarse y ver el trabajo desde otras perspectivas en las que podíamos abordar los problemas. A la Dra. Laura Teresa Guzmán, muchas gracias por el apoyo y paciencia, y por enseñarme las técnicas de inmunología que, aunque no pudimos terminarla por la pandemia, fue una parte esencial en la culminación de este proyecto.

A mis Co-Directores el Dr. Dariel Tovar Ramírez, por siempre incluirme y abrirme las puertas de sus Laboratorios. Por hacerme parte del equipo y siempre tener tiempo para ver los cambios y mejoras en el trabajo, responderme dudas y enseñarme sobre diferentes técnicas. Por siempre ser tan analítico, pero a la vez tan comprensivo y hacer los inconvenientes a un lado para poder seguir trabajando.

Un agradecimiento especial al Dr. Eduardo Quiróz, quien no solo fungió como Co-Director, sino como un amigo y compañero de Laboratorio. Por ser un buen mentor y siempre sacar los



problemas adelante. Gracias por los impulsos de seguir, por siempre echarme la mano a pesar de mis problemas personales, por regañarme cuando lo necesitaba y sobre todo por impulsarme siempre a seguir cuando se presentaba algún camino. Por ser ese gran líder de equipo de trabajo y saber incluirnos a todos como el equipo que somos.

A la Dra. Celia Vázquez Boucard por brindarnos el Laboratorio y hacernos sentir parte de él. Un extenso agradecimiento al Dr. José Luis Balcázar por instruirme en el mundo de la bioinformática en especial Mothur, por siempre tener una buena disposición a pesar de la distancia y los horarios tan diferentes. Por siempre haber sido amable y paciente y esa disposición para que los trabajos salieran perfectos y a tiempo, un abrazo hasta España.

Gracias a mis compañeros de Laboratorio de Microbiología, por las risas y la diversión y sobretodo por trabajar como un verdadero equipo apoyándonos en las situaciones difíciles. Gracias a Diana Barajas por siempre tener un buen consejo, a Alexis Sáñez por siempre tener buena disposición de trabajar y aprender y nunca hecharse para atrás cuando lo involucramos en experimentos. A Esther Ponce por el apoyo, siempre tener una sonrisa para nosotros, y las galletitas cuando se necesitaba. Gracias a Omar Lomelí por todo el apoyo durante los experimentos, los buenos momentos y por que siempre tenía algo nuevo que enseñarnos. Te admiro por todo tu conocimiento y la sencillez con la que siempre nos transmitías eso de la mejor manera.

Gracias a los compañeros e Investigadores del Laboratorio de Genómica y Bioinformática por el apoyo, aunque nunca pudimos ganar una competencia de Kayak. En especial gracias a la Técnico, Gabriela Mendoza por siempre apoyarme, aguantarme y siempre tener palabras amables conmigo. Gracias a la Dra. Cristina Escobedo por enseñarnos Bioinformática a los del Laboratorio y por el apoyo en la realización de los análisis bioinformáticos con el genoma del fago.

Gracias a la técnico Patricia Hinojosa por la ayuda y materiales prestados para la investigación en el Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional. Así como al técnico Ariel Cruz por la ayuda en el procesamiento y análisis de muestras para microscopía electrónica. Al técnico Pablo Monsalvo por el apoyo, instalación y mantenimiento de las instalaciones, sin usted no hubiera sido posible llevar a cabo los cultivos larvarios. A Norma Ochoa por aguantarnos a pesar de siempre estarle pidiendo seguido la autoclave, y siempre tener una buena charla con nosotros.

A la empresa y amigos de King Kampachi por la buena disposición de proporcionarnos los huevos necesarios para la realización de los bioensayos.

A mis compañeros de Posgrado, por esas buenas charlas. A los amigos que hice estos años, con los que conviví entre pasillos y cubículos.

Me gustaría agradecer a mi familia, esas personas que siempre me han apoyado aún en las situaciones más difíciles. A mi Abuela Clara y a Luz. A mis Padres quienes me apoyan constantemente, y que de verdad agradezco que pese a la situación de covid que pasaron, puedan seguir a mí alrededor disfrutando de mis logros. Mi Madre por sarme su amor incondicional y saber desaparecer cualquier problema complejo como si de cualquier chiste se tratara. A mi Padre, por siempre ser mi ejemplo de perseverancia, de mantener los pies en la tierra y seguir siempre adelante. Instruyéndome en la disciplina que uno requiere para cumplir sus metas y nunca dejar algo inconcluso con su frase “Siempre termina lo que empezaste”.

A mi hermana Dominique, quien recientemente se embarcó en el mundo científico, y por más Posgrados que tenga siempre la veré como mi hermana pequeña. Gracia por el apoyo y por siempre confiar en mí, así como por apoyar las travesuras y días de diversión. Insisto, sin ti, la vida sería muy aburrida.

A Diana, mi prometida, que si no fuera por la pandemia estaríamos felizmente casados. A quien amo con todo mí ser quisiera agradecer por siempre estar en los momentos cruciales de la vida y no dejarme caer nunca. Por sacarme siempre del abismo donde tiendo a esconderme de todo. Por siempre mostrarme el lado bonito y divertido de las cosas y siempre encontrar momentos mágicos en las cosas más cotidianas. Por ser siempre tan apasionada y talentosa en lo tuyo e impulsarme a querer ser mejor persona. Por iluminar mis días malos con una sonrisa y saber que donde está ella, ese es mi hogar en conjunto de nuestros bebés peludos, quienes me acompañan siempre en mi trabajo. Y sobre todo por siempre enseñarme a que somos un equipo. Te amo.

A mi familia adoptiva, mis tíos biologuezcos, Alberto y Lucía, quienes siempre me apoyan aún en la distancia, quienes siempre se han interesado en mi formación y carrera, y seguirme enseñando que los lazos de familia no se llevan por sangre si no por el cariño y apoyo que te brindan.

A mis amigos Robert y Pablo, quienes siempre están ahí para mí y nos apoyamos en lo que podamos. Con quienes siempre es bueno charlar y tener unos duelos de cartas o explorar y cazar en mundos virtuales. Por las horas de diversión y pláticas sin sentido.

Son muchas personas quienes hicieron posible esta investigación de manera directa o indirecta a través de estos 4 años. Por eso a quienes no incluyo por mi Alzheimer, gracias por haber sido parte de esta gran parte de mi vida. A todos los que han creído en mí, y a los que no también.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	xi
<b>Lista de tablas</b> .....	xiv
<b>Abreviaturas</b> .....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Panorama de la acuicultura .....	1
1.2 Importancia del género <i>Seriola</i> .....	3
1.3 Ontogenia en peces .....	5
1.3.1 Ontogenia del sistema digestivo.....	7
1.3.2 Desarrollo de pigmentación en larvas .....	9
1.4 Supervivencia larvaria en peces .....	9
1.5 Herramientas de control de patógenos .....	13
1.6 Bacteriófagos como alternativa.....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.1 Avances en cultivos de <i>Seriola rivoliana</i> .....	17
2.2 Bacterias en cultivos .....	19
2.3 Fagos en piscicultura .....	20
2.4 Efecto de los fagos en la dinámica microbiana .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	27
5.1 Objetivo general .....	27
5.2 Objetivos particulares.....	27
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	28
6.1 Reactivación de patógeno .....	28
6.2 Aislamiento de bacteriófagos.....	28
6.2.1 Purificación de bacteriofagos .....	29
6.2.2 Producción masiva de fago vB_Pd_PDCC-1 .....	29
6.2.3 Titulación del fago vB_Pd_PDCC-1.....	30
6.3 Identificación y caracterización del bacteriófago VB_PD_PDCC-1.....	30
6.3.1 Microscopía electrónica de transmisión.....	30

6.3.2 Aislamiento y secuenciación de genoma del fago.....	31
6.3.3 Rango de hospedero y lisis in vitro .....	32
6.3.4 Curva de crecimiento de solo un paso.....	33
6.3.5 Eficiencia de plaqueo (EOP) .....	33
6.3.6 Cinética de lisis bacterioana .....	34
6.4 Caracterización fisicoquímica de bacteriófago vB_Pd_PDCC-1 .....	34
6.4.1 Evaluación de resistencia de bacteriófago .....	34
6.5 Producción de huevos de <i>Seriola rivoliana</i> .....	35
6.6 Efecto del fago vB_Pd_PDCC-1 en el desarrollo de huevos de jurel <i>Seriola rivoliana</i> .....	35
6.6.1 Efecto del fago vB_Pd_PDCC-1 sobre reducción de vibrios en huevos de jurel <i>S. rivoliana</i> .....	35
6.6.2 Análisis de permanencia de bacteriófagos en cultivo .....	36
6.6.3 Análisis por microscopía electrónica (SEM).....	36
6.6.4 Efectos de fagoterapia de vB_Pd_PDCC-1 en la eclosión de huevos de <i>S. rivoliana</i> .....	37
6.6.5 Análisis histológicos .....	38
6.6.5.1 Muestreo y fijación .....	38
6.6.5.2 Procesamiento de tejidos.....	38
6.6.5.3 Tinción con técnica Hematoxilina-Eosina (H-E) .....	39
6.6.5.4 Análisis histológicos cualitativos .....	39
6.6.6 Análisis de secuenciación masiva del gen 16S.....	40
6.6.6.1 Extracción de ADN.....	40
6.6.6.2 PCR .....	41
6.6.6.3 Secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal .....	41
6.6.6.4 Análisis bioinformáticos .....	42
6.7 Efecto de la terapia con fagos en huevos de <i>Seriola rivoliana</i> bajo reto con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> .....	42
6.8 Pruebas previas para estandarización del cultivo larvario de <i>Seriola rivoliana</i> .....	42
6.8.1 Selección de densidad de huevos en el sistema.....	42
6.8.2 Análisis de microbiología .....	43
6.8.3 Preparación masiva de fago para bioensayo .....	43
6.8.4 Determinación de tiempo de aplicación de fago vB_Pd_PDCC-1.....	44
6.9 Bioensayo de desarrollo larvario de jurel <i>Seriola rivoliana</i> .....	44
6.9.1 Medición de parámetros de crecimiento larvario .....	45

6.9.2	Análisis de pigmentación en larvas de jurel <i>Seriola rivoliana</i> .....	46
6.9.3	Análisis microbiológico .....	46
6.9.4	Análisis de secuenciación masiva .....	47
6.10	Análisis estadísticos .....	47
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
7.1	Aislamiento de bacteriófagos líticos.....	48
7.1.1	Identificación del fago de acuerdo con la morfología .....	49
7.1.2	Genoma del fago .....	50
7.1.3	Rango de Hospedero.....	51
7.1.4	Curva de un solo paso.....	52
7.1.5	Eficacia de plaqueo (EOP) .....	53
7.1.6	Ensayo de inhibición bacteriana .....	55
7.2	Caracterización fisicoquímica de bacteriófago activo.....	56
7.2.1	Efecto de la temperatura .....	56
7.2.2	Efecto de la exposición a UV .....	57
7.2.3	Efecto de la salinidad .....	59
7.2.4	Efecto de la exposición al cloroformo .....	60
7.3	Efectos del fago vB_Pd_PDCC-1 sobre la eclosión de huevos retados con <i>P. damselae</i> subs. <i>damselae</i> .....	61
7.4	Efectos del fago vB_Pd_PDCC-1 sobre eclosión de huevos de <i>S. rivoliana</i> con y sin tratamiento de desinfección .....	63
7.4.1	Porcentaje de eclosión.....	63
7.4.2	Permanencia de bacteriófagos en huevos.....	66
7.4.3	Análisis microbiológicos de huevos de jurel .....	66
7.5	Microscopía electrónica de barrido.....	67
7.6	Análisis histológico .....	70
7.7.	Composición en la comunidad bacteriana .....	72
7.8	Estructura de la comunidad bacteriana .....	75
7.9	Bioensayo de desarrollo larvario de jurel <i>Seriola rivoliana</i> .....	76
7.9.1	Crecimiento y desarrollo de larvas de jurel <i>S. rivoliana</i> .....	76
7.9.2	Efecto del fago vB_Pd_PDCC-1 sobre la pigmentación larvaria .....	78
7.9.3	Composición de la comunidad bacteriana.....	80
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>84</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>98</b>

<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	99
<b>11. ANEXOS</b> .....	120
<b>Anexo 1:</b> Fijación .....	120
<b>Anexo 2:</b> Técnica de Inclusión en Parafina.....	121
<b>Anexo 3:</b> Técnica de Tinción Hematoxilina Eosina.....	122
<b>Anexo 4:</b> Cronograma de Seguimiento de Actividades y Tomas de Muestra para el Cultivo Larvario .....	123
<b>Anexo 5:</b> Artículo Publicado.- Use of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 as biological control agent of <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> during hatching of longfin yellowtail ( <i>Seriola rivoliana</i> ) eggs. J Appl Microbiol 129:1497-1510 doi:10.1111/jam.14744 .....	124
<b>Anexo 6:</b> Artículo Publicado.-Assessment of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 on bacterial dynamics during ontogenetic development of the longfin yellowtail ( <i>Seriola rivoliana</i> ). Applied Microbiology and Biotechnology, 105(7), 2877-2887.....	139
<b>Anexo 7:</b> Artículo Publicado.-Isolation and characterization of vibriophage vB_Vc_SrVc9: an effective agent in preventing <i>Vibrio campbellii</i> infections in brine shrimp nauplii ( <i>Artemia franciscana</i> ). Journal of Applied Microbiology.....	151

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida del Jurel <i>Seriola rivoliana</i> (Blacio <i>et al.</i> , 2003).....	5
<b>Figura 2.</b> Ciclo de replicación de un virus bacteriófago (Ajuebor <i>et al.</i> , 2016).....	15
<b>Figura 3.</b> Sistema de bioensayo con huevos de jurel sometidos a diferentes tratamientos.....	37
<b>Figura 4.</b> Cuadrículas realizadas para cada una de las bacterias patógenas. Las flechas señalan las diferentes calvas de inhibición en las diferentes placas de TSA recubiertas de bacteria blanco. ....	49
<b>Figura 5.</b> Prueba de inhibición bacteriana. Se muestran las calvas formadas por efecto del bacteriófago sobre la bacteria patógena blanco <i>P. damsela</i> .....	49
<b>Figura 6.</b> Microfotografía del fago vB_Pd_PDCC-1 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). La barra representa una longitud de 10 nm.....	50
<b>Figura 7.</b> Dendrograma filogenético del fago de <i>Photobacterium</i> vB_Pd_PDCC-1 con los fagos más estrechamente relacionados, basado en secuencias de aminoácidos de subunidades grandes de la terminasa y construido por el método de Neighbor-joining. Los porcentajes de bootstrap (> 70%) basados en 1000 repeticiones se muestran en los nodos de ramificación. ....	51
<b>Figura 8.</b> Rango de hospedero del fago vB_Pd_PDCC-1 contra diferentes cepas patógenas. A) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; B) <i>Vibrio alginolyticus</i> ; C) <i>Photobacterium damsela</i> subs. <i>damsela</i> .....	52
<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento de un solo paso del fago vB_Pd_PDCC-1.....	53
<b>Figura 10.</b> Calvas obtenidas en prueba de gota por cuadruplicado para cada temperatura utilizada. 10 °C (1-4), 25 °C (5-8), 30 °C (9-12), 35 °C (13-16), 40 °C (17-20) y 45 °C (21-24). ....	56
<b>Figura 11.</b> Actividad lítica del bacteriófago vB_Pd_PDCC-1 sobre la bacteria <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> tras exponerse a diferentes temperaturas. El grupo control sin bacteriófago presenta diferencia respecto a los demás tratamientos (F=126.95, p<0.05, df=9, 230).....	57
<b>Figura 12.</b> Calvas (n=4) para cada tiempo de exposición en UV. 5 segundos (A 1-4), 10 segundos (A 5-8), 15 segundos (A 9-12), 30 segundos (A 13-16), 60 segundos (A 17-20), 90 segundos (21-24), 120 segundos (B 1-4), 150 segundos (B 5-8) y 180 segundos (9-12). ....	58
<b>Figura 13.</b> Actividad lítica del bacteriófago vB_Pd_PDCC-1 sobre la bacteria <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> al exponerse a diferentes tiempos con UV. Los tratamientos en color están dados en segundos. El control sin bacteriófagos presenta diferencia al tener una actividad nula (F=21.391, p<0.05, df= 7,184). ....	58
<b>Figura 14.</b> Calvas obtenidas en prueba de gota por triplicado para diferentes porcentajes de salinidad. 2.5% (25-27), 2.0 % (28-30), 1.5 % (31-33), 1 % (34-36) y 0.5 % (37-39).....	59
<b>Figura 15.</b> Actividad lítica del bacteriófago vB_Pd_PDCC-1 sometido a diferentes porcentajes de salinidad con una duración de 24 horas. Control sin bacteriófago presenta diferencias a los demás tratamientos empleados (F=24.241, p<0.05, df= 6, 161).....	60
<b>Figura 16.</b> Calvas de lisis del bacteriófago vB_Pd_PDCC-1 contra <i>P. damsela</i> . El bacteriófago se sometió a diferentes porcentajes de cloroformo con una duración de 24 horas. Los resultados se muestran por cuadruplicado; 10 % (1-4), 5 % (5-8), 2.5 % (9-12) y 1.25 % (13-16).....	61
<b>Figura 17.</b> Actividad lítica de bacteriófago tras su exposición a cloroformo. Se muestran los diferentes tiempos utilizados, donde el control sin bacteriófagos presenta diferencias a los demás tratamientos (F=36.29, p<0.05, df= 4, 155).....	61

- Figura 18.** Eclosión de huevos expuestos a *P. damselae* con diferentes tratamientos. Los controles se incluyen como blancos. Los datos representan la media y la desviación estandar de los grupos independientemente. Diferencias significativas expresadas  $p < 0.05$  (b).....62
- Figura 19.** Huevos de *S. rivoliana* control, no tratados con bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 La flecha indica alguna coloración rosa en el embrión del pez.....64
- Figura 20.** Porcentajes de eclosión por tratamientos de huevos. No desinfectados Control (DC); Desinfectados con bacteriófago 1 (DF1); Desinfectados con bacteriófago 2 (DF2); No Desinfectados Control (NDC); No desinfectados con bacteriófago 1 (NDF1); No desinfectados con bacteriófago 2 (NDF2). .....65
- Figura 21.** A) Huevos de jurel control. B) Larvas de jurel con tratamiento de bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1. Se observa una larva de mayor tamaño y con una mejor movilidad que las que no presentaron fagos. ....65
- Figura 22.** Diferentes estadios de los embriones de *S. rivoliana*: (a) huevos sin fagos en el estadio de miotomas a las 24 h, con melanóforos en el saco vitelino y corazón latiendo, (b) larvas recién eclosionadas con bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1vBa las 24 h. ....66
- Figura 23.** A) Huevo de Jurel *S. rivoliana* a 85X. B) Superficie porosa del huevo de jurel. Fotografía tomada con un aumento de 10,000X. ....67
- Figura 24.** Bacterias recubiertas por bacteriófagos. Las bacterias se muestran con daños en su estructura debido a la lisis provocada. (Flechas indican bacteriófagos). ....68
- Figura 25.** Bacterias recubiertas con bacteriófagos. A) Bacteriófago en superficie de bacteria; B) Bacteria lisada por bacteriófago; estallido de la bacteria.....69
- Figura 26.** Huevo de jurel *S. rivoliana*. Tratamiento control sin bacteriófago. Se muestran bacterias recubriendo la superficie del huevo.....69
- Figura 27.** Corte longitudinal de larva de jurel. Tratamiento control sin bacteriófagos que presentan daño a nivel celular. A) Desarrollo sistema nervioso imcompleto a 10X; B) 20X. C) Daño en somitas (SO) y paquetes musculares (PM); se aprecian edemas (ED) en el tejido, así como daño por necrosis (NE). Sistema nervioso (SN), Notocorda: NC, Vitelo: VI, Gota lipídica (GL). ....71
- Figura 28.** Cortes longitudinales de larvas de jurel 24 horas después de eclosión expuesta a bacteriófago vB\_PdPDCC-1. A) Se observa formación del sistema nervioso (SN) seccionado, así como su respectiva notocorda (NC) (20X). Separación de vitelo para formación de gota lipídica (GL). B) Se percibe la formación de sistema nervioso (40X) y destaca el primordio de ojo (PO). C) Fibras musculares íntegras. D) Segmentación de somitas (SO). ....72
- Figura 29.** Abundancia relativa de linajes bacterianos dominantes (Phylum *Protobacteria* dividido a nivel taxonómico de Clase) que se encuentran en las muestras de huevos de *S. rivoliana* tratadas con o sin fagos. ....75
- Figura 30.** Abundancia relativa de familias dominantes encontradas en las muestras de huevos de *S. rivoliana* tratados con y sin fagos. ....75
- Figura 31.** Estructuras de la comunidad bacteriana de muestras de huevos de *S. rivoliana* tratadas con y sin fagos. Los diagramas de PCoA se basan en la medida de disimilitud de Yue y Clayton. Las elipses representan los intervalos de confianza del 95%. Los ejes primero y segundo representan el 37.5% y el 14.7% de la variación, respectivamente. ....76
- Figura 32.** Larvas con 12 días post eclosión. A) Larva deforme en grupo control. B) Larva con tratamiento con bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1. ....78



- Figura 33.** Larvas de *S. rivoliana* a los 12 DDE: a) larvas control, y b) larvas tratadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1, que mostraron una mejor pigmentación en su cuerpo, así como la ingesta de *Artemia* (naranja). La línea representa 0.5 mm. ....78
- Figura 34.** Área de pigmentación en ojos de larvas de *S. rivoliana* tratadas y no tratadas con fago. Los datos se basan en las medias  $\pm$  desviaciones estándar. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de control y tratados. ....79
- Figura 35.** Área de pigmentación en tegumento de larvas de *S. rivoliana* tratadas y no tratadas con fago. Los datos se basan en las medias  $\pm$  desviaciones estándar. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de control y tratados. ....80
- Figura 36.** Abundancia relativa de linajes bacterianos dominantes (Phylum *Proteobacteria* dividido a nivel taxonómico de Clase) encontrados en huevos y larvas de *Seriola rivoliana*. D0, huevos en día 0; C2, C5 y C12, controles en días 2, 5 y 12, respectivamente; P2, P5 y P12, larvas tratadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 en días 2, 5 y 12, respectivamente. ....82
- Figura 37.** Abundancia relativa de familias bacterianas dominantes encontradas en larvas de *S. rivoliana* tratadas con o sin el fago vB\_Pd\_PDCC-1. No se mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) excepto en familia Sphingomonadaceae (\*  $p < 0.05$ ). ....83

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas usadas en el ensayo de rango de hospedero. ....	32
<b>Tabla 2.</b> Esquema de alimentación durante desarrollo larvario de <i>Seriola rivoliana</i> (Teles <i>et al.</i> , 2017).....	45
<b>Tabla 3.</b> Rango de hospedero del fago vB_Pd_PDCC-1 contra 12 cepas de bacterias de <i>Vibrio</i> : <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. campbellii</i> , <i>V. alginolyticus</i> y <i>P. damsela</i> . EOP se expresa como la fracción de la infectividad de los fagos vs la infectividad de los fagos vs la cepa huésped. Alta (EOP $\geq$ 0.5), Moderada (EOP $\geq$ 0.1-<0.5) y Baja (EOP $\leq$ 0.1).....	54
<b>Tabla 4.</b> Valores de inhibición de cepas de bacterias tratadas con el fago vB_Pd_PDCC-1. ....	55
<b>Tabla 5.</b> Abundancia de especies presuntivas de <i>Vibrio</i> a 24 horas post tratamiento con fago vB_Pd_PDCC-1.....	64
<b>Tabla 6.</b> Diversidad y riqueza bacteriana en huevos de <i>S. rivoliana</i> .....	74
<b>Tabla 7.</b> Diversidad y riqueza bacteriana en larvas de <i>S. rivoliana</i> tratadas con el fago vB_Pd_PDCC-1.....	82

## Abreviaturas

**Mt:** Millones de toneladas

**TSA:** Agar de tripticaseína de soya

**TSB:** Caldo de tripticaseína de soya

**DDE:** Después de la eclosión

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**UFP:** Unidades formadoras de placas

**MOI:** Multiplicidad de la infección

**ml:** Mililitro

**μl:** microlitro

**μm:** Micrómetro

**μM:** Micromolar

**h:** horas

**min:** minutos

**nm:** nanómetros

**SGR:** Tasa de crecimiento específico

**AGR:** Tasa de crecimiento absoluto

**OTU:** Unidades taxonómicas operativas

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Panorama de la acuicultura

La pesca y la acuicultura son importantes fuentes de alimentos, nutrición, ingresos y medios de vida para cientos de millones de personas en todo el mundo (FAO, 2020). En el caso de la producción global de peces, esta ha presentado un crecimiento constantemente en los últimos cincuenta años, con la demanda de pescado a una tasa mundial de 3.2%, sobrepasando el crecimiento de la población mundial por 1.6%. La oferta *per capita* de pescado se ha incrementado de 9.9 Kg en la década de 1960 a 19.2 en 2012, alcanzando un nuevo máximo histórico de 20 Kg en 2014 y posteriormente 20.3 Kg en 2016, gracias a un intenso crecimiento de la acuicultura, que en la actualidad proporciona más de la mitad de todo el pescado destinado al consumo humano, y a una mejora de ciertas poblaciones de peces como consecuencia de una ordenación mejorada en pesquerías. La producción de alimentos acuáticos ha dejado de basarse principalmente en la captura de peces salvajes y ha optado por el desarrollo de sus crías y poder cultivarlas. En 2014 se logró un hito debido a la contribución del sector acuícola para el suministro de pescado para consumo humano, que superó el valor de pescado de captura en el medio natural (FAO, 2014; FAO, 2016a; FAO, 2018).

La producción total de captura en el año 2014 resultó de 93.4 millones de toneladas (mtm), de las cuales 81.5 tm fueron de especies marinas. De esta manera, mientras las poblaciones silvestres se encuentren en sus límites de captura, la acuicultura parece ser una solución para complementar la creciente demanda de productos pesqueros. Como industria relativamente reciente, en las últimas décadas, la acuicultura ha aumentado principalmente debido a la combinación de crecimiento de la población y la expansión y mejora de la producción de pescado y canales de distribución más eficientes (FAO, 2016a; FAO, 2020). La contribución de la acuicultura tuvo una tasa de producción promedio anual de 6.2 % (2004-2014), alcanzando una producción pesquera mundial de hasta 44.1 % con 73.8 mtm, de las cuales 49.8 mtm son peces producidos para consumo humano (FAO, 2016b).

La producción pesquera mundial alcanzó un máximo de aproximadamente 171 millones de toneladas en 2016, de las que el 88% se utilizaron para el consumo humano directo, gracias a la estabilidad relativa de la producción de la pesca de captura y el continuo crecimiento de la acuicultura. Sin embargo, el sector de la pesca y la acuicultura supone la problemática de una necesidad de reducir el porcentaje de poblaciones de peces explotadas más allá de la sostenibilidad biológica, por lo que se busca garantizar soluciones a la bioseguridad y las enfermedades de los organismos, así como el mantenimiento de estadísticas nacionales completas y precisas en apoyo de la elaboración y ejecución de las políticas (FAO, 2018; FAO, 2020).

Las pesquerías no solo proveen una importante cantidad de alimento disponible para consumo, sino que también integran el sector económico, al crear empleos y oportunidades de inversión en muchos países, mejorando así el balance en el comercio internacional. La mayor parte del consumo viene de poblaciones salvajes que son explotadas por el área comercial (Burgoin-Cota, 2015). Para que las especies sean blanco de las actividades acuícolas deben tener cierta relevancia en el mercado, ya sea local, nacional o internacional, donde se desarrolla potencialmente tal pesquería (Tucker, 1998). Se deben considerar ciertos criterios para determinar el potencial de cultivo de las especies, como la velocidad de crecimiento durante los primeros meses después de la eclosión, la supervivencia y conducta, hábitos alimenticios, así como su resistencia a la manipulación (FAO, 2020).

Como una medida para mitigar el esfuerzo pesquero en México, se plantea la diversificación de la actividad pesquera, mediante la implementación de técnicas innovadoras para el desarrollo de la acuicultura, aprovechando las grandes potencialidades que tienen los estados de la región (FAO, 2020). En México, la acuicultura representa una actividad productiva para la provisión de alimentos y el mantenimiento de la biodiversidad, frente a problemas como la sobrepesca y sus efectos nocivos en las poblaciones de peces en ambientes marinos. México se encuentra entre los primeros 18 países pesqueros, con una producción de 1, 467, 790 toneladas en 2012,

aunque su producción agrícola aún es mínima y no figura entre las potencias mundiales acuícolas (FAO, 2016a).

A su vez la pesca en el país constituye una fuente importante de alimentos, no solo a nivel nacional sino a nivel internacional, así como el apoyo en la generación de empleos, recreación, comercio y aporte económico del país, con un adecuado ordenamiento y legislación con principios de sustentabilidad (CONAPESCA, 2013; Burgoin-Cota, 2015).

Por ello se debe desarrollar la acuicultura sostenible, para afrontar los desafíos ambientales en el sector, y considerar estrategias para aprovechar los avances técnicos y biotecnológicos para la selección genética, la bioseguridad y el control de enfermedades en las especies de cultivo, todo esto en conjunto con la evolución del entorno empresarial en materia de inversión y comercio (FAO, 2020).

## **1.2 Importancia del género *Seriola***

Los jureles son peces carángidos que se encuentran distribuidos entre los océanos Atlántico, Índico y Pacífico en aguas tropicales y subtropicales. La mayoría de las especies tienen una distribución mundial mientras que otros son limitados por regiones. Actualmente están descritos 33 géneros y 140 especies de las cuales solo 11 especies *Seriola aureovittata*, *S. carpenteri*, *S. doralis*, *S. dumerii*, *S. fasciata*, *S. hippos*, *S. lalandi*, *S. peruana*, *S. quinqueradiata*, *S. rivoliana* y *S. zonata*, se consideran parcialmente domesticados (Sicuro y Luzzana, 2016; Mesa-Rodríguez, 2017).

Estos peces son ovíparos, presentando una reproducción por fertilización externa. Los huevos son pelágicos, de forma esférica, con gota de aceite sin coloración. Es un pez marino, teleósteo, de gran fuerza y velocidad, que tiende a ser migratorio debido a la búsqueda de alimento y su reproducción (Jerez *et al.*, 2006). Es un pez pelágico, demersal y epibentónico que se encuentra en aguas abiertas cerca de la superficie (Moran *et al.*, 2007). A su vez está asociado a arrecifes marinos en un rango de profundidad de los 5 a 35 metros normalmente; sin embargo, puede encontrarse hasta a 160 metros (Gasparini y Floeter, 2001). Son peces con una dieta que varía

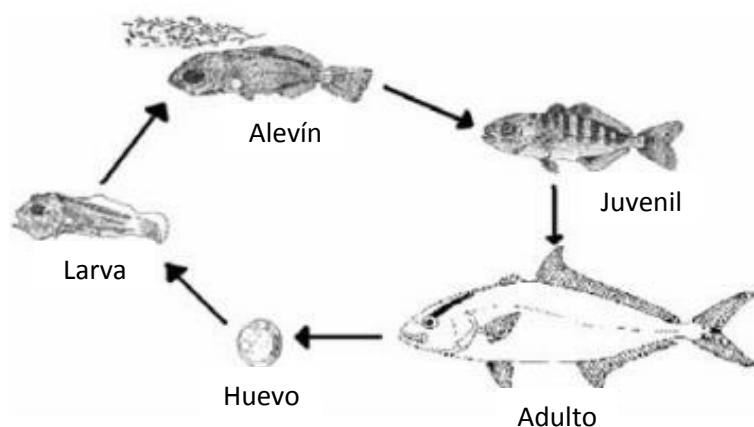
en función a su tamaño, alimentándose principalmente por moluscos, crustáceos, equinodermos y peces pequeños. Asimismo, cuando presenta un tamaño de 4 cm, su alimentación consiste principalmente en copépodos (Lieske y Myers, 1994; Grossy-Dopico, 2010).

En la actualidad la FAO (2016) y la Carta Nacional Acuícola (2015) catalogan a las especies pertenecientes el género *Seriola* en candidatos para la diversificación de la acuicultura, representando un recurso con potencial para el cultivo debido a su carne de gran calidad, alto valor comercial, fácil adaptabilidad al confinamiento y crecimiento rápido (Mazzola *et al.*, 2000; Nakada, 2002; Burgoin-Cota, 2015).

En la investigación científico-tecnológica enfocada en acuicultura, los peces del género *Seriola* más estudiadas son *Seriola lalandi*, *Seriola dumerili*, *Seriola quinqueradiata* y *S. rivoliana*. En México se han establecido diversas empresas en la región noroeste, con la finalidad de cultivar *S. rivoliana*, siendo su principal enfoque la engorda, ya que la producción de juveniles es limitada y su larvicultura aún presenta varios cuellos de botella provocando una baja tasa de supervivencia (Blacio *et al.*, 2003). A su vez hay pocos estudios sobre la biología básica de esta especie que limita la superación de brechas tecnológicas, siendo *S. rivoliana* una fuerte alternativa para el desarrollo de la acuicultura de peces marinos (Tovar-Ramírez *et al.*, 2017). Sin embargo, a partir del surgimiento de cultivos intensivos del género *Seriola* como recurso en países como Japón, China y México, esta industria ha enfrentado pérdidas económicas por eventos de mortalidad asociados al desarrollo de enfermedades (Sicuro y Luzzana, 2016). Es por ello que especies del género *Seriola*, se emplean en la actualidad como modelo biológico en estudios de supervivencia larvaria y su enfoque en trabajos relacionados con mortalidad por el desarrollo de enfermedades por parásitos (endoparásitos y ectoparásitos), virus y bacterias oportunistas (Zheng *et al.*, 2016).

El Jurel *Seriola rivoliana* también llamado medregal negro, Pacific yellowtail, long-fin amberjack o Kampachi, es un pez pelágico de amplia distribución, perteneciente a la familia Carangidae

(Froese y Pauly, 2010). El jurel *S. rivoliana* se caracteriza por tener el cuerpo alargado, levemente comprimido y moderadamente alto. Presenta una coloración verdoso gris en la parte superior, mientras que en su base es claro, con una línea oscura en diagonal sobre el ojo en juveniles; en adultos una franja oscura vertical en la nuca y una franja lateral oscura que se extiende hacia atrás y hacia arriba a partir del ojo. Posee 8 espinas dorsales, 27-33 radios blandos dorsales, 3 espinas anales y 18-22 radios blandos anales. Esta especie puede alcanzar 1.60 metros de longitud total, y un peso máximo de 59 Kg. (Froese y Pauly, 2010; Grossi-Dopico, 2010).



**Figura 1.** Ciclo de vida del Jurel *Seriola rivoliana* (Blacio *et al.*, 2003).

### 1.3 Ontogenia en peces

La ontogenia de un organismo comienza con la activación de una célula y termina con la muerte de éste (Fig. 1). Los organismos metazoarios son productos de un sistema auto organizado, el cual mantiene una secuencia jerárquica de estados estabilizados, los cuales se expresan como intervalos de ontogenia conocidos como pasos, separados por umbrales más o menos estabilizados. Estos pasos constituyen las fases y éstos a su vez los periodos; se han descrito tres tipos de ontogenia durante la historia de vida de los peces tanto de agua dulce, estuarinos y marinos. Los peces con ontogenia indirecta pasan por procesos morfofisiológicos más complejos que los peces con ontogenia de transición o directa (Balon, 2002).



Las especies que presentan una ontogenia indirecta presentan una problemática durante su desarrollo, así como en los procesos de alimentación y nutrición. La etapa de desarrollo ontogénico temprano comprende:

**1) Periodo embrionario;** el cual se lleva a cabo desde que el oocito ha sido fecundado, hasta que la larva ha absorbido completamente el vitelo y el glóbulo de aceite. Este periodo a su vez se divide en tres fases: a) La fase de segmentación que inicia cuando se fecunda el óvulo hasta el cierre del blastoporo; b) La fase de embrión, que inicia con el cierre del blastoporo y se extiende hasta la eclosión del huevo; c) la fase eleuteroembrión se lleva a cabo con la eclosión del huevo y termina con la completa absorción del vitelo y el glóbulo de aceite (Balon, 1984).

De manera general los huevos presentan características comunes como un diámetro pequeño, tiempos cortos de eclosión y un vitelo restringido que dura poco tiempo, por lo que la alimentación exógena tiende a realizarse antes de que el organismo esté totalmente formado. Las estructuras de mayor importancia en el huevo son el corion, una capa lipoproteica que protege el cigoto; el vitelo, reserva de origen materno, la cual está constituida por glucógeno y aminoácidos libres que son usados principalmente como fuente de energía; la gota de aceite que contiene triacilglicéridos, los cuales son una fuente de energía y ácidos grasos esenciales; el espacio previtelino que permite la absorción del agua posterior a la fertilización para separar el corion del embrión (Yamamoto y Kobayashi, 1992; Ronnestad *et al.*, 1994; Finn y Fyhn, 1995).

**2) Período larvario en 3 fases:** a) la fase de preflexión, la cual inicia con la completa absorción de las reservas endógenas y termina antes de la flexión de la notocorda; b) la fase de flexión inicia a partir de la flexión de la notocorda y termina hasta la completa formación de la placa hipúrica; c) la posflexión termina con la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares. En esta fase la larva está casi formada faltando aún características finales de un juvenil; sin embargo, su capacidad de búsqueda y captura es total y puede alimentarse de presas de mayor talla (Ortiz-Galindo, 1991; Álvarez-González, 2003).

Al momento de la eclosión de los embriones, el sistema digestivo se encuentra conformado por un tubo recto indiferenciado, el cual, al finalizar la absorción del saco vitelino y la gota de aceite, se segmenta dando lugar a la aparición de válvulas musculares, la bucofaringe y las porciones anterior, media y posterior que paulatinamente se irán diferenciando histológica y funcionalmente (Govoni, 1980; Álvarez-González, 2003). El hígado y páncreas también están presentes en el momento de la eclosión y son funcionales al finalizar la absorción del vitelo. Al finalizar el periodo larvario el desarrollo del estómago, intestino, ciegos pilóricos y demás órganos que participan en el proceso de digestión estarán completos, variando entre 15 y 60 días dependiendo de la especie (Cousin *et al.*, 1987).

### **1.3.1 Ontogenia del sistema digestivo**

La microbiota intestinal juega un papel fundamental en el metabolismo, fisiología y salud del hospedero. Esta protege al hospedero contra infecciones patógenas, estimula el sistema inmunológico y regula el estrés oxidativo (Chang *et al.*, 2016; Kejariwal, 2016; Bretin *et al.*, 2018). Existen evidencias de que la microbiota intestinal está involucrada en procesos como homeostasis del intestino y efecto de los estados inmunes de los órganos extra intestinales, incluidos el sistema hepático, renal, cardiovascular y óseo (Schroeder, 2016; Kieser, 2018). Además, hay estudios que demuestran la posible relación entre la composición de la microbiota intestinal y el cerebro a través de metabolitos producidos por bacterias, los cuales actúan como transmisores de señales nerviosas (Hsiao *et al.*, 2013; Mayer *et al.*, 2015).

Sin embargo, son varios factores los que intervienen en la composición de la microbiota, especialmente la dieta, las condiciones de higiene y el uso de sustancias como antibióticos. La distribución de microorganismos por todo el tracto no es homogénea, donde intervienen otros factores como jugo gástrico, bilis y jugo pancreático como agentes estresantes delimitando el crecimiento bacteriano y el número de microorganismos (Alfenas, 2012; Giatsis *et al.*, 2015).

Los peces están expuestos a mayores cargas bacterianas en el medio acuático que los animales terrestres. Por lo tanto, este contacto más cercano con el agua circundante, afecta la

colonización intestinal temprana (Verschure *et al.*, 2000; Giatsis *et al.*, 2015). Si bien el agua parece afectar la microbiota intestinal de los peces desde la apertura de la boca en adelante, la microbiota de los alimentos se vuelve muy importante en las etapas de desarrollo posteriores (Reitan *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1999).

Aunque el agua y alimento son las dos fuentes principales de microorganismos disponibles en peces, los factores que conllevan a una colonización exitosa de las bacterias ingeridas y el ensamblaje de la comunidad dentro del intestino no son conocidos del todo, y por esta razón, la predictibilidad y repetitividad de manipulaciones de la microbiota es actualmente limitada (Ringo y Birbeck, 1999; De Schyver y Vadstein, 2014).

La diferenciación y funcionalidad del tracto digestivo y glándulas accesorias durante el desarrollo ontogénico de los peces son aspectos que se requieren conocer para poder establecer buenas prácticas alimentarias y protocolos de cultivo para la primera alimentación de las larvas de las especies de peces marinos que presentan ontogenia indirecta (Lazo *et al.*, 2011).

Desde una perspectiva nutricional, el periodo embrionario (también denominado etapa lecitotrófica) se caracteriza principalmente por la alimentación de tipo endógena y como dicha alimentación depende del aporte vitelino. La transición de la alimentación endógena a exógena marca el inicio del periodo larvario y está relacionado a un conjunto de cambios morfofisiológicos, los cuales son necesarios para poder realizar la localización del alimento (desarrollo de la visión u órganos quimioensoriales), la captura del alimento (desarrollo de boca, cola y músculos) así como la ingesta y digestión del alimento (desarrollo del sistema digestivo) (Yúfera y Darías, 2008).

Los embriones tras eclosionar cuentan con un intestino rudimentario revestido por un epitelio cilíndrico simple con la mitad de los núcleos basales y un borde estriado de microvellosidades que se proyectan desde la superficie apical de las células (Lazo *et al.*, 2011). Durante la fase de

absorción del saco vitelino, la región posterior a la curva del intestino y la válvula intestinal se conforman como una constricción de la mucosa intestinal dividiendo al intestino en dos regiones; la prevalvular (anterior) y el intestino postvalvular (posterior). Durante el periodo larvario el intestino se enrolla y forma un bucle que aumenta cada vez más en la cavidad visceral (Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

El desarrollo de un intestino funcional implica diferentes eventos morfológicos, como la maduración de la membrana de los enterocitos (membrana con borde de cepillo), constituyendo así un paso crucial para la maduración del sistema digestivo en general. Este cambio se produce entre la tercera y cuarta semana posterior a la eclosión en especies de clima templado, mientras que el cambio se produce antes en especies tropicales (Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

### **1.3.2 Desarrollo de pigmentación en larvas**

La pigmentación en larvas se presenta de gran importancia inclusive en procesos de alimentación. La pigmentación de los ojos es un indicador de calidad para su orientación espacial, control de navegación y alimentación exógena (Yúfera y Darías, 2007).

La mal pigmentación es el resultado visible de uno o más defectos en el proceso de desarrollo normal en peces. Un mayor conocimiento sobre estos mecanismos biológicos del desarrollo de los pigmentos es un elemento clave para una mayor optimización de la producción de cultivos (Bolker y Hill, 2000). Durante el desarrollo larvario, la pigmentación se considera como un marcador posterior a la eclosión. La pigmentación es uno de los principales atributos de calidad de los peces para su aceptación en el mercado (Avella *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2016).

### **1.4 Supervivencia larvaria en peces**

El desarrollo y el éxito de la piscicultura dependen del suministro de huevos de buena calidad, caracterizados por una baja mortalidad en la fertilización, los cambios coordinados durante su

desarrollo embrionario, y la eclosión para poder llegar a la primera alimentación (Bromage *et al.* 1992). Las tasas de supervivencia y eclosión generalmente se consideran las mejores medidas de la calidad del huevo, pero estos parámetros no brindan información suficiente sobre los factores que influyen en su calidad. Aunque las características morfológicas de las larvas se han utilizado como indicadores de la calidad de los gametos en algunas especies de peces, también se necesitan análisis microbianos para garantizar la ausencia de patógenos potenciales (Kjørsvik, 1994).

Uno de los principales problemas de los cultivos de peces marinos es la alta mortalidad durante los estadios larvarios tempranos, representando el cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura de peces marinos. Las larvas presentan un desarrollo incompleto al eclosionar, por lo que ciertos tejidos y órganos como el sistema nervioso, digestivo y estructuras óseas, sufrirán cambios funcionales en sus primeras semanas de vida viéndose modificada su morfología y fisiología (Burgoin-Cota, 2015).

Es conocido que la supervivencia de larvas en el ambiente presenta altas fluctuaciones que van desde 0.1 % hasta 10 %, dependiendo de la especie, los cuales son producto de dos factores, externos e internos. Los factores externos se dividen a su vez en dos grupos; los físicos y los químicos; dentro de los físicos encontramos la temperatura, iluminación, flujo del agua y corrientes, mientras que en los factores químicos intervienen el pH, salinidad, iones y oxígeno disuelto, mismos que son muy limitantes para la supervivencia de las larvas. En el caso de los factores internos podemos dividirlos en cuatro grupos: a) Genéticos, los cuales son transmitidos por el material heredado; b) Etológicos que se relacionan con el comportamiento alimenticio; c) Biológicos, los cuales tienen que ver con la competencia y depredación; d) Nutricionales, que confieren a la larva la energía necesaria para mantener su metabolismo, además de crecer y asegurar su supervivencia (Civera-Cerecedo, 2004; Moreno-Figueroa, 2011).

Estos factores juegan un papel fundamental dentro de los cultivos de estadios larvarios tempranos, lo cual se ha reportado que influye directamente en su supervivencia y eclosión, así como también en la talla al eclosionar y en el crecimiento. A su vez esto se ve reflejado en la

absorción del saco vitelino y en la eficiencia del uso de sus reservas energéticas (Moreno-Figueroa, 2011).

El cultivo intensivo de organismos marinos y de agua dulce tienen sus brechas tecnológicas debido en gran parte a las enfermedades producidas por una gran cantidad de patógenos bacterianos que pueden ocasionar altas mortalidades de los productos acuícolas, lo que genera una pérdida económica para la industria, así como la escasez de productos en el mercado (Silva *et al.*, 2014; Kowalska *et al.*, 2020). Estas pérdidas pueden ocurrir en criaderos y centros de producción de larvas o durante cualquier parte del proceso de engorde. La introducción de patógenos en el cultivo se puede dar a través de la alimentación, el agua, las superficies contaminadas, aerosoles, o la propagación de un animal a otro (FAO, 2012; 2016).

El desarrollo de la acuicultura de peces puede verse comprometido por una mortalidad inesperada durante las primeras etapas de la vida que probablemente se deba, al menos en parte, a interacciones negativas entre las larvas de peces y algunas cepas bacterianas que encuentran de forma rutinaria (Llewellyn *et al.* 2014). Se ha demostrado que las interacciones perjudiciales entre peces y microbios limitan la producción de juveniles de alta calidad para muchas especies en la acuicultura (Bakke *et al.* 2015).

Muchos patógenos en la acuicultura son oportunistas y pueden permanecer sin ser detectados hasta que el estrés en los peces de cultivo provoque que sean susceptibles para la infección. Entre estas tensiones se encuentran comúnmente el cambio de temperatura, pH, salinidad inapropiada o cambios rápidos en los parámetros, como el caso de mala oxigenación, acumulación de productos químicos tóxicos como amoníaco, así como la sobrepoblación, mala alimentación o manejo excesivo y la mala calidad del agua en general (Richards, 2014).

En la industria de la piscicultura las bacterias son consideradas como las principales precursoras de las enfermedades, actuando como patógenos e invasores oportunistas, causantes de procesos patológicos en especies susceptibles sometidas a condiciones de estrés en cultivos

intensivos (FAO, 2017). Entre los patógenos que más destacan podemos encontrar a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Nocardia*, bacterias Gram- que producen enfermedades como septicemias hemorrágicas bacterianas, enfermedades de riñón, vibriosis, infección en branquias y úlceras en el organismo, causando mortalidades significativas en peces de cultivo hasta del 100 % (Austin y Austin, 2016).

Los peces del género *Seriola* son altamente susceptibles a enfermedades bacterianas, llegando a presentar septicemias y en grandes ocasiones la muerte, lo que lleva a las pérdidas económicas por parte de los productores (Moreno-Alva, 2014). Una de las principales enfermedades reportadas para este género es la vibriosis, la cual suele presentarse después de que los peces han sufrido heridas en la piel (Jun y Woo, 2003; Avilés-Quevedo y Castelló-Ovay, 2004). Entre las bacterias más sobresalientes que causan esta enfermedad podemos encontrar *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio harveyi* (Silva-Rubio, 2007).

Además de la vibriosis, para el género *Seriola* se ha reportado la enfermedad de la pasteurelosis o fotobacteriosis causada por *Photobacterium damsela*, especie perteneciente también a la familia Vibrionaceae (Gauthier *et al.*, 1995). Los peces con esta enfermedad en casos crónicos presentan gránulos blancos prominentes en órganos internos como bazo, riñón o hígado, consistentes con una acumulación de células bacterianas. Desde 1969 en Japón se ha reportado esta bacteria en *Seriola quinqueradiata* y se asocia con pérdidas de cultivo, mientras que en *S. lalandi* se ha reportado un efecto muy limitado (Kawahara *et al.*, 1998; Sheppard, 2005).

Aunado a esto, las estrategias profilácticas resultan ineficientes para contrarrestarlo, y la vacunación no resulta factible en las larvas. Anteriormente, el único método empleado para el control de bacterias era el uso de antibióticos y desinfectantes, lo que originó una serie de problemas derivados de su mala aplicación, como la aparición y propagación de bacterias multiresistentes a los antibióticos lo que generó problemas ecológicos asociados con estas

bacterias y sustancias químicas (Quiroz-Guzmán, 2005; Defoirdt *et al.* 2007; Karunasagar *et al.* 2007).

Esto a su vez ha ocasionado pérdidas financieras a las plantas piscícolas que debido al desarrollo de infecciones causadas por patógenos microbianos, incluyendo bacterias resistentes a múltiples fármacos dejando inclusive residuos dentro del organismo, los cuales se transmiten a su vez al consumidor, por lo que el uso de antibióticos debe prohibirse en los sistemas de producción (Almeida *et al.*, 2009; Phumkhachorn y Rattanachaikunsopon 2010; Rong *et al.*, 2014). Aunado a esto, Por ello es necesario optar por nuevas alternativas para el control de las infecciones por *Vibrio* en la acuicultura (Austin y Austin, 2012; Silva *et al.*, 2014).

### **1.5 Herramientas de control de patógenos**

El control de las enfermedades causadas por bacterias representa una limitación para la implementación de la larvicultura de peces marinos en México y el mundo (Burgoin-Cota, 2015). Ante tal problemática del uso de antibióticos en cultivos de peces, se ha propuesto desarrollar estrategias alternativas de control biológico para combatir las infecciones bacterianas empleando nuevas fuentes para la elaboración de herramientas contra patógenos (Reyes-Becerril *et al.*, 2016; Richards, 2014).

El concepto de alimentación funcional se ha implementado en la industria de la acuicultura, donde se pretende elaborar dietas con un balance nutricional y suplementadas con aditivos que promueven la salud y la resistencia contra las enfermedades en cultivos de peces. Entre estas estrategias se pueden encontrar vacunas, suplementación en la dieta de probióticos, prebióticos e inmunoestimulantes que puedan ayudar a reducir la susceptibilidad de los peces a diversas enfermedades. Los inmunoestimulantes son una herramienta en la acuicultura usada para aumentar la resistencia contra enfermedades infecciosas por el aumento de la inmunidad humoral y los mecanismos de defensa celular (Siwicki *et al.*, 1998; Guzmán-Villanueva, 2014). A pesar de que los antibióticos se utilizan comúnmente y en exceso en muchos países, existe la necesidad de pasar de éstos al uso de tratamientos inocuos y amigables con el medio ambiente.



Una alternativa propuesta, es el uso de alternativas como probióticos o bacteriófagos para reducir la mortalidad de diferentes organismos en diversos entornos de acuicultura (Karunasagar *et al.*, 1994; Inal, 2003).

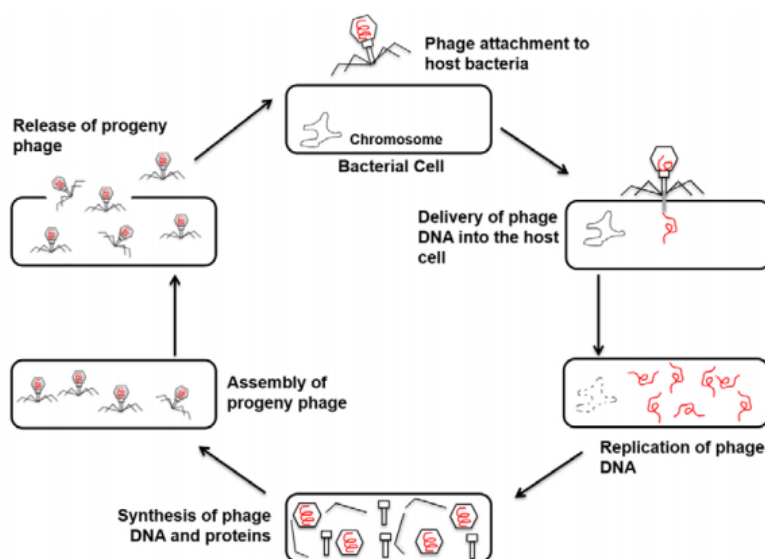
El término “probiótico” significa “para la vida” y es derivada de las palabras griegas “pro” y “bios”; este término fue utilizado por primera vez en 1965 para describir “sustancias secretadas por un microorganismo que estimule el crecimiento y desarrollo de otro (Lilly y Stillwell, 1965).

La definición de probiótico hace referencia a un complemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al huésped mejorando su equilibrio microbiano (Merrifield *et al.*, 2010B). Los probióticos son organismos (como bacterias ácido-lácticas, levaduras y algunas microalgas) que entre otras funciones, promueven la selección de la microbiota asociada al hospedero y por lo tanto, pueden ayudar a prevenir enfermedades bacterianas a través de una variedad de mecanismos, tales como la modulación de la respuesta inmune, la competencia por nutrientes y sitios de adhesión con los patógenos, así como la creación de un ambiente hostil para los patógenos por la producción de compuestos inhibitorios (Balcázar *et al.*, 2006; Merrifield *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2010). Es importante puntualizar que los efectos de un probiótico no están limitados al tracto intestinal, también pueden mejorar la salud del hospedero por el control de patógenos modificando la comunidad intestinal (Verschuere *et al.*, 2000).

Para la selección del probiótico se consideran diferentes aspectos, como las características del hospedero, la seguridad de la cepa a utilizar, la producción de sustancias antimicrobianas, la habilidad para modular la respuesta inmune del hospedero y su habilidad para competir con los patógenos por nutrientes y sitios de adhesión (Balcázar *et al.*, 2012). Entre los más utilizados en la piscicultura se encuentran: bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* spp. y *Lactobacillus sakeii*. Las levaduras por su parte constituyen un buen ejemplo, su potencial como probiótico ha sido estudiado ampliamente sobre todo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Guardiola *et al.*, 2016) y *Debaryomyces hansenii* (Navarrete y Tovar-Ramírez, 2014).

## 1.6 Bacteriófagos como alternativa

Existe una gran cantidad de bacterias que pueden conducir a las infecciones oportunistas de organismos acuáticos. Los métodos de vacunación se han aplicado en algunas especies de peces con diferentes niveles de éxito. Existe la necesidad de pasar de los antibióticos al uso del biocontrol (Karunasagar *et al.*, 1994; Inal, 2003). La alternativa propuesta en este trabajo es el uso de bacteriófagos para reducir la mortalidad de diferentes organismos en diversos entornos de acuicultura. Los bacteriófagos son virus que infectan especies específicas o cepas de bacterias (Abedon, 2011; Plaza *et al.*, 2018). Existen dos tipos de fagos, líticos y lisogénicos. Los fagos líticos infectan las bacterias del huésped a través de un proceso que implica la unión del fago a la bacteria llevando a cabo la inserción del genoma del fago en la célula hospedera, lo que produce el cese en la síntesis de los componentes del huésped así como una replicación mediada por los componentes del bacteriófago que incluyen proteínas de la cápside y ácidos nucleicos; seguido del ensamblaje de nuevas partículas de bacteriófago (Fig. 2), la lisis del anfitrión y la liberación de la progenie del bacteriófago (Defoirdt, 2011). Dado que los fagos líticos se replican rápidamente y causan la muerte y lisis del huésped, son ideales para el desarrollo de terapias de fagos para su uso en el tratamiento de infecciones animales y en la reducción de patógenos en diversos alimentos y el medio ambiente (Inal, 2003; Defoirdt, 2011).



**Figura 2.** Ciclo de replicación de un virus bacteriófago (Ajuebor *et al.*, 2016).

Las interacciones de los bacteriófagos se relacionan ecológicamente con la evolución de las comunidades bacterianas. Los fagos son conocidos por alterar la estructura comunitaria de diferentes especies de bacterias, así como mantener la diversidad y la transferencia genética horizontal bacteriana (Koskella y Brockhurst, 2014). Los bacteriófagos están asociados a bacterias comensales de la microbiota de diferentes organismos e influyen en la inmunidad del huésped modulando la actividad enzimática, por lo que es necesario crear modelos para estudiar esta relación ante la respuesta inmune (Silva *et al.*, 2014). El presente estudio tiene como propósito evaluar la eficacia de la terapia de fagos durante la eclosión y el desarrollo temprano del jurel *Seriola rivoliana*, así como su efecto sobre la microbiota asociada durante su cultivo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Avances en cultivos de *Seriola rivoliana*

El jurel de cola amarilla (longfin yellowtail) *Seriola rivoliana* se considera una especie prometedora para la acuicultura en Japón, Australia, Estados Unidos, España y México; esto debido a que presenta un rápido crecimiento y un alto valor en el mercado (Roo *et al.*, 2014; Kissinger *et al.*, 2016). Aunque en diversos países se ha implementado el cultivo de jurel para su producción comercial, existe poca información de su biología, siendo sobre todo limitada en el aspecto del desarrollo embrionario. A pesar de que varias especies del género *Seriola* se han estudiadas debido a su factibilidad para adaptarse a los cultivos, la etapa larvaria sigue siendo un cuello de botella en el proceso de producción con tasas de supervivencia menores al 10 % (Blacio *et al.*, 2003; Roo *et al.*, 2014).

En Latinoamérica se tienen indicios en el año 1995, donde en Ecuador se obtuvieron desoves naturales de *S. rivoliana* (denominado “Medregal negro” en la localidad) en colaboración con tres laboratorios (CINCO S.A., CRIDEC C.A. y Granjas Marinas del Rosario) (Benetti *et al.*, 1995; Grossi-Dopico, 2010). Se le dio continuidad a los desoves y los juveniles fueron cultivados en jaulas flotantes, donde se obtuvo una supervivencia del 15 % con una tasa de conversión alimenticia de 5.0 (Benetti *et al.*, 1998). Blacio *et al.*, (2003) realizaron avances en cultivos de *Seriola rivoliana* en Ecuador (donde a la especie se le denomina huayaipe). Se cultivaron embriones en tanques de 500 litros a 26.5 °C y posteriormente se colocaron en tanques circulares de 5 toneladas para mitigar el canibalismo. Éstos se alimentaron con rotíferos y nauplios de *Artemia* enriquecidos, así como dieta comercial seca y alimento balanceado para trucha, obteniendo una supervivencia del 2.35 % para el día 25 después de la eclosión.

Grossi-Dopico (2010) realizó un seguimiento del desarrollo embrionario de la especie partiendo de mórula y se tomaron las medidas del saco vitelino y gota lipídica. Se analizaron los efectos de las larvas a condiciones estresantes de iluminación y calidad del agua llevando el ciclo a los 30 días DDE.

Roo *et al.* (2014), describieron la adaptación de reproductores del jurel *Seriola rivoliana* en los primeros ensayos de cría de larvas en condiciones intensivas y semi-intensivas. Pasado el año se tomaron muestras de los peces para determinar el crecimiento individual en peso y tamaño. Los primeros resultados de la cría de larvas en condiciones semi-intensivas mostraron una supervivencia del 2.5 % a los 30 días después de la eclosión (DDE), mientras que en condiciones intensivas se obtuvo sólo el 0.5 %. La baja supervivencia en ambas condiciones de crianza, así como su incapacidad de superar pruebas de esfuerzo, se le atribuye a deficiencia de ácidos grasos esenciales. A su vez los parámetros morfométricos no mostraron diferencias significativas entre los dos sistemas de cría.

Mesa-Rodríguez (2017) describió por primera vez el desarrollo esquelético y la mineralización de *Seriola rivoliana*, donde reveló que las primeras estructuras en mineralizarse fueron las mandíbulas y las estructuras respiratorias, respaldando la importancia de la alimentación y la respiración en las primeras etapas. Por ello la identificación de las etapas pre y posflexión son un indicador externo útil de la mineralización de la columna vertebral, el complejo caudal y las aletas emparejadas.

Debido a que se carece de un protocolo de cultivo para *Seriola rivoliana* es necesario más información para mejorar y optimizar las prácticas actuales de cría de larvas que permita un buen porcentaje de supervivencia. Actualmente en el noroeste de México las investigaciones enfocadas en el género *Seriola* van en aumento debido a la importancia de éste; mediante herramientas genómicas el grupo de Fisiología y Genómica Funcional del CIBNOR desarrollan protocolos para conocer la biología de la especie y así optimizar la producción de juveniles.

Se desarrollaron trabajos que aportan al conocimiento básico sobre el desarrollo larvario de *Seriola rivoliana*. El trabajo de Teles *et al.* (2017), describió el desarrollo del tracto digestivo y las glándulas accesorias en larvas de *S. rivoliana* criadas en condiciones de laboratorio desde la eclosión hasta 30 DDE, donde la temperatura juega un papel importante. Estos resultados aportaron información valiosa sobre la biología y fisiología digestiva en larvas de *S. rivoliana*, lo

que marcó pautas para mejorar las técnicas de cultivo e identificar características involucradas en la ontogenia de la especie.

Tovar-Ramírez *et al.* (2017) realizaron un enfoque en el estudio ontogénico de diferentes genes de *Seriola rivoliana* permitiendo conocer la evolución de algunos componentes del sistema inmune, así como factores de crecimiento y diferenciación celular. Esto a su vez permitió delimitar enfoques básicos de alimentación en presencia de levaduras y probióticos, así como la obtención del transcriptoma como primer registro bioinformático en extenso para esta especie.

Continuando con esto Teles *et al.* (2018) desarrollaron el estudio de la actividad enzimática digestiva en larvas de *S. rivoliana* en condiciones controladas de laboratorio hasta que las larvas alcanzaron los 30 DDE. Ellos sugirieron que se deben implementar técnicas moleculares para ampliar los estudios del desarrollo de las enzimas digestivas y su relación de la genética de la especie.

Viader-Guerrero (2019), determinó el efecto de la temperatura sobre la pigmentación de ojos y apertura de boca en larvas de jurel *Seriola rivoliana*, así como su efecto sobre la eclosión, tasas de crecimiento y supervivencia. Se obtuvo que 24 °C se muestra como la temperatura óptima para el porcentaje de supervivencia, longitud de la notocorda y la eficiencia en la absorción del saco vitelino y la gota lipídica.

Continuando el estudio de alternativas contra bacterias patógenas, Mazón-Suástegui *et al.* (2019), investigaron el efecto de tratamientos homeopáticos preparados a partir de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* sobre la respuesta inmune y antioxidante en juveniles de *Seriola rivoliana* en condiciones de cultivo y retos con *V. parahaemolyticus*.

## **2.2 Bacterias en cultivos**

En la acuicultura, varias especies bacterianas causan serios problemas a los organismos de cultivo. Entre ellas, varias especies pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* actúan como

patógenos oportunistas de especies de peces de importancia comercial (Toranzo *et al.*, 1991; Verner-Jeffreys *et al.*, 2007; Noorlis *et al.*, 2011; Higuera *et al.*, 2013; Martínez-Díaz y Hipólito-Morales 2013). Algunos miembros del género *Vibrio*; (como *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. salmonicida*) y *Photobacterium* (*P. damsela* subsp. *piscicida*, y *P. damsela* subsp. *damsela*, anteriormente *Vibrio damsela*) son responsables de brotes de enfermedades en organismos marinos cultivados e incluso podrían causar hasta el 100% de la mortalidad (Almeida *et al.*, 2009; Noorlis *et al.*, 2011; Martínez-Díaz y Hipólito-Morales 2013; Andreoni y Magnani 2014).

En el caso de *P. damsela* subsp. *damsela*, este patógeno puede infectar una amplia variedad de peces de cultivo, como la anguila australiana (*Anguilla reinhardtii*), la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*), la corvina (*Argyrosomus regius*), la palometa (*Trachinotus ovatus*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), besugo (*Pagrus auriga*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), sargo común (*Diplodus sargus*), así como varias especies del género *Seriola* (Rivas *et al.*, 2013; Eissa *et al.*, 2018). La bacteria *P. damsela* subsp. *damsela* provoca fotobacteriosis, infecciones que provocan heridas y septicemia hemorrágica (Rivas *et al.*, 2013). Ésta se ha reportado en diferentes áreas geográficas, donde pasó de un patógeno en entornos silvestres a ser un patógeno emergente en piscicultura (Eissa *et al.*, 2018).

La bacteria *Lactococcus* afecta un gran número de especies de peces ocasionando enfermedades sistemáticas. Esta bacteria es patógena y virulenta ya que produce toxinas intra y extracelulares que afectan significativamente de diferentes especies de jurel, donde la infección se presenta en todas las etapas de crecimiento reprimiéndose que la mortalidad se presenta en los peces de uno a dos años (Sheppard, 2005). Bacterias del género *Lactococcus* han sido aisladas de *Seriola dumerili*, *Seriola quinqueradiata* y *Seriola lalandi* (Austin y Austin, 2016).

### **2.3 Fagos en piscicultura**

Debido a su alta eficacia, los fagos líticos pueden ser usados potencialmente contra infecciones bacterianas, siendo aún más específicos que los antibióticos. Debido a esta especificidad del

hospedero, no se verían afectadas las bacterias benéficas de la microbiota, reduciendo las posibilidades de infecciones oportunistas (Fortuna *et al.*, 2008). El uso de fagos para prevenir infecciones patógenas de peces ha sido reportado anteriormente (Merino *et al.*, 1990; Crothers-Stomps *et al.*, 2010). Donde los resultados experimentales en modelos de bacterias de animales marinos, han demostrado eficacia terapéutica del uso de fagos contra enfermedades infecciosas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela*, *Enterococcus seriolicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas plecoglossicida* y *Lactococcus garvieae* (Park *et al.*, 2003; Vinod *et al.*, 2006; Shivu *et al.*, 2007). Algunos modelos animales incluyen el jurel *Seriola quinqueradiata*, el pez Ayu *Plecoglossus altivelis*, salmón del Atlántico *Salmo salar*, trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y dorada *Sparus aurata* (Nakai *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; Nakai y Park, 2002; Park *et al.*, 2003; Higuera *et al.*, 2013).

Nakai *et al.* (1999) estudiaron la supervivencia *in vitro* e *in vivo* de bacteriófagos de *Lactococcus garvieae* y su potencial para controlar infecciones en jurel de cola amarilla *Seriola quinqueradiata*. La tasa de supervivencia fue mucho mayor en jureles tratados con fagos y se recuperaron del daño de infección de intestino y bazo. El fago impidió que los peces sufrieran infecciones por *L. garvieae*, sugiriendo el uso potencial de fagos para controlar la enfermedad.

No se había examinado el potencial de la terapia de fagos en cultivos de larvas de peces hasta que Silva *et al.* (2014) describieron el aislamiento y caracterización de fagos capaces de infectar un *Vibrio* patógeno como preventivo contra infecciones bacterianas en larvas de pez cebra. Las larvas presentaron una menor mortalidad al ser tratadas con fagos, por lo que establecieron que el suministro directo de fagos en el agua de cultivo resulta un método efectivo para reducir el impacto negativo de la vibriosis en larvicultura.

## **2.4 Efecto de los fagos en la dinámica microbiana**

En los organismos metazoarios después del nacimiento se da una colonización de bacterias en todas las superficies mucosas. El microbioma intestinal es un factor importante en la salud y



control de enfermedades (De Schyver y Vadstein, 2014; Giastis *et al.*, 2015). Sin embargo, el patrón de composición y concentración de la microbiota intestinal puede variar mucho, por lo que para lograr una tolerancia inmunológica es fundamental entender esto en las primeras etapas del organismo para mantener la salud durante toda su vida (Vitetta *et al.*, 2018).

Recientemente, se ha prestado mayor atención a las interacciones entre las comunidades bacterianas y las posibles consecuencias para la supervivencia y el desarrollo de las larvas de peces (Vadstein, 2013). Sin embargo, hasta ahora no se sabe cómo esta relación íntima entre las larvas de peces y las bacterias influye en el ensamblaje de la comunidad en las larvas de peces en desarrollo (Bakke *et al.* 2015). Bajo esta perspectiva, comprender los procesos que determinan la estructura de la comunidad microbiana durante el desarrollo larvario de los peces es de fundamental interés tanto desde el punto de vista científico como comercial (Bakke *et al.* 2015).

La microbiota en peces puede ser diversa, incluyendo miembros de grupos de protozoarios, hongos, levaduras, virus bacterias y arqueas. El grupo más dominante en el intestino de peces son las bacterias, siendo el foco en las investigaciones de sanidad acuícola (Merrifield y Rodiles, 2015). La densidad composición y función de la microbiota tiende a cambiar entre las diferentes secciones del tracto digestivo en peces (Clements *et al.*, 2014; Banerjee y Ray, 2017).

A su vez, se ha observado que existe una distinción entre comunidades alóctonas y autóctonas: siendo los organismos alóctonos, microbiota transitoria de vida libre asociada con lo que se ingiere, mientras que la microbiota autóctona se encuentra en la superficie de la mucosa colonizando el tracto digestivo y constituye la comunidad central (Llewellyn *et al.*, 2014; Banerjee y Ray, 2017).

Asimismo, la microbiota del agua circundante puede establecer qué bacterias se encuentran en los huevos de peces, y por consecuencia tienen la oportunidad de colonizar la superficie. Tras la eclosión de los huevos, en las larvas estériles, las bacterias se convierten en los primeros

colonizadores del tracto gastrointestinal en desarrollo. Las bacterias que habitan posteriormente se adquieren cuando las larvas de peces abren la boca y comienzan a pasar agua para controlar la osmorregulación y luego microbiota se diversifica aún más en la alimentación (Nayak, 2010; Banerjee y Ray, 2017).

Alternativamente, se ha explorado el uso de probióticos, definidos como microorganismos vivos que mejoran el equilibrio de la microbiota intestinal. Las cepas más comunes utilizadas como probióticos son miembros de los grupos Lactobacilli, Enterococci y Bifidobacteria (Ouwenhand *et al.*, 2002; Ki Cha *et al.*, 2012). Esta terapia también muestra un éxito significativo para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo, los productos probióticos en el mercado necesitan más estudios en términos de calidad y seguridad (Ki Cha *et al.*, 2012; Sinagra *et al.*, 2013).

Existen trabajos orientados en la aplicación de moduladores para mantener control en la microbiota de los organismos, como el de Ramirez-Sosa (2020), donde evaluó el efecto del prebiótico comercial Grobiotic®-A (GBA) en diferentes dietas a base de harina de soya, para determinar los efectos en la digestión, desempeño biológico, salud intestinal y composición de la microbiota intestinal en juveniles de jurel *Seriola dorsalis*. Sin embargo, las diferentes dietas no presentaron un efecto significativo más que en dosis elevadas del prebiótico, por lo que se sugiere un análisis más exacto respecto al microbioma y la morfología intestinal para analizar el efecto de los prebióticos en las dietas de *S. dorsalis*.

Para el caso de fagos, éstos infectan y lisan las bacterias intestinales. Por lo que puede plantearse que estos virus muestran un mecanismo de control protector local eficaz para la barrera intestinal contra patobiontes comensales que indirectamente pueden ayudar al huésped a controlar las concentraciones bacterianas en el intestino (Vitetta *et al.*, 2018).

Se puede prevenir una actividad cooperativa entre el epitelio intestinal, la inmunidad de las mucosas y la actividad de los fagos para eliminar patobiontes, resaltando el papel potencial de

fagos para ayudar a mantener la homeostasis intestinal evitando un proceso de disbiosis (Gao *et al.*, 2015; Vitetta *et al.*, 2018).

Esto podría a su vez explicar los procesos por el cual el control local de fagos en la inflamación y las respuestas inmunitarias pueden ser un mecanismo de defensa inmunológico adicional que aprovecha las interacciones fago y glucoproteína-mucina que controla la diversidad y abundancia bacteriana en las capas e mucina del intestino (Gorski *et al.*, 2012; Chhibber *et al.*, 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la piscicultura, se ha sugerido el uso de los fagos para controlar las poblaciones de bacterias oportunistas, pertenecientes al género *Vibrio*, las cuales causan bajas drásticas durante la producción, generando pérdidas económicas, así como pérdidas de fuentes de alimento para la población mundial. A su vez, los fagos constituyen una alternativa más saludable contra el uso de antibióticos, los cuales pueden provocar la proliferación de bacterias multiresistentes.

Sin embargo, no se ha evaluado aún el papel de los fagos durante la eclosión y el desarrollo temprano de peces y, en consecuencia, no se han realizado estudios acerca de la interacción de las comunidades microbianas del hospedero con los fagos.

De este modo, la importancia del presente trabajo radica en ser el primer análisis del uso de fagos durante el desarrollo ontogénico temprano en peces, para entender el papel que juegan éstos en la regulación de la microbiota, así como en el desarrollo del pez desde la eclosión del huevo.

#### 4. HIPÓTESIS

La fagoterapia actuará como control biológico contra patógenos oportunistas en los sistemas de cultivo larvario del jurel *Seriola rivoliana*, generando modificaciones en las comunidades microbianas, y mejorando por consecuencia la eclosión, supervivencia y desarrollo morfológico temprano de las larvas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la fagoterapia en huevos y estadios tempranos de jurel *Seriola rivoliana* sobre la modulación de las comunidades microbianas.

### 5.2 Objetivos particulares

- Aislar y caracterizar bacteriófagos líticos activos de diferentes fuentes.
- Evaluar la permanencia de los fagos activos en el agua de cultivo.
- Observar el efecto de la fagoterapia en huevos de jurel *S. rivoliana* infectados con la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.
- Analizar el efecto del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre la eclosión de huevos, así como la supervivencia y desarrollo temprano de larvas de jurel *S. rivoliana*.
- Analizar el efecto de los fagos sobre las comunidades microbianas en huevos y larvas de jurel *S. rivoliana* mediante análisis de secuenciación masiva del gen 16S.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivación de patógeno

Para el desarrollo del presente trabajo se usó la cepa de *Photobacterium damsela* subs. *damsela* perteneciente a la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM 1910T) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD unidad Mazatlán) con registro en World Data Centre for Microorganisms (WDCM), la cual fue obtenida a partir de organismos enfermos de jurel *Seriola quinqueradiata*. Esta fue reactivada en 5 ml de caldo soya triptocaseina (TSB) suplementado con 2.5% de cloruro de sodio estéril a 35 °C durante 24 horas.

Para la realización de los experimentos esta se ajustó en solución salina al 2.5% de NaCl a una densidad óptica de 1 a 600 nm ( $DO_{600} = 1$ ) usando un biofotómetro (Eppendorf, Merck Darmstadt, Germany) y el número de unidades formadoras de colonias (UFC=  $8.5 \times 10^6$ ) se determinó mediante diluciones decimales en tubos con 2.5% de NaCl en placas de agar soya triptocaseina (TSA) suplementado con 2.5% de cloruro de sodio.

### 6.2 Aislamiento de bacteriófagos

Para el aislamiento de bacteriófagos se emplearon diferentes muestras obtenidas de tejidos de hepatopáncreas y músculo de camarón *Litopenaeus vannamei*, almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*; agua de cultivos de huachinango *Lutjanus sp.*, muestras de tejido de larvas y juveniles de jurel *Seriola rivoliana* así como muestras pertenecientes a tejidos de músculo y tracto digestivo del tiburón renacuajo (*Cephalurus cephalus*), las cuales se procesaron de acuerdo a la metodología propuesta por Carlson (2005). Las muestras se diseccionaron y homogeneizaron en 200 ml de solución salina (NaCl al 2,5%). Donde a partir de TSB estéril previamente inoculado con *P. damselelae* se agregaron 100 mg de un homogenizado de cada uno de los tejidos y 200  $\mu$ l para el caso de agua de cultivo, incubándose por 24 horas a 30 °C.

Una vez transcurrido el tiempo, éstas se centrifugaron a 7000 g a 4 °C durante 10 minutos para concentrar la biomasa bacteriana, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos y estériles y la

presencia de bacteriófagos se corroboró por la formación de placas o calvas, ello se obtuvo inoculando 12  $\mu\text{L}$  de sobrenadante sobre una placa de triptocaseína agar soya suplementada con NaCl al 2.5 % (TSA+), inoculada masivamente con *P. damsela*. Para purificar los bacteriófagos, se tomaron placas individuales obtenidas por dilución y se utilizó el procedimiento de enriquecimiento para aumentar el número de partículas virales conformando una batería de bacteriófagos para futuras pruebas

### 6.2.1 Purificación de bacteriofagos

De la batería de bacteriófagos obtenidos, se empleó el fago más activo, aislado de tractos gastrointestinales del tiburón renacuajo (*Cephalurus cephalus*), de acuerdo con el procedimiento estandarizado descrito por Kropinski *et al.* (2009) con ligeras modificaciones, donde se inoculó con 1 ml de bacteria *P. damsela* subsp. *damsela* suspendida en solución salina ( $\text{OD}_{600} = 1$  que corresponde a  $2.1 \times 10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). Los homogeneizados se incubaron a 25 °C durante 24 h y se filtraron alícuotas de 10 ml usando filtros de jeringa Acrodisc de 0.2  $\mu\text{m}$  (PALL Corporation, NY, EE. UU.). Usando el método de prueba de punto, se agregaron 13  $\mu\text{L}$  del homogeneizado sobre placas de TSA previamente inoculadas con *P. damsela* subsp. *damsela* y se incubaron durante 24 h a 35 ° C. Las zonas líticas positivas se re suspendieron en solución salina filtrada con un filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se realizó un método de doble capa utilizando diluciones en serie para obtener placas de fagos individuales (Kropinski *et al.* 2009), y las placas correspondientes al fago activose volvieron a aislar tres veces más para garantizar la pureza del fago. El fago activo fue nombrado vB\_Pd\_PDCC-1 de acuerdo al nuevo nombramiento por el comité internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), donde vB: es virus bacteriófago y Pd: la bacteria utilizada para aislar el bacteriófago, *Photobacterium damsela* subs. *damsela* (Adriaenssens *et al.*, 2020).

### 6.2.2 Producción masiva de fago vB\_Pd\_PDCC-1

Los cultivos de *P. damsela* subs. *damsela* fueron cosechados en TSA a las 24 horas de incubación a 30 °C e inoculados en tubos Falcon con 50 ml de TSB. Simultáneamente, se



adicionaron 3 ml de cada uno de los bacteriófagos de prueba y estos se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 7000 g a 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y se almacenó en frascos estériles con capacidad de 1 litro para su posterior uso en los bioensayos y pruebas bioquímicas y físicoquímicas.

### **6.2.3 Titulación del fago vB\_Pd\_PDCC-1**

Con los sobrenadantes positivos se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) y se inocularon con *P. damsela* (OD600 = 1 que corresponde a  $2.1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) para promover la formación de placas individuales en medio TSA (NaCl al 2.5 %). Las placas individuales se transfirieron a 10 ml de caldo de soja trípico suplementado con NaCl al 2,5% (TSB +) previamente inoculado con *P. damsela* y se incubaron a 25 °C durante 24 h y luego se filtraron utilizando filtro milipore de 0.2 µm. Se purificó un clon mediante aislamientos en serie de placas. Los filtrados con fagos se almacenaron a -80 °C. Para la producción masiva, el fago se inoculó en 500 ml de TSB previamente inoculado con la bacteria blanco. Después de 24 horas a 25°C, los cultivos se filtraron utilizando filtros de 0.2 µm y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. El título en el stock utilizado en los experimentos se determinó en  $2.7 \times 10^9$  UFP·ml<sup>-1</sup> según Carlson (2005).

## **6.3 Identificación y caracterización del bacteriófago VB\_PD\_PDCC-1**

### **6.3.1 Microscopía electrónica de transmisión**

Para el análisis de estructura del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 se utilizaron 10 µl de lisado en rejillas recubiertas de carbono, y se dejó durante 5 minutos. Las rejillas se tiñeron con 10 µl de ácido fosfotungstico al 2% (pH 7.3) durante 1 minuto, y se colocaron en una caja para rejilla para secarlas con aire seco durante 3 h. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL ARM200F a 80 kV.

### 6.3.2 Aislamiento y secuenciación de genoma del fago

Un volumen de 1 ml de stock del fago vB\_Pd\_PDCC-1 ( $1 \times 10^9$  UFP  $\text{ml}^{-1}$ ) fue tratado con DNasa I (Sigma-Aldrich, Alemania) para eliminar cualquier indicio de ADN genómico del huésped (Mašláňová *et al.*, 2013). El ADN total se aisló usando el kit de aislamiento de ADN de fago de Norgen (Norgen Biotek Corp., Thorold, Canadá) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v). El ADN se cuantificó mediante el espectrofotómetro DS-11 Fx (DeNovix Inc., Wilmington, DE, EE. UU.). La biblioteca de ADN genómico se realizó utilizando el kit de preparación de biblioteca Nextera XT (Illumina Inc., San Diego, CA, EE. UU.), y se secuenció en una plataforma Illumina MiniSeq (300 ciclos, y lecturas pareadas de  $2 \times 150$  pb), siguiendo las Instrucciones del fabricante.

Las lecturas se recortaron de acuerdo con los ajustes pareados de trim\_galore. Las lecturas recortadas se ensamblaron con SPAdes v3.12.0 usando la opción `–only-assembler`. Los contigs del fago resultantes se verificaron para errores de ensamblaje por medio de Pilon. La manipulación de archivos BAM y SAM fueron archivados con Samtools v1.7. El genoma del fago se anotó inicialmente usando PROKKA con una base de datos construida a partir de todos los genomas de fago disponibles públicamente (diciembre 2019). Todas las predicciones de proteínas se buscaron en contraste con la base de datos hmmscan (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) utilizando la configuración predeterminada. Se construyó una base de datos personalizada de todos los genomas de fagos que se pudieron extraer de Genbank (enero 2020) como se describió anteriormente. Se utilizó un BLAST+ para identificar proteínas con una similitud significativa con las proteínas incluidas en vB\_Pd\_PDCC-1, utilizando parámetros predeterminados con un valor de corte de 0.0001. Si había más de 100 proteínas, solo se utilizaban las 100 principales para análisis posteriores.

Debido a que la subunidad larga de la terminasa se ha propuesto como un marcador útil para inferir la filogenia del fago (Serwer *et al.* 2004), los análisis por pares de las secuencias de la

subunidad larga de la terminasa se realizaron utilizando Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011) y MEGA v.7.0 (Kumar *et al.* 2016).

### 6.3.3 Rango de hospedero y lisis in vitro

Para el análisis del rango de hospederos, se utilizaron diferentes cepas patógenas del género *Vibrio* y *Photobacterium* (Ver Tabla 1) pertenecientes a la colección de Microbiología del Laboratorio de Genómica y bioinformática (CIBNOR, La Paz, México), las cuales se cultivaron en agar de soya tripticaseína (TSA) suplementado con NaCl al 2.5% a 25 ° C y se cosecharon después de 24 h.

Transcurrido el tiempo se tomaron 13 µl del stock del fago vB\_Pd\_PDCC-1 y un 1 ml de volumen de cada una de las cepas de *Vibrio* a una densidad óptica de OD600 = 1 (107–108 UFC mL<sup>-1</sup>), las cuales se mezclaron con 3 ml de agar suave (0.6 % p/v agar) previamente calentado a 35 °C y se vertieron sobre las placas con agar de fondo (medio de cultivo con agar al 1.5% p/v). Una vez que el agar polimerizó, se examinaron las placas después de 24 h de incubación para detectar zonas de lisis.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas usadas en el ensayo de rango de hospedero.

Cepa	Especie	Aislamiento	
		Locación	Fuente
CAIM 1910	<i>Photobacterium damsela</i>	Sinaloa	Brote de enfermedad de Jurel
CIBGEN-001	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BCS	Sedimento de tanque de camarones
CIBGEN-002	<i>Vibrio campbellii</i>	BCS	Tracto digestivo de camarón
CIBGEN-003	<i>Vibrio campbellii</i>	BCS	Tracto digestivo de camarón
CIBGEN-004	<i>Vibrio alginolyticus</i>	BCS	Hepatopáncreas de camarón
CIBGEN-005	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BCS	Tracto digestivo de peces
CIBGEN-006	<i>Vibrio campbellii</i>	BCS	Agua de cultivo de peces
CIBGEN-007	Presumptive <i>Vibrio</i>	BCS	Tracto digestivo de peces
CIBGEN-008	Presumptive <i>Vibrio</i>	BCS	Brote de enfermedad de Jurel
CIBGEN-009	Presumptive <i>Vibrio</i>	BCS	Brote de enfermedad de Jurel
CIBGEN-010	Presumptive <i>Vibrio</i>	BCS	Tracto digestivo de peces
MAI 86 B	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Sinaloa	Hepatopáncreas de camarón

#### 6.3.4 Curva de crecimiento de solo un paso

Para determinar el periodo de latencia y el tamaño del estallido. Se emplearon células bacterianas de *P. damselae* subsp. *damselae* de 24 h de cultivo suspendidas en solución salina (NaCl al 2.5%), las cuales se separaron por centrifugación y se resuspendieron en caldo TSB (NaCl al 2.5%). El fago se añadió a una concentración de 5 Multiplicidad de infección (MOI delimitado a 5 virus por célula bacteriana) por 90 min a 37 °C. la mezcla se centrifugó a 5,000 g por 10 minutos, posteriormente a los pellets que contenían las células infectas, se les realizó dos lavados más y se re suspendieron en TSB precalentado a 35 °C. La mezcla se incubó a 35 °C y se tomaron muestras por intervalos de 10 minutos (hasta llegar a 100 minutos) para determinar la titulación del fago mediante el método de agar de doble capa para obtener la curva de un paso. El periodo de latencia se toma como el tiempo que tarda una partícula de fago en reproducirse dentro de una célula huésped infectada y el tamaño del estallido se calculó dividiendo el número de UFP en la saturación de fagos por el número de UFP inicial (Kropinski, 2018).

#### 6.3.5 Eficiencia de plaqueo (EOP)

Para determinar la eficiencia de plaqueo cada una de las cepas patógenas empleadas en el presente estudio (Ver Tabla 1), se cultivaron a una concentración de  $10^9$  UCF  $\text{ml}^{-1}$ , donde se agregaron individualmente con 100  $\mu\text{l}$  de lisado del fago en un mix con medio TSA suave, agregado a una placa con agar de doble capa y se incubaron por 24 h a 35 °C. Ya transcurrido este tiempo la eficacia de plaqueo se determinó mediante la metodología previamente descrita por Mirzaei y Nilsson, (2015), aplicando la siguiente fórmula:

[Unidades formadoras de placas (UFP) en la bacteria de prueba / UFP de bacteria huésped]

Donde la EOP se clasificó como “Alta”, “Moderada” y “Baja” según la infección producida en la bacteria blanco; sólo considerándose “Alta” si la combinación de fago-bacteria tenía una infección producida de al menos 50 % (EOP  $\geq$  0.5) comparada con el huésped bacteriano. EOP

entre  $>10$  y  $<50\%$  ( $EOP > 0.1- < 0.5$ ) se considera 'Moderada' y  $EOP < 10\%$  ( $EOP \leq 0.1$ ) se considera 'Baja'.

### **6.3.6 Cinética de lisis bacterioana**

Para determinar la eficacia de lisis *in vitro* del fago vB\_Pd\_PDCC-1 contra las bacterias huésped referidas en la Tabla 1, se realizó una curva de lisis en caldo TSB, en una placa estéril de policarbonato de 96 pocillos (tres filas de ocho pozos por bacteria) a una multiplicidad de infección de 0.01 ( $MOI=0.01$ ) durante 12 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ , y se registró el crecimiento en un lector de microplacas de barrido espectral Varioskan Flash (Thermo Scientific 5250030, Alemania), a una densidad óptica de 600 nm ( $DO_{600}$ ) cada 10 minutos durante 2 horas y posteriormente cada 30 minutos durante 12 horas. Como control se emplearon filas con bacterias sin fagos a las mismas condiciones y pozos con medio de cultivo sin bacterias y sin fagos.

## **6.4 Caracterización fisicoquímica de bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1**

### **6.4.1 Evaluación de resistencia de bacteriófago**

Para determinar la resistencia del fago vB\_Pd\_PDCC-1 se evaluaron las siguientes condiciones fisicoquímicas a) temperatura, b) salinidad, c) exposición a UV y d) exposición a cloroformo.

En tubos con 1 ml de TSB, se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de cada uno de los bacteriófagos de prueba y se incubó por 24 horas a 10, 25, 30, 35, 40, 45, 60 y  $70^{\circ}\text{C}$ ; en el caso de salinidad se ajustó el medio con 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 %. Para la evaluación de radiación UV estas fueron expuestas por periodos de 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 segundos en una cámara de UV con una radiación de onda corta, finalmente se evaluó la exposición a concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 10% de cloroformo. La actividad de cada bacteriófago fue evaluada por triplicado mediante la generación de calvas en cultivos masivos de *P. damsela* al término de cada tiempo de incubación o exposición.

## 6.5 Producción de huevos de *Seriola rivoliana*

Los huevos de jurel se obtuvieron mediante el desove natural de un lote de reproductores (5 machos y 5 hembras) en criaderos de King Kampachi La Paz, México. Los huevos se dividieron en dos proporciones; uno se desinfectó con 200  $\mu\text{l}$  de yodo al 7 % durante 1 hora y el resto no se desinfectó. Los huevos se transfirieron a un recipiente sin sistema de recirculación con 4 litros de agua de mar estéril y filtrada manteniendo una densidad de 100 huevos por litro. La temperatura se mantuvo a  $24.17 \pm 0.97$  ° C; concentración de oxígeno disuelto a  $5.03 \pm 1.17$  mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, salinidad a  $37.0 \pm 1.0$  g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; y se mantuvo un fotoperiodo de 24 h luz de acuerdo a Teles *et al.*, (2017). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (2010/63 / UE) y el Gobierno mexicano (NOM-062-ZOO-1999) para el uso y cuidado de animales experimentales. Las directrices ARRIVE también se consideraron para el diseño y la implementación de los experimentos. Todos los protocolos y procedimientos experimentales fueron cuidadosamente revisados y aprobados por un comité de ética de CIBNOR.

## 6.6 Efecto del fago vB\_Pd\_PDCC-1 en el desarrollo de huevos de jurel *Seriola rivoliana*

Para probar el efecto del fago durante la eclosión de huevos de jurel *Seriola rivoliana* se realizó un bioensayo en el laboratorio húmedo del laboratorio de Genómica Acuícola de CIBNOR, donde se emplearon acuarios con sistema de circulación cerrada (Fig. 3), con dos litros de agua de mar a una concentración de 100 huevos por litro, con aireación continua. El trabajo se dividió en dos grupos, **1) huevos desinfectados** (D) (200  $\mu\text{l}$  de yodo al 7 %) y **2) huevos no desinfectados** (ND), donde cada grupo se dividió en: huevos control, y huevos con bacteriófago (vB\_Pd\_PDCC-1). Cada tratamiento y su respectivo control se realizaron por cuadruplicado.

### 6.6.1 Efecto del fago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre reducción de vibrios en huevos de jurel *S. rivoliana*

Para observar el efecto de los fagos sobre la reducción de *Vibrio* en la carga bacteriana, se recolectaron muestras de 20 huevos o larvas por tratamiento del bioensayo por cuadruplicado cada 6 horas partiendo del tiempo inicial (T0, T1, T2, T3 y T4). El número de *Vibrio* se evaluó mediante técnicas microbiológicas estándar. Previamente los huevos y larvas obtenidas se lavaron con agua de mar estéril y se volvieron a suspender en NaCl al 2.5 % y se

homogeneizaron utilizando un disruptor celular (Biospec Products, Bartlesville). Posteriormente se hicieron diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-10}$ ) y se sembraron sobre placas de agar de tiosulfato-citrato-sales biliares (TCBS, Merk KGaA) para evaluar la disminución de carga de *Vibrio* a 35 °C durante 24 h. Se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los análisis de UFC y sus cambios por cada tiempo medido se realizaron con ayuda del Software Statistica 8.0 de StatSoft.

### **6.6.2 Análisis de permanencia de bacteriófagos en cultivo**

Para el estudio de la permanencia de los bacteriófagos líticos se tomaron 20 huevos por cada tratamiento, así como 20 larvas para el tiempo final (24 horas DDE). Para el caso del agua de cultivo se tomaron 15 ml por tratamiento. Las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf estériles a -20 °C para su posterior análisis. De estas muestras se reactivaron los bacteriófagos aislándose con la bacteria blanco *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* y se realizó la prueba de gota para comprobar el tiempo de permanencia de los bacteriófagos en las diferentes muestras obtenidas.

### **6.6.3 Análisis por microscopía electrónica (SEM)**

Para el análisis de microscopía electrónica se fijaron muestras a lo largo del bioensayo partiendo de T0 y durante cada 6 horas (T1-T4) por cuadruplicado. Se tomaron muestras de 20 huevos aproximadamente por tratamiento y réplica y se fijaron en tubos 1 mL de reactivo FIX en tubos Eppendorf dejando las muestras a 4 °C durante dos horas, y posteriormente el reactivo era removido y sustituido por buffer para su posterior almacenamiento. Las muestras se analizaron en el laboratorio de Microscopia electrónica en las instalaciones de CIBNOR por medio del microscopio electrónico de barrido (S-3000N, Hitachi High-Technologies), con un detector de electrones secundarios (SED).

Estas muestras fueron transferidas a un gradiente de alcohol etílico pasando por 30, 50, 70, 90 y 100 %. Posteriormente se fijaron utilizando tetróxido de osmio y se dejaron en reposo por 24

horas. Posteriormente se sometieron a deshidratación empleando un sistema de secado a punto crítico (Samdri-PVT-3B). Las muestras se colocaron en porta muestras de aluminio con una cinta doble cara y se recubrieron con iones de oro en un evaporador de metal (Sputter Coater, Denton Vacuum Desk II). Una vez recubiertas las muestras fueron observadas al microscopio electrónico de barrido.

#### 6.6.4 Efectos de fagoterapia de vB\_Pd\_PDCC-1 en la eclosión de huevos de *S. rivoliana*

Para evaluar el uso de la fagoterapia en un reto con *Photobacterium damsela* durante la eclosión de huevos de *S. rivoliana*. Se utilizaron tratamientos de huevos desinfectados (200  $\mu$ l de yodo al 7 %) y no desinfectados en unidades experimentales de 4 litros a una densidad de 100 huevos por litro. Los tratamientos fueron: A) huevos desinfectados sin fagos, B) huevos no desinfectados sin fago, C) huevos desinfectados con fago vB\_Pd\_PDCC-1, C) huevos no desinfectados con fago vB\_Pd\_PDCC-1. Las concentraciones de fagos utilizadas fueron  $2 \times 10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup> en cada unidad experimental. Al final del experimento, se evaluó la tasa de eclosión en cada grupo. Los huevos fueron monitoreados partiendo de un tiempo inicial (T0) y analizando y tomando muestras cada 6 horas hasta completar un periodo de 24 horas cercanas al tiempo de eclosión: 6 horas (T1), 12 horas (T2), 18 horas (T3) y 24 horas (T4).



**Figura 3.** Sistema de bioensayo con huevos de jurel sometidos a diferentes tratamientos.



## **6.6.5 Análisis histológicos**

### **6.6.5.1 Muestreo y fijación**

Para el análisis de los efectos de los bacteriófagos sobre los tejidos en los diferentes tiempos (T0, T1, T2, T3 y T4) de desarrollo del huevo de jurel se tomaron muestras cada 6 horas por cuadruplicado y se fijaron en tubos Eppendorf utilizando 1 mL del reactivo de Fijación de Davidson para su posterior procesamiento histológico. Debido al tamaño de la larva se incluyó todo el organismo y se colocaron en histocassettes con etiquetas con información del tratamiento correspondiente.

### **6.6.5.2 Procesamiento de tejidos**

Los tejidos fueron colocados en alcohol etílico al 70% durante 24 horas. El procesamiento histológico (deshidratación, aclaramiento e infiltración) de las muestras se llevó a cabo empleando un procesador automático de tejidos LEICA ASP200S®. La deshidratación se realizó en series de alcohol etílico de concentración ascendente (70, 80, 90, 96 y 100%). El aclarado de las muestras se hizo con xileno absoluto (100%) pasando antes los tejidos por una solución de alcohol etílico 100: xileno (1:1) y después por xileno al 100%. La infiltración de las muestras en parafina se realizó introduciendo los tejidos en un recipiente con una solución 1:1 de parafina: xileno para después colocarlas en cuatro recipientes más con parafina líquida caliente a 60°C. La inclusión de las muestras se llevó a cabo en Paraplast X-Tra (Mc Cormick Scientific, San Diego, CA) con punto de fusión de 54-56 °C en un centro de inclusión LEICA EG1150H y EG1150C®. Los moldes se dejaron enfriar en una placa fría (-5 °C).

Empleando un microtomo de rotación automático LEICA RM2155® se realizaron cortes de los tejidos a 4 µm de grosor, y se colocaron en un baño de flotación con agua y grenetina al 1% a 43°C. Posteriormente se tomaron los cortes del baño de flotación con portaobjetos de vidrio previamente etiquetados y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h.

Los tejidos se desparafinaron en tres pasos por xileno I, II y III durante 10 min en cada uno, luego pasaron a una solución 50:50 alcohol etílico 100%-xileno durante 5 min, posteriormente los cortes se hidrataron pasándolos por una serie de alcohol etílico en concentración decreciente (96, 70, y 70 %, por 2 min en c/u) y finalmente se pasaron por agua destilada durante 5min (Anexo 2).

### **6.6.5.3 Tinción con técnica Hematoxilina-Eosina (H-E)**

Los cortes de tejido se procesaron en un equipo de teñido automático de tejidos LEICA ST5020®. Para realizar la observación visual de rutina de los tejidos y el estudio histológico, se empleó la técnica histológica convencional de Hematoxilina-Eosina (H-E).

La técnica H-E (Anexo 3) supone que la aplicación de la tinción con hematoxilina de Harris, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura (núcleos celulares), mientras que el uso de eosina-floxina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos naranja-rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma (Montalvo-Arenas, 2010; Sheehan y Hrapchak, 1980).

Las laminillas se montaron en medio permanente de resina sintética Entellan® y se dejaron secar por 24 h, para finalmente observar al microscopio las estructuras histológicas de cada tejido.

### **6.6.5.4 Análisis histológicos cualitativos**

La observación de las laminillas para los análisis histológicos se realizó en un microscopio de campo claro Olympus BX41; las imágenes fueron digitalizadas usando el campo claro con una cámara digital para microscopio marca Nikon Digital Sight DS-Ri1® conectada a una computadora. Las imágenes (microfotografías) de los tejidos fueron digitalizadas con los objetivos 10, 20, 40, 60 y 100x, y analizadas digitalmente con el software Image Pro-Premier (versión 9.0) Olympus-Media Cybernetics®. A partir de las observaciones de la estructura

mostrada por el embrión de las laminillas de cortes histológicos, se realizaron esquemas identificando las principales características del desarrollo embrionario temprano.

### **6.6.6 Análisis de secuenciación masiva del gen 16S**

Para evaluar las sucesiones microbianas generada por el bacteriófago, se tomaron muestras de huevos cada 6 horas de los diferentes tiempos (T0, T1, T2, T3 y T4) en etanol al 96% por cuadruplicado, para su posterior estudio metagenómico a partir de amplicones del gen 16S ribosomal, por medio de una plataforma Illumina MiSeq.

#### **6.6.6.1 Extracción de ADN**

Al principio y al final del período experimental, 10 ml de huevos de *S. rivoliana* por tratamiento (Control, *P. damselae* y vB\_Pd\_PDCC-1) se conservaron asépticamente en tubos Eppendorf de 2 ml, y se almacenaron a -80 °C hasta la Extracción de ADN. El muestreo se realizó como se describió anteriormente (Rungrassamee *et al* 2014; Zeng *et al.* 2017).

Para realizar la extracción de ADN se utilizó la metodología de extracción con Cloruro de Sodio. Para ello se colocaron 10 huevos (1 g) de *Seriola rivoliana* con 400 µl de buffer de lisis y 2 µg de proteinasa K. Los tejidos se maceraron con pistilos de plástico estériles y el resultado se colocó en baño maría por 60 minutos a 60 °C. Al finalizar se adicionaron a cada muestra 200 µl de NaCl a 5 M y se agitó vigorosamente durante unos segundos. Ésto se colocó en hielo por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos con 1 ml de etanol absoluto frío y se dejó reposar durante la noche. Se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Seguido a esto las muestras se secaron a 40 °C por 40 minutos. El ADN obtenido se diluyó en 80 µl de agua mili-Q estéril. Finalmente se cuantificó el ADN en un Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE. UU.) y se diluyó con agua Mili-Q a 100 ng/µl.

### 6.6.6.2 PCR

Para comprobar la calidad del ADN extraído se realizó una prueba de electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1 % y se dejó correr por 30 minutos con un voltaje de 90 V. Una vez comprobado que el protocolo de extracción de ADN fue funcional se realizó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con el fin de observar si las muestras amplificaban la región 16S. Para ello se preparó un Mix para PCR donde utilizando en cada reacción 2.5 µl de Buffer de carga, 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de dNTPs, 0.25 µl tanto de Primer Forward y 0.25 µl Primer Reverse para 16S, 6.9 µl de agua Mili-Q y 0.1 µl de enzima Taq polimerasa, empleando 1 µl de ADN por reacción. Finalmente, para observar si el PCR se concretó se realizó un gel de agarosa al 1% y se dejó correr por 40 minutos con un voltaje de 90 V.

### 6.6.6.3 Secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal

La preparación de la biblioteca se realizó siguiendo el protocolo para secuenciación metagenómica 16S de Illumina (Part # 15044223 Rev. B); brevemente la región variable V3 del gen 16S rRNA se amplificó por PCR con los siguientes cebadores (minúsculas) y adaptadores de Illumina (mayúsculas): 16S-V3\_338f (TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG acy cct acg ggr ggc agc) y 16S-V3\_533r (GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G tta ccg cgg ctg ctg gca). Las condiciones de la PCR fueron: un ciclo a 95 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y un ciclo final de 72 °C durante 5 min. Los amplicones de PCR se purificaron con perlas magnéticas de ampure XP. Se agregaron índices de Illumina para cada muestra con una segunda PCR a 95 °C durante 3 min, seguidos de 8 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, y 72 °C durante 30 s, y un ciclo final de 72 °C durante 5 min, seguido de una segunda limpieza con cuentas.

Los amplicones de PCR finales se cuantificaron con el kit de ensayo dsDNA BR en un fluorómetro Qubit (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, EE. UU.), y se ajustó un pool equimolar a 4 nM para una desnaturalización adicional, que se diluyó a 2 pM, cargado en un medio - Celda de flujo de salida, y secuenciada en la plataforma Illumina MiniSeq.

#### 6.6.6.4 Análisis bioinformáticos

Las secuencias Fastq se procesaron con el software Mothur (Schloss *et al.*, 2009) utilizando el pipeline MiSeq SOP ([https://mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](https://mothur.org/wiki/MiSeq_SOP)). Las secuencias se alinearon utilizando la base de datos de referencia SILVA (Quast *et al.*, 2013). Posteriormente las secuencias se asignaron a unidades taxonómicas operativas (OTU) basadas en una similitud de secuencia del 97%. Luego se calcularon las métricas de diversidad alfa (i.e., índices de riqueza Chao1 de diversidad de Shannon) y beta (i. e., índice de Yue y Clayton) basándose en las OTUs agrupadas. La relación entre las muestras se visualizó en un gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la medida de disimilitud de Yue y Clayton.

#### 6.7 Efecto de la terapia con fagos en huevos de *Seriola rivoliana* bajo reto con *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*

Se infectaron grupos de 100 huevos  $\cdot L^{-1}$  (previamente aclimatados) en unidades experimentales de 4 L de agua de mar estéril y se infectaron con una concentración final dosis única de *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* a una concentración de  $8.5 \times 10^6$  CFU  $\cdot mL^{-1}$  y se trataron con 100  $\mu l$  de fago vB\_Pb\_PDCC-1 con una suspensión de  $2 \times 10^8$  UFP  $\cdot mL^{-1}$ . Los grupos de huevos infectados con *P. damselae* que no fueron tratados con fagos se utilizaron como controles positivos, y los huevos no infectados como controles negativos. Cada tratamiento se analizó por cuadruplicado y se midió la tasa de supervivencia durante la eclosión registrada a las 48 horas después de la infección.

#### 6.8 Pruebas previas para estandarización del cultivo larvario de *Seriola rivoliana*

##### 6.8.1 Selección de densidad de huevos en el sistema

Se realizó un bioensayo previo para observar la diferencia en el porcentaje de eclosión y supervivencia de larvas de Jurel dependiendo de la densidad de huevos en los tanques de cultivo. Se utilizó una densidad de 40, 60, 80, 100 y 120 huevos por litro en peceras de 2 litros. Se calcularon los valores de eclosión, así como el porcentaje de supervivencia de las larvas.

### 6.8.2 Análisis de microbiología

Con el fin de observar el efecto del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre la microbiota del alimento vivo *Nannochloropsis* e *Isochrysis*, rotíferos *Brachionus plicatilis* y *Artemia salina*, se realizaron aislamientos bacterianos de cada alimento, posteriormente estas se sometieron a prueba de gota utilizando el fago vB\_Pd\_PDCC-1 para observar si se presentaban halos de inhibición

Simultáneamente se tomaron muestras de larvas de *S. rivoliana* y se homogeneizaron en solución salina (NaCl al 2.5 %) utilizando un disruptor celular (Biospec Products, Bartlesville). Posteriormente se hicieron diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-5}$ ) y se sembraron sobre placas de agar de tiosulfato-citrato-sales biliares (TCBS, Merk KGaA) para determinar la carga bacteriana de *Vibrios* presentes (UFC).

Para determinar el número de virones por bacterias a emplear en el bioensayo se realizó un análisis de carga bacteriana presentes en los huevos de Jurel *Seriola rivoliana*. Para ello se tomaron muestras de huevos de Jurel y se licuaron con solución salina, tomando una respectiva alícuota y realizando diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Se realizaron cultivos en placas medio de TCBS para determinación de *Vibrio* obteniendo un UFC de  $1.3 \times 10^3$ /mL. Considerando la titulación del bacteriófago con una concentración de  $1.4 \times 10^{10}$  UFP·ml<sup>-1</sup> se emplearon 10 ml del bacteriófago para tener una concentración de un bacteriófago por célula bacteriana (1 MOI).

### 6.8.3 Preparación masiva de fago para bioensayo

Se utilizaron cultivos frescos de la cepa de *P. damselae* en medio TSA incubadas por 24 horas a 35° C y bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 para una producción masiva de 1 litro de medio para el bioensayo; fueron centrifugados y se separó el sobrenadante el cual se filtró por medio de filtros Millipore de 0.2 µm. Se purificó mediante aislamientos en serie de placas. Los filtrados con fagos se almacenaron a -80 ° C. Para la producción masiva, el fago se inoculó en 500 ml de TSB previamente inoculado con la bacteria blanco. Después de 24 horas a 25 °C, los cultivos se

filtraron utilizando filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. El título en el stock utilizado en los experimentos se determinó en  $1.4 \times 10^{10}$  UFP·mL<sup>-1</sup> según Carlson (2005).

#### **6.8.4 Determinación de tiempo de aplicación de fago vB\_Pd\_PDCC-1**

Para determinar el tiempo de permanencia en el sistema del fago, así como para determinar el tipo de terapia activa o pasiva, en tanques con volúmenes de 100 y 300 litros por triplicado, se transfirieron huevos sin desinfectar de *S. rivoliana* a una concentración de 100 huevos /L y se dividieron en tres tratamientos. En cada tanque respectivamente se agregó una cantidad de 5 ml de fago vB\_Pd\_PDCC-1 a una concentración de  $1.41 \times 10^{10}$  PFU mL<sup>-1</sup> equivalente a un MOI de 1; 1) Aplicación de fago una vez al día; 2) Aplicación de fago cada 3 días; 3) Aplicación de fago cada cinco días. Se tomaron muestras cada día hasta llegar al día 15. Las muestras se homogenizaron y se realizó cultivo de fagos con el fin de realizar pruebas de gota y observar los halos de inhibición indicando la presencia de fagos.

#### **6.9 Bioensayo de desarrollo larvario de jurel *Seriola rivoliana***

Se realizó un cultivo larvario de Jurel *Seriola rivoliana* partiendo desde huevo y llegando a los 12 días Post eclosión en el laboratorio de Larvicultura para analizar el efecto del fago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre la ontogenia de larvas de *S. rivoliana*. Para ello se utilizaron 4 tanques de 700 litros cada uno, divididos en dos tratamientos: 1) Control y 2) Aplicación de fago vB\_Pd\_PDCC-1 a una temperatura de  $24.5 \pm 0.97$  ° C; concentración de oxígeno disuelto a  $5.03 \pm 1.17$  mg · L<sup>-1</sup>, salinidad a  $37.0 \pm 1.0$  g · L<sup>-1</sup>; con un fotoperíodo 24 h de luz artificial a partir de la incubación y con el esquema de alimentación propuesto por Teles *et al* (2017); microalga *Isochrysis* y *Nannochloropsis* fue suministrada en el sistema de cultivo partiendo desde el día 0 para madurar el sistema así como para alimentación para rotíferos en los tanques de cultivo; a partir del día dos post eclosión coincidiendo con la recién apertura de boca de las larvas se suministró rotífero en el sistema, alimentado con las microalgas antes mencionadas así como del enriquecedor ORIGREEN; finalmente llegando al día diez post eclosión se realizó la transición de rotífero a nauplio de *Artemia* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Esquema de alimentación durante desarrollo larvario de *Seriola rivoliana* (Teles *et al.*, 2017)

Alimento	Tipo	Cantidad	Periodo (DPE)
Microalga	<i>Nannochloropsis oculata</i>	0.5-1.0x10 <sup>6</sup> cél mL <sup>-1</sup>	0-18
Rotífero enriquecido	<i>Brachionus plicatilis</i>	20 rotíferos mL <sup>-1</sup>	2-18
Levadura	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1 g x 10 <sup>6</sup> rotíferos	4-18
		1 g x 150.000 <i>Artemia</i>	15-30
Nauplios de <i>Artemia</i>	<i>Artemia</i> sp.	0.2-2 nauplio mL <sup>-1</sup>	12-15
Metanauplio de <i>Artemia</i>	<i>Artemia</i> sp.	2-5 metanauplio mL <sup>-1</sup>	15-30
enriquecido			
Alimento particulado	Otohime	<i>Ad libitum</i>	18-30

Para el mantenimiento del sistema se realizaba una rutina diaria la cual consistió en la toma de parámetros fisicoquímicos, limpieza del equipo empleado y sifoneo dos veces al día (mañana y noche). El bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 fue administrado cada tres días partiendo desde el día 0 (Anexo, Tabla 8). Se tomaron muestras de organismos diarias para la toma de fotografías y mediciones de longitud, ancho, tamaño de gota lipídica, saco vitelino, así como el aumento gradual de tamaño de ojos. Se tomaron muestras los días 0, 2, 5, 8 y 12 para posteriores análisis de histología, microbiología, metagenómica, análisis enzimáticos y expresión génica. Para metagenómica los organismos se almacenaron en alcohol etílico al 96% a 4 °C; para los análisis de transcriptómica e inmunología las muestras se preservaron en RNA later a -80 °C; muestras para análisis histológicos se preservaron en una solución de Davidson; mientras que las muestras para análisis enzimáticos se guardaron a -80 °C. Las muestras para análisis microbiológicos se procesaron y analizar al momento de la toma de muestras.

### 6.9.1 Medición de parámetros de crecimiento larvario

Se analizó la tasa de eclosión y se determinó la supervivencia larvaria mediante inspección visual y recuento de larvas por litro, así como la inspección del total de larvas muertas cada 24 horas. Para medir el crecimiento, las larvas se muestrearon diariamente (n = 10) desde la eclosión hasta el día 12 DDE.



Se realizaron observaciones con la ayuda de un estereoscopio con digitalizador de imágenes Nikon con campo brillante Digital Sight DS-Ri1<sup>®</sup>. Las cuales se digitalizaron y analizaron con el software Image-Pro Premier, v9.0 (Media Cybernetics; Rockville, MD, EE. UU.). Considerando las medidas de longitud estándar desde la punta del maxilar hasta el final de la aleta caudal. Asimismo, se midieron el diámetro del ojo y la longitud de la boca, así como el diámetro de la gota lipídica.

El crecimiento larvario se evaluó utilizando la tasa de crecimiento específico (SGR):  $SGR = [100 (\ln SL_f - \ln SL_i) / \Delta t]$  y la tasa de crecimiento absoluto (AGR):  $AGR = [(SL_f - SL_i) / \Delta t]$  y donde  $SL_f$  es la longitud estándar final, y  $SL_i$  es la longitud estándar inicial, y  $\Delta t$  es el intervalo de tiempo (días) entre los puntos de muestreo (Teles *et al.*, 2019). Después de 24 h desde la incorporación de *Artemia* en los tanques, el contenido digestivo de las larvas se contó para determinar el consumo de *Artemia* por larva.

### **6.9.2 Análisis de pigmentación en larvas de jurel *Seriola rivoliana***

Para los análisis de pigmentación se recolectaron 15 larvas de *S. rivoliana* por día de 1-12 días DDE y se tomaron fotografías utilizando una cámara digital acoplada a un estereoscopio (Leica Microsystems; Buffalo Grove, IL, EE. UU.). Las imágenes de las larvas se procesaron mediante el software Image-Pro Premier v.9.0 (Media Cybernetics). El área de pigmentación de los ojos, así como el área de pigmentación del tegumento de la larva, se midieron mediante la diferenciación del tamaño de píxeles estimados por área de cobertura.

### **6.9.3 Análisis microbiológico**

Se tomaron muestras de huevos el día 0 y larvas (15 organismos) de *S. rivoliana* los días 2, 5 y 12 post eclosión de ambos tratamientos por cuadruplicado y se homogeneizaron en solución salina (NaCl al 2.5 %) utilizando un disruptor celular (Biospec Products, Bartlesville). Posteriormente se hicieron diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-5}$ ) y se sembraron sobre placas de agar de tiosulfato-

citrato-sales biliares (TCBS, Merk KGaA) para determinar la disminución en la carga bacteriana de *Vibrio* presentes (UFC).

#### **6.9.4 Análisis de secuenciación masiva**

Para evaluar la estructura y cambio en las sucesiones microbianas durante el desarrollo ontogénico se tomaron muestras los días 0, 2, 5 y 12 y se fijaron en etanol al 96% por cuadruplicado, para su posterior estudio de secuenciación a partir de amplicones del gen 16S ribosomal, por medio de una plataforma Illumina MiSeq. Se utilizó el procedimiento para aislamiento, secuenciación y análisis bioinformático de las muestras descrito previamente en el apartado 6.6.6 respectivamente.

#### **6.10 Análisis estadísticos**

Para determinar si existía diferencia significativa en los parámetros experimentales y los diferentes tratamientos para cada prueba fueron sometidos por medio de análisis de varianza (ANOVA  $P < 0.05$ ). Para los análisis de microbiología para resistencia de fagos y conteo de UFC, los análisis de la tasa de eclosión y el valor de supervivencia, así como para los análisis de longitud, crecimiento y área de pigmentación se evaluaron los valores de la normalidad y la homocedasticidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente.

Con los resultados obtenidos en los experimentos se hicieron bases de datos en Microsoft Excel y se analizaron mediante ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de Newman-Keuls implementadas en el software Statistics 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EE. UU.). Para las diferencias significativas se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey. Con respecto al análisis de la composición y la estructura de la comunidad bacteriana, se aplicaron pruebas de análisis de varianza molecular (AMOVA), implementadas en el paquete de software MOTHUR (Schloss *et al.* 2009; Kozich *et al.*, 2013), para determinar si el agrupamiento dentro de las ordenaciones es estadísticamente significativo. El procesamiento de datos y creación de figuras de realizaron utilizando Microsoft Excel 365 (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE. UU.).

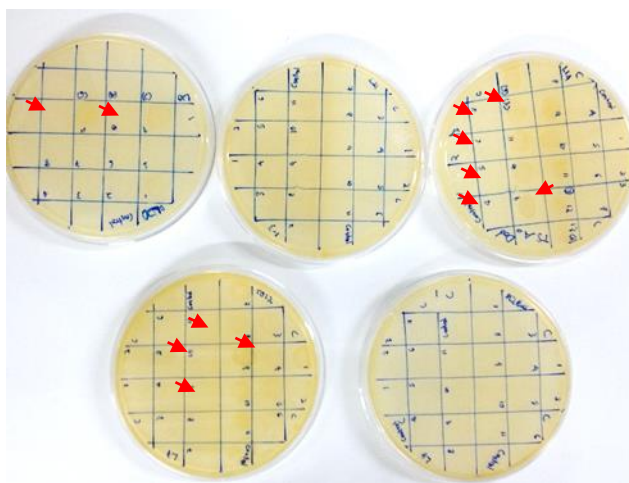
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aislamiento de bacteriófagos líticos

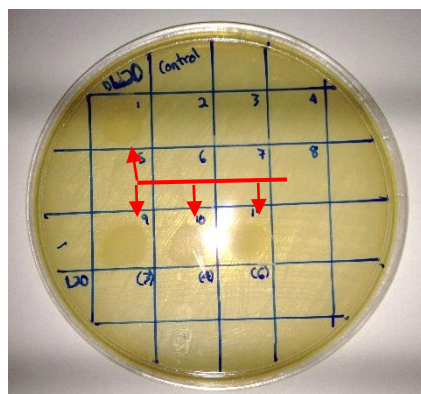
De las diferentes muestras procesadas se consideraron los bacteriófagos con mejores efectos de amplio aspecto al presentar inhibición con varias de las cepas bacterianas patógenas. Esto se ve reflejado en la formación de halos de inhibición dando lugar a las calvas en las placas cubiertas de bacteria (Fig. 4). Los fagos más activos resultantes fueron aislados del tracto gastrointestinal del tiburón renacuajo *Cephalurus cephalus* obteniendo el mayor número de calvas con efecto inhibitorio entre diferentes patógenas empleadas como blanco. Se obtuvieron 15 fagos con efecto contra la bacteria de importancia *Photobacterium damsela* subs. *damsela* (PDCC-1, PDCC-2, PDCC-3, PDCC4, PDCC-5, PDCC-6, PDCC-7, PDCC-8, PDCC-9, PDCC-10, PDCC-11, PDCC-12, PDCC-13, PDCC-14 y PDCC-15).

Se seleccionó el fago PDCC-10 (renombrado vB\_Pd\_PDCC-1 de acuerdo con la convención de nomenclatura de Kropinski.) para su utilización en los bioensayos, al presentar el mejor efecto de lisis contra la mayor cantidad de cultivos masivos posibles de bacterias patógenas. En la figura 5 se observa cómo en la cuadrícula resaltan las calvas, presentándose como un halo transparente debido a que se inhibió el crecimiento de la bacteria blanco (*P. damsela*) por la actividad lítica del bacteriófago.

El fago vB\_Pd\_PDCC-1 se caracterizó por presentar placas relativamente pequeñas (menos de 1.0 mm) en *P. damsela* subsp. *damsela* a 25 °C. La titulación del fago se determinó mediante diluciones logarítmicas del lisado de fago purificado, cuyos valores fueron  $1.41 \times 10^{10}$  UFP mL<sup>-1</sup>.



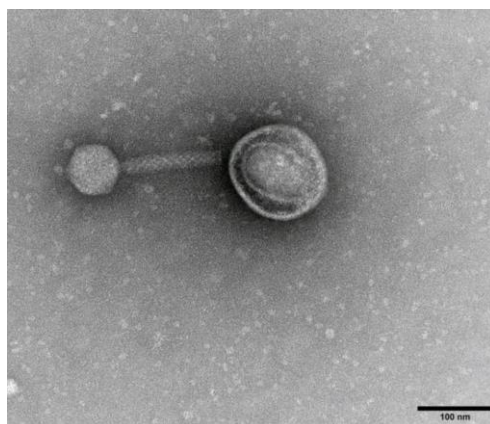
**Figura 4.** Cuadrículas realizadas para cada una de las bacterias patógenas. Las flechas señalan las diferentes calvas de inhibición en las diferentes placas de TSA recubiertas de bacteria blanco.



**Figura 5.** Prueba de inhibición bacteriana. Se muestran las calvas formadas por efecto del bacteriófago sobre la bacteria patógena blanco *P. damsela*.

### 7.1.1 Identificación del fago de acuerdo con la morfología

El análisis morfológico realizado mediante TEM mostró que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 presenta una cabeza isométrica (diámetro=7599.3 nm) y una cola larga retráctil (1314.0 nm). Estas características morfológicas clasifican el fago vB\_Pd\_PDCC-1 en el orden de virus Caudovirales perteneciendo a la familia Myoviridae (Figura 6).



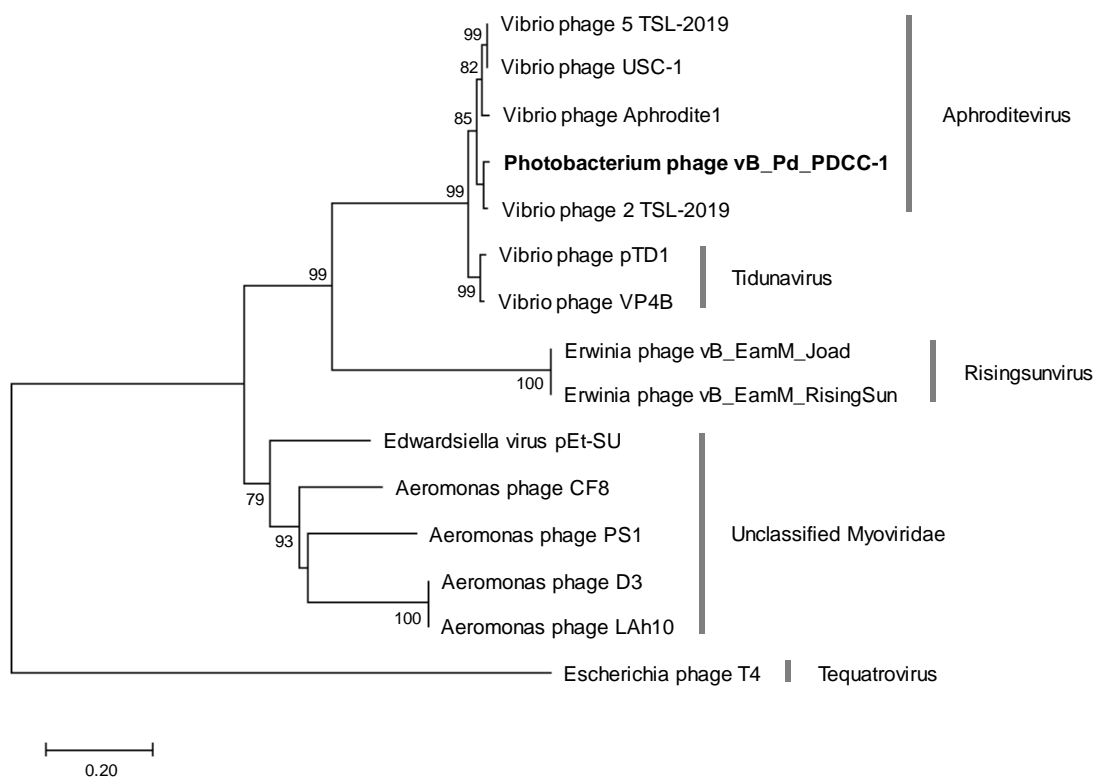
**Figura 6.** Microfotografía del fago vB\_Pd\_PDCC-1 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). La barra representa una longitud de 10 nm.

### 7.1.2 Genoma del fago

Se determinó que el genoma del fago vB\_Pd\_PDCC-1 fue de 237,509 pb, lo cual lo cataloga como un Jumbofago con 43.3% de contenido de G + C. Los marcos de lectura abiertos (ORF) pronosticados usando el buscador de ORF fueron de 248 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Entre ellos, se encontraron 214 secuencias de codificación de proteínas (CDS) usando GeneMarkS (Besemer *et al.* 2001), sin embargo, no se encontraron genes de tRNA usando tRNAscan-SE v2.0 (Chan y Lowe, 2019). Todos los CDS pronosticados se anotaron manualmente utilizando la búsqueda BLASTP contra la base de datos NCBI nr (proteína no redundante) y la Base de datos de dominio conservado (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) con un corte E- valor de  $\leq 10^{-3}$ . Los genes CDS pronosticados codificaban ADN ligasa, ADN helicasa, ADN polimerasa, subunidad de terminasa grande, ribonucleasa HI, timidina quinasa, proteína estructural de virión, proteína cabeza-cola no clasificada, proteína de medida de cinta de longitud de cola, fosfato de indol-3-glicerol sintasa. La secuencia completa del genoma del fago vB\_Pd\_PDCC-1 está disponible en la base de datos GenBank con el número de acceso MN562221.

La organización del genoma del fago vB\_Pd\_PDCC-1 fue muy similar a la de los fagos de *Aphroditevurs*, que pertenecen a la familia *Myoviridae*. El análisis del genoma completo mostró que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 comparte varias proteínas homólogas (90.12%) con vibriofago 2 TSL-

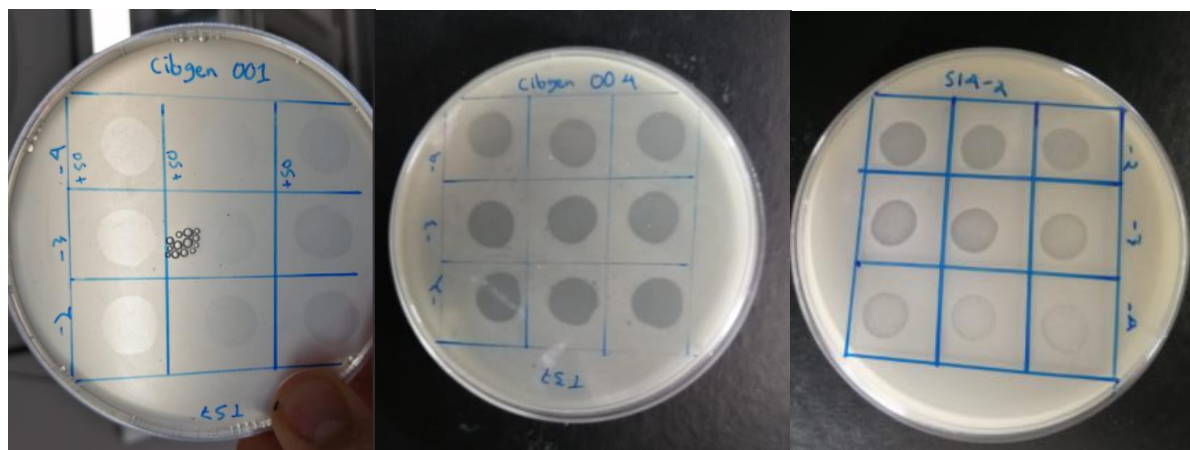
2019 (número de acceso de GenBank MK368614). Los análisis filogenéticos indican que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 es similar (97.84%) al *Vibrio* fago 2 TSL-2019 (Figura 7).



**Figura 7.** Dendrograma filogenético del fago de *Photobacterium* vB\_Pd\_PDCC-1 con los fagos más estrechamente relacionados, basado en secuencias de aminoácidos de subunidades grandes de la terminasa y construido por el método de Neighbor-joining. Los porcentajes de bootstrap (> 70%) basados en 1000 repeticiones se muestran en los nodos de ramificación.

### 7.1.3 Rango de Hospedero

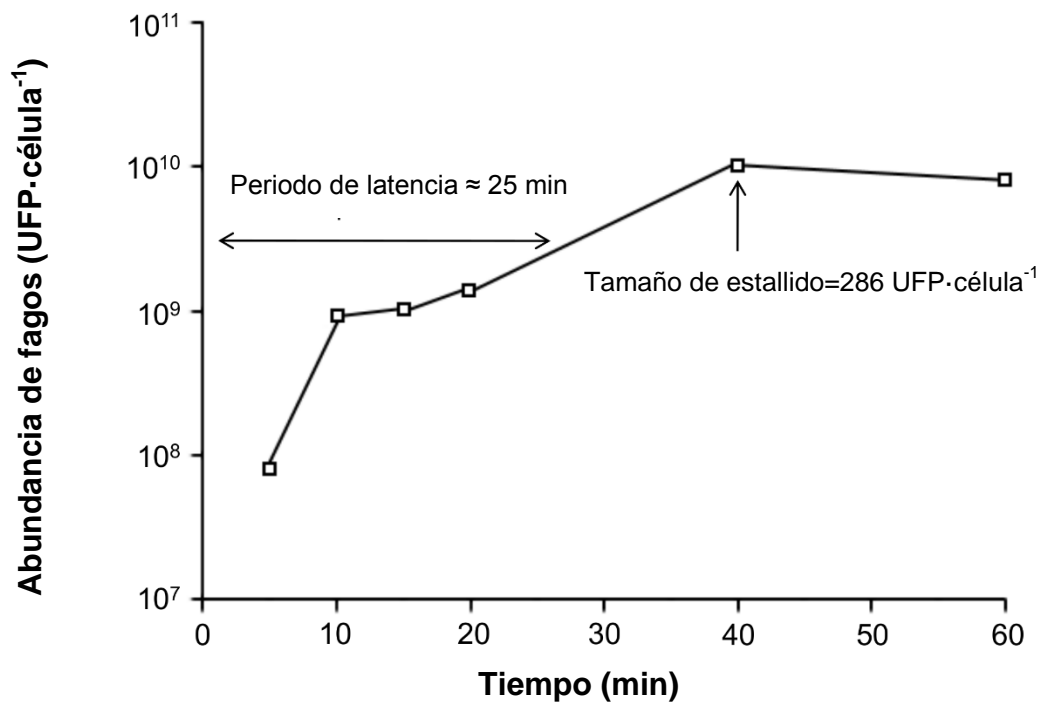
Un total de 12 cepas bacterianas fueron evaluadas para analizar el rango de hospedero del fago vB\_Pd\_PDCC-1 mediante un ensayo tradicional de prueba de punto. Los resultados mostraron que el fago presenta un amplio rango de hospedero entre las diferentes cepas de *Vibrio* y *Photobacterium* al presentar zona de lisis (Fig. 7). En recubrimientos de agar inoculados con cada cepa para prueba bacteriana, utilizando el fago ajustado a una dilución de prueba de rutina consistente (RTD). No se observó la aparición de colonias resistentes mostrando la capacidad del fago para evitar la resistencia bacteriana.



**Figura 8.** Rango de hospedero del fago vB\_Pd\_PDCC-1 contra diferentes cepas patógenas. A) *Vibrio parahaemolyticus*; B) *Vibrio alginolyticus*; C) *Photobacterium damselae* subs. *damselae*.

#### 7.1.4 Curva de un solo paso

Los resultados de los experimentos de la curva de crecimiento de un solo paso (Figura 9) mostraron que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 se caracterizó por un periodo de latencia relativamente corto de aproximadamente 25 minutos. El tamaño del estallido de vB\_Pv\_PDCC-1 se calculó en una abundancia aproximadamente de  $\sim 286$  UFP partículas virales por cada célula bacteriana infectada alcanzados en el minuto 40.



**Figura 9.** Curva de crecimiento de un solo paso del fago vB\_Pd\_PDCC-1.

### 7.1.5 Eficacia de plaqueo (EOP)

Las pruebas de eficacia de plaqueo del fago vB\_Pd\_PDCC-1 produjo una zona clara (calva) contra cinco de las doce especies de *Vibrio* probadas; sin embargo, el análisis de eficacia mostró una alta infección producida en *V. parahaemolyticus* CIBGEN-001, *V. campbellii* CIBGEN-002, *V. alginolyticus* CIBGEN-004 y *V. parahaemolyticus* MAI 86 B, mientras que con las otras cepas no se observó un efecto de lisis (Tabla 3).



**Tabla 3.** Rango de hospedero del fago vB\_Pd\_PDCC-1 contra 12 cepas de bacterias de *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus* y *P. damsela*. EOP se expresa como la fracción de la inefectividad de los fagos vs la inefectividad de los fagos vs la cepa huésped. Alta (EOP $\geq$  0.5), Moderada (EOP $\geq$ 0.1-<0.5) y Baja (EOP $\leq$  0.1).

Cepa	Nombre	Titulación (UFP/mL)	EOP		
			Alta	Moderada	Baja
CAIM 1910	<i>Photobacterium damsela</i> <i>subsp. damsela</i>	2.17E+08	1.00	-	-
CIBGEN-001	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.38E+09	6.38	-	-
CIBGEN-002	<i>Vibrio campbellii</i>	8.00E+08	3.69	-	-
CIBGEN-003	<i>Vibrio campbellii</i>	-	-	-	ND
CIBGEN-004	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.18E+09	5.46	-	-
CIBGEN-005	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	ND
CIBGEN-006	<i>Vibrio campbellii</i>	-	-	-	ND
CIBGEN-007	Presumptive <i>Vibrio</i>	-	-	-	ND
CIBGEN-008	Presumptive <i>Vibrio</i>	-	-	-	ND
CIBGEN-009	Presumptive <i>Vibrio</i>	-	-	-	ND
CIBGEN-010	Presumptive <i>Vibrio</i>	-	-	-	ND
MAI 86 B	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.17E+08	1.46	-	-

ND: No detectable

### 7.1.6 Ensayo de inhibición bacteriana

El fago vB\_Pd\_PDCC-1 inhibió el crecimiento de las bacterias seleccionadas después de la prueba de cultivo de 12 horas (Ver Tabla 4). Se obtuvieron altos porcentajes de inhibición para las cepas CIBGEN002 (87.79%  $\pm$  1.67%), seguido de CIBGEN006 con 75%  $\pm$  1.24, CIBGEN001 65.20%  $\pm$  1.56, CIBGEN007 47.02%  $\pm$  0.24, CAIM1910 32.80%  $\pm$  4.92, CIBGEN004 29.42%  $\pm$  1.59, CIBGEN005 24.42%  $\pm$  0.55, y MAI86B 1.29%  $\pm$  7.12. Las cepas CIBGEN008, CIBGEN003 y CIBGEN009 no mostraron un aumento en la densidad celular presentando un valor de inhibición de casi el 0 % durante 8 h seguido de un ligero aumento de 9 a 12 h.

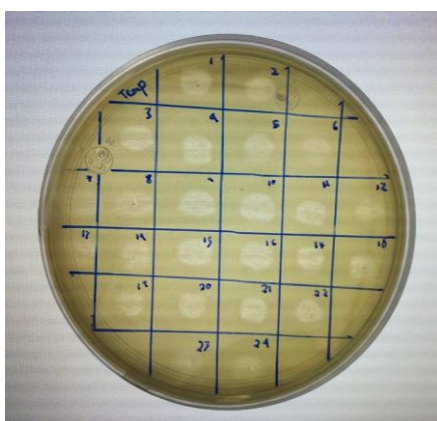
**Tabla 4.** Valores de inhibición de cepas de bacterias tratadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1.

Cepa	Nombre	Inhibición (%)	Desv Est
CAIM1910	<i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>damselae</i>	32.80	$\pm$ 4.92
CIBGEN001	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	65.20	$\pm$ 1.56
CIBGEN002	<i>Vibrio campbellii</i>	87.79	$\pm$ 1.67
CIBGEN003	<i>Vibrio campbellii</i>	0.00	$\pm$ 1.04
CIBGEN004	<i>Vibrio alginolyticus</i>	29.42	$\pm$ 1.59
CIBGEN005	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24.41	$\pm$ 0.55
CIBGEN006	<i>Vibrio campbellii</i>	75.00	$\pm$ 1.24
CIBGEN007	Presumptive <i>Vibrio</i>	47.02	$\pm$ 0.24
CIBGEN008	Presumptive <i>Vibrio</i>	3.18	$\pm$ 1.20
CIBGEN009	Presumptive <i>Vibrio</i>	0.00	$\pm$ 0.06
MAI86B	Presumptive <i>Vibrio</i>	51.29	$\pm$ 7.12

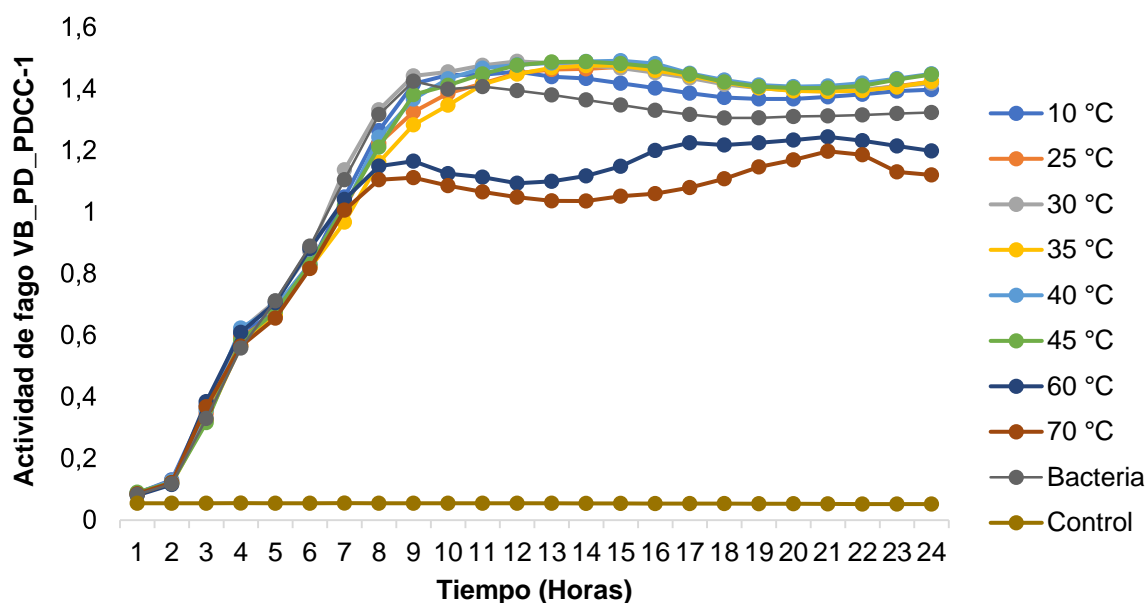
## 7.2 Caracterización fisicoquímica de bacteriófago activo

### 7.2.1 Efecto de la temperatura

Tras exponer las muestras del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 a las diferentes temperaturas se determinó el gradiente de temperatura óptima para la realización de la actividad lítica contra las bacterias; el método cualitativo mostró la formación de calvas en las temperaturas de 10°C, 25 °C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C y 55°C por lo que se muestra su efecto inhibitorio sobre la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Figura 10), mientras que en las temperaturas de 65°C y 70°C no se presenta calva. Asimismo, con el método cualitativo se midió la lisis bacteriana producido por la actividad del fago activo, el cual presentó diferencias significativas ( $F=126.95$ ,  $p<0.05$ ,  $df=9$ , 230) por el efecto de las diferentes temperaturas empleadas. El tratamiento que muestra la diferencia significativa es el control sin bacteriófagos al presentarse una nula actividad, así como en las temperaturas 60 y 70°C donde se observa una disminución en la actividad bacteriana, mientras que el efecto de lisis permanece constante es las temperaturas 10°C, 25 °C, 30°C, 35°C, 40°C y 45°C, presentando así una resistencia a temperaturas elevadas. La figura 11 muestra la tendencia de la actividad del fago vB\_Pd\_PDCC-1 donde el control no mostró ningún efecto de lisis, y el bacteriófago muestra una terapia pasiva en las diferentes temperaturas dado que no deja un incremento masivo de la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.



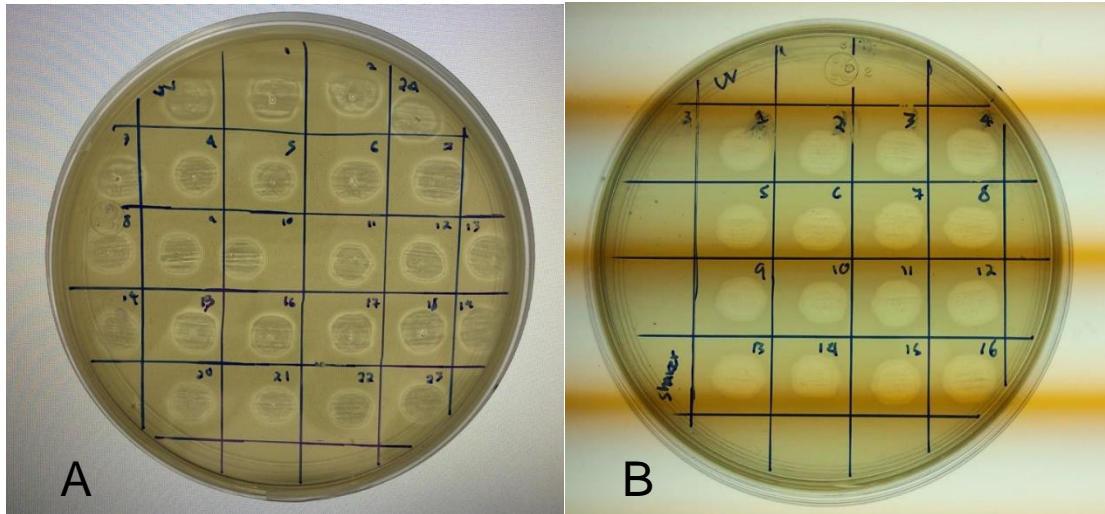
**Figura 10.** Calvas obtenidas en prueba de gota por cuadruplicado para cada temperatura utilizada. 10 °C (1-4), 25 °C (5-8), 30 °C (9-12), 35 °C (13-16), 40 °C (17-20) y 45 °C (21-24).



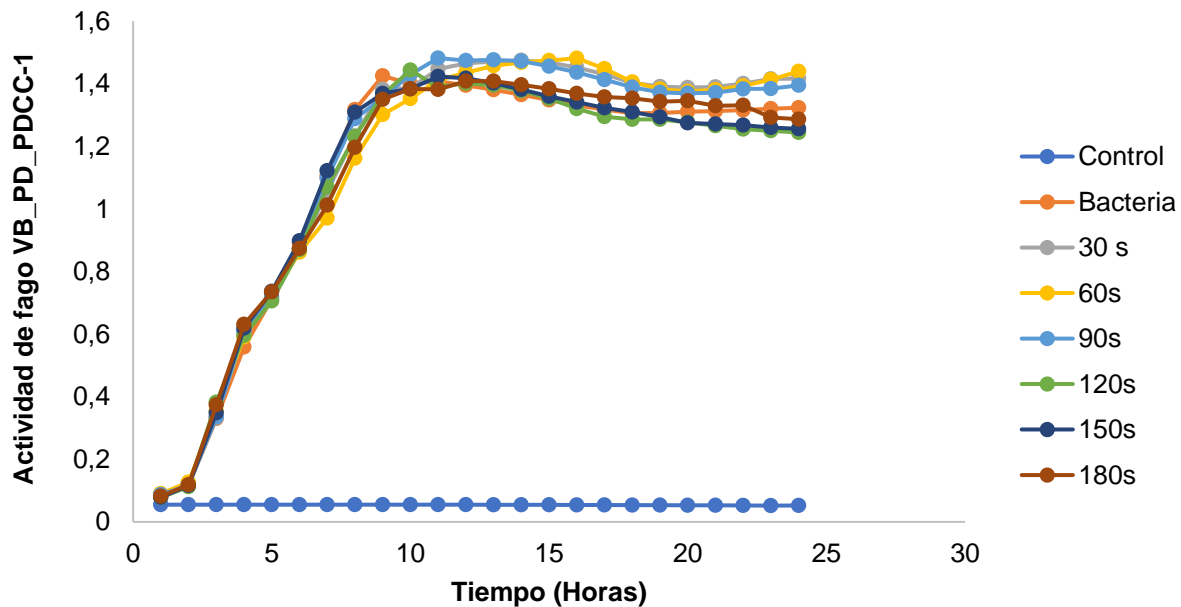
**Figura 11.** Actividad lítica del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre la bacteria *Photobacterium damselae subsp. damselae* tras exponerse a diferentes temperaturas. El grupo control sin bacteriófago presenta diferencia respecto a los demás tratamientos ( $F=126.95$ ,  $p<0.05$ ,  $df=9$ , 230).

### 7.2.2 Efecto de la exposición a UV

Tras someter el fago vB\_Pd\_PDCC-1 a exposición con luz ultravioleta (400 y 100 nm), se muestra que éstos presentan una alta resistencia al tiempo de exposición donde tras 30, 60, 90, 120, 150 y 180 segundos aún muestran efecto de inhibición, presentando la calva contra *Photobacterium damselae subsp. damselae* (Fig 10). A su vez la prueba cuantitativa de lisis bacteriana muestra una diferencia significativa hacia el grupo control sin bacteriófagos ( $F=21.391$ ,  $p<0.05$ ,  $df=7,184$ ) mientras que tras el paso de 180 segundos (3 minutos) se presenta aún el efecto sin perder la actividad del bacteriófago. Asimismo, se observa que el efecto de lisis se mantiene constante durante las 24 horas que duró el ensayo (Fig. 12).



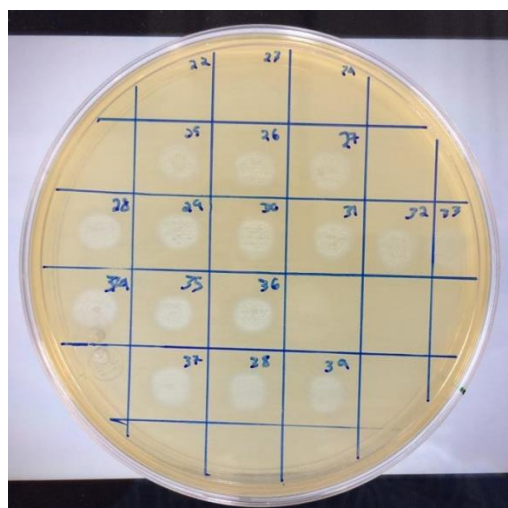
**Figura 12.** Calvas (n=4) para cada tiempo de exposición en UV. 5 segundos (A 1-4), 10 segundos (A 5-8), 15 segundos (A 9-12), 30 segundos (A 13-16), 60 segundos (A 17-20), 90 segundos (21-24), 120 segundos (B 1-4), 150 segundos (B 5-8) y 180 segundos (9-12).



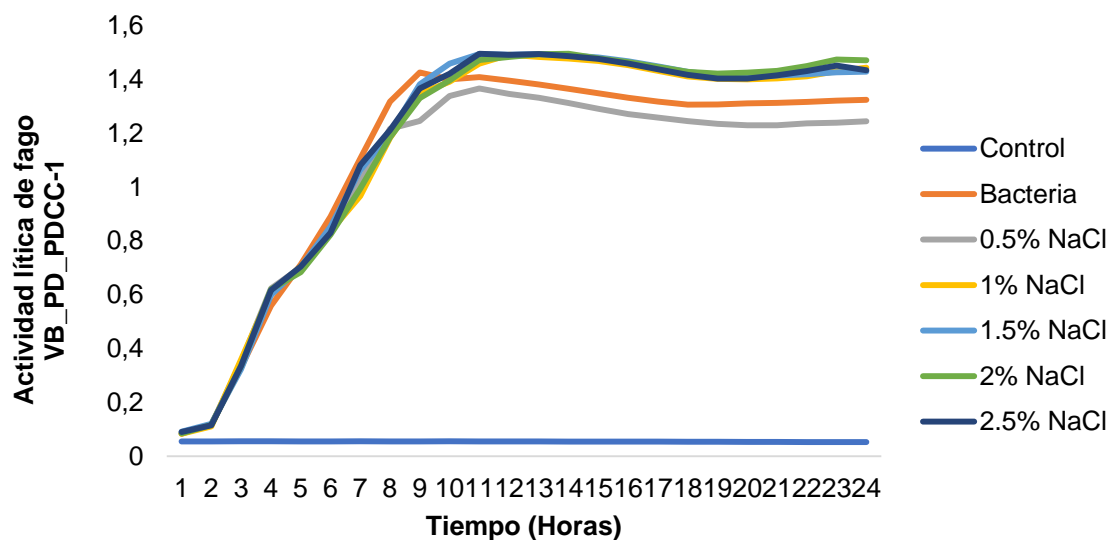
**Figura 13.** Actividad lítica del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* al exponerse a diferentes tiempos con UV. Los tratamientos en color están dados en segundos. El control sin bacteriófagos presenta diferencia al tener una actividad nula ( $F=21.391$ ,  $p<0.05$ ,  $df= 7,184$ ).

### 7.2.3 Efecto de la salinidad

De las diferentes concentraciones de salinidad evaluadas en el estudio, ninguna mostró efecto negativo sobre la actividad del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1, presentando la calva de inhibición bacterianas para los tratamientos de 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5% de salinidad (Fig. 14). Así mismo, para el método cualitativo de lisis sólo presenta diferencia significativa para el tratamiento sin bacteriófagos ( $F=24.241$ ,  $p<0.05$ ,  $df= 6, 161$ ) presentando así un efecto activo con las diferentes salinidades empleadas. Se observó que el efecto se eleva llegadas a las 9 horas del ensayo, y posteriormente mantiene constante a lo largo de las 24 horas de duración de la lisis bacteriana presentando un efecto pasivo en el control de la bacteria (Fig. 15).



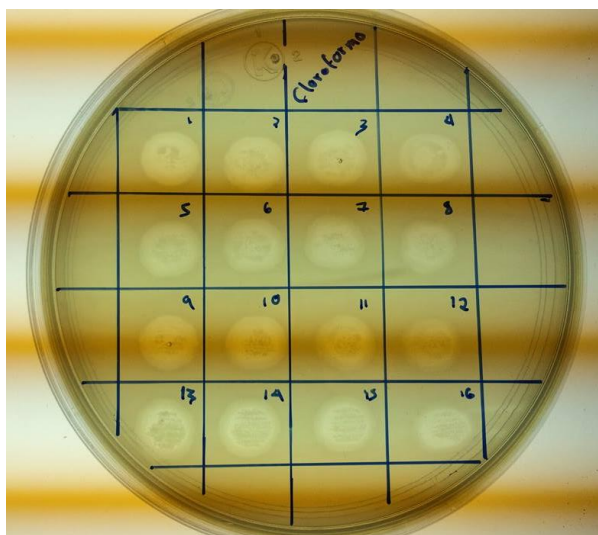
**Figura 14.** Calvas obtenidas en prueba de gota por triplicado para diferentes porcentajes de salinidad. 2.5% (25-27), 2.0 % (28-30), 1.5 % (31-33), 1 % (34-36) y 0.5 % (37-39).



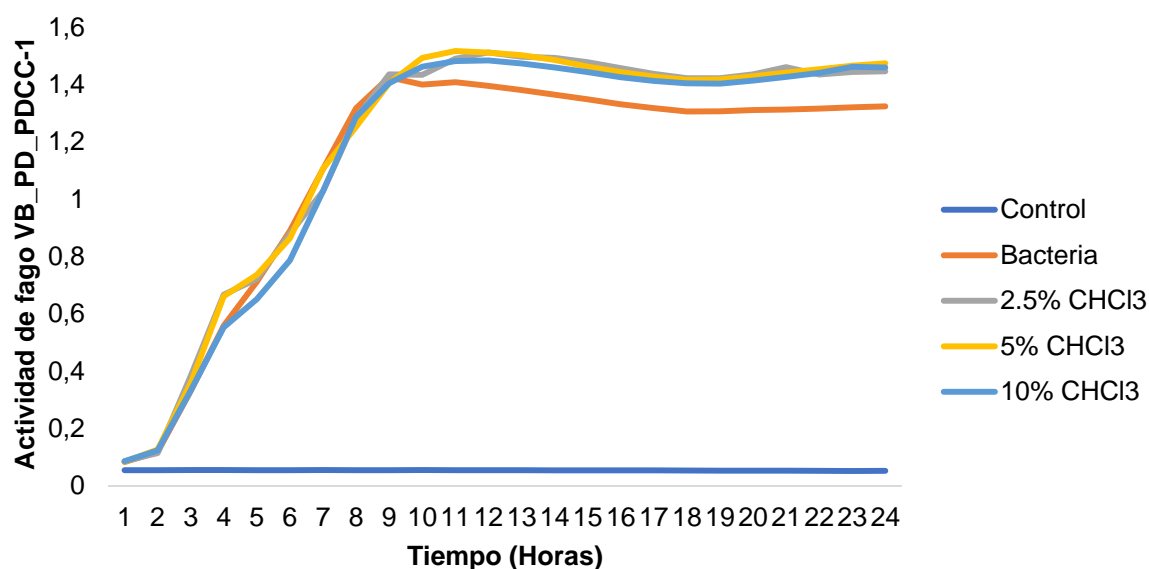
**Figura 15.** Actividad lítica del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 sometido a diferentes porcentajes de salinidad con una duración de 24 horas. Control sin bacteriófago presenta diferencias a los demás tratamientos empleados ( $F=24.241$ ,  $p<0.05$ ,  $df= 6, 161$ ).

#### 7.2.4 Efecto de la exposición al cloroformo

De los diferentes tratamientos sometidos a la exposición de cloroformo (2.5, 5 y 10% de  $\text{CHCl}_3$ ) todas presentaron efecto inhibitorio mostrando la calva en la placa contra *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*. A su vez los efectos en la parte de actividad lítica se observaron de manera positiva al sólo presentar diferencia significativa con el tratamiento sin bacteriófago ( $F=36.29$ ,  $p<0.05$ ,  $df= 4, 155$ ), por lo que el bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 mostró una gran resistencia a la exposición del cloroformo por 24 horas. A su vez se observa la tendencia de la actividad en el transcurso de las 24 horas de lisis (Fig. 17).



**Figura 16.** Calvas de lisis del bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 contra *P. damselae*. El bacteriófago se sometió a diferentes porcentajes de cloroformo con una duración de 24 horas. Los resultados se muestran por cuadruplicado; 10 % (1-4), 5 % (5-8), 2.5 % (9-12) y 1.25 % (13-16).



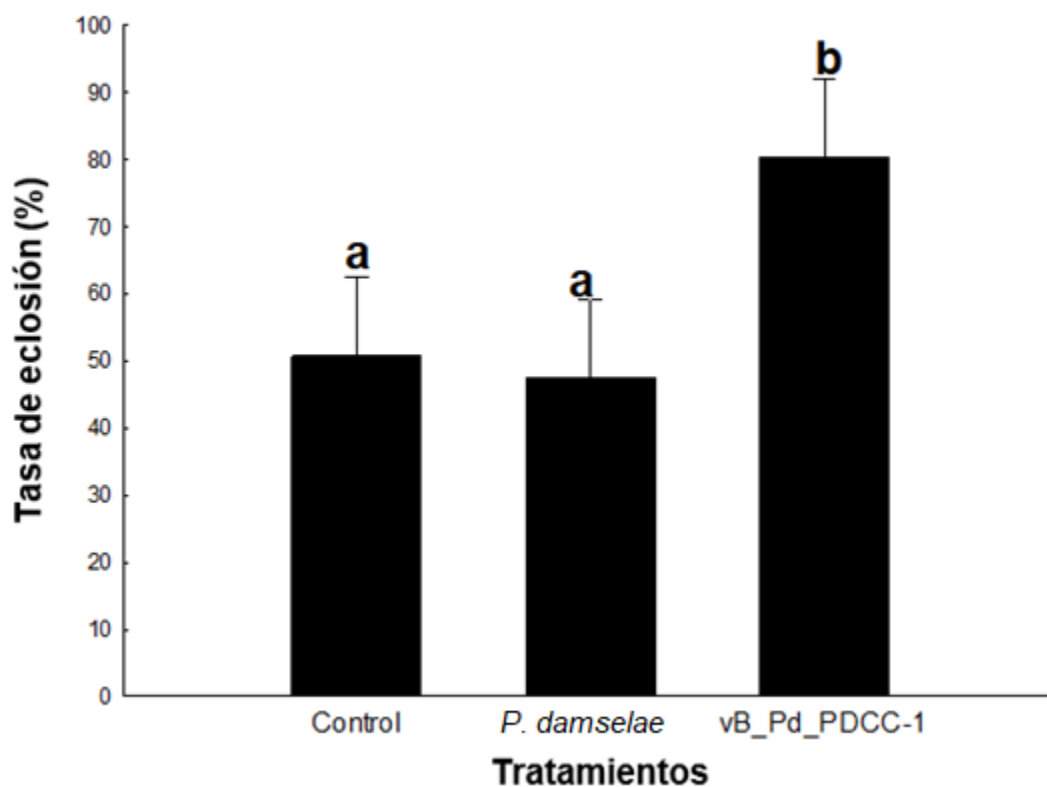
**Figura 17.** Actividad lítica de bacteriófago tras su exposición a cloroformo. Se muestran los diferentes tiempos utilizados, donde el control sin bacteriófagos presenta diferencias a los demás tratamientos ( $F=36.29$ ,  $p<0.05$ ,  $df= 4, 155$ ).

### 7.3 Efectos del fago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre la eclosión de huevos retados con *P. damselae* subs. *damselae*

El efecto de la terapia con fagos mostró diferencias significativas en qué la tasa de eclosión entre el grupo tratado y el grupo control durante el ensayo de reto contra *P. damselae* subs.



*damselae* (Figura 18). Los controles no tratados con fagos que fueron infectados con *P. damselae* subs. *damselae* resultaron con una tasa de eclosión del 50 %, mientras que los grupos tratados con fago vB\_Pd\_PDCC-1 aumentaron significativamente su tasa de eclosión ( $p < 0.05$ ) con valores del 80 % de eclosión (Figura 18).



**Figura 18.** Eclosión de huevos expuestos a *P. damselae* con diferentes tratamientos. Los controles se incluyen como blancos. Los datos representan la media y la desviación estandar de los grupos independientemente. Diferencias significativas expresadas  $p < 0.05$  (b).

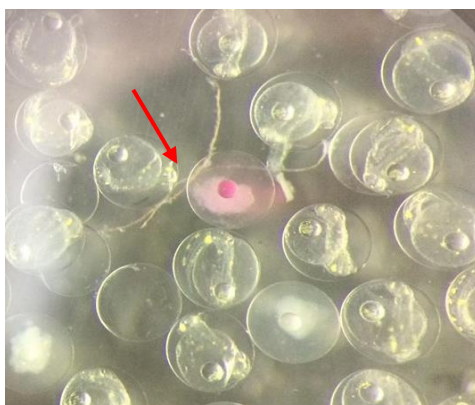
## 7.4 Efectos del fago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre eclosión de huevos de *S. rivoliana* con y sin tratamiento de desinfección

### 7.4.1 Porcentaje de eclosión

La tasa de eclosión no presentó diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los grupos tratados con o sin fago vB\_Pd\_PDCC-1; sin embargo, se observó mayor porcentaje en los huevos tratados con el fago (Figura 20). La tasa de eclosión acumulada en los tratamientos desinfectados con yodo demostró que el grupo tratado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 era del 75 %, mientras que el grupo control tenía un 71 %.

La tasa de eclosión en los tratamientos no desinfectados también demostró que el grupo con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 presentó un 85 %, mientras que el grupo control tuvo un 81 % (Figura 20). Durante el experimento se observó que una dosis única de fago vB\_Pd\_PDCC-1 aplicada en el tanque de cultivo fue suficiente para controlar las presuntas especies de *Vibrio* durante la eclosión de los huevos de *Seriola rivoliana*, independientemente del tratamiento recibido (desinfectado o no desinfectado).

La aplicación del fago vB\_Pd\_PDCC-1 fue efectiva para controlar la eclosión (i. e. la tasa de eclosión y la reducción del tiempo para eclosión). En los grupos control, tanto desinfectado como no desinfectado, algunos huevos sin eclosionar presentaron una pigmentación rosada (Fig. 19). Con la administración de los fagos se produjo un mayor porcentaje de eclosión en huevos de *S. rivoliana*. Se observó un 95 % de eclosión a las 24 horas con respecto al control, y se obtuvo una mejor tasa de eclosión a las 36 horas con un 89 % de eclosión donde el tratamiento con vB\_Pd\_PDCC-1 se observaban larvas eclosionadas en el tanque de cultivo, mientras que los demás tratamientos seguían sin eclosionar (Figura 21 y 22).

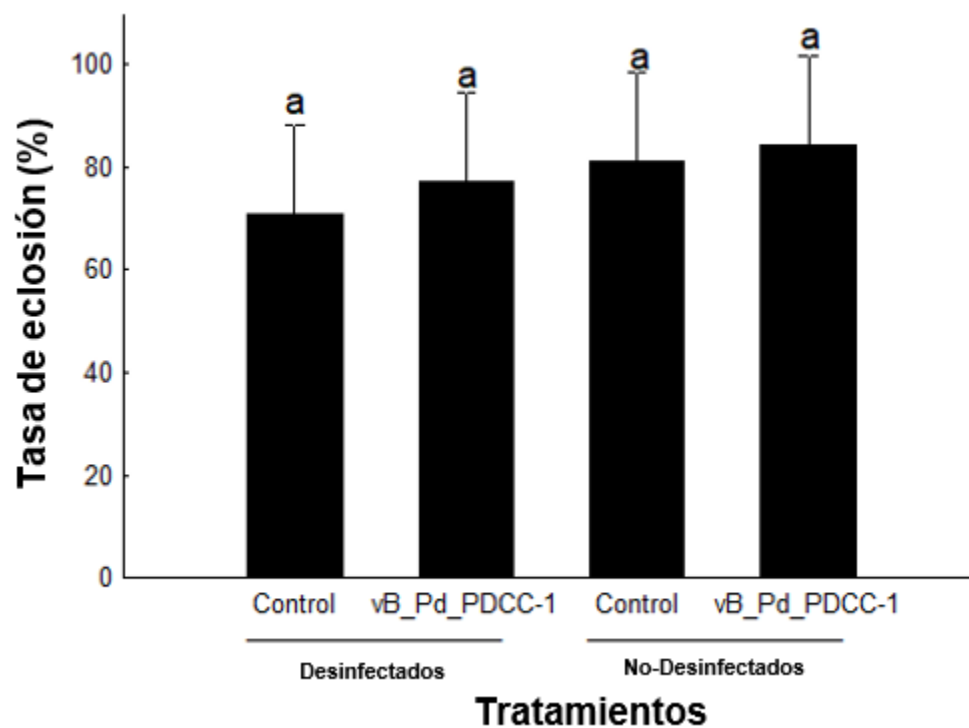


**Figura 19.** Huevos de *S. rivoliana* control, no tratados con bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 La flecha indica alguna coloración rosa en el embrión del pez.

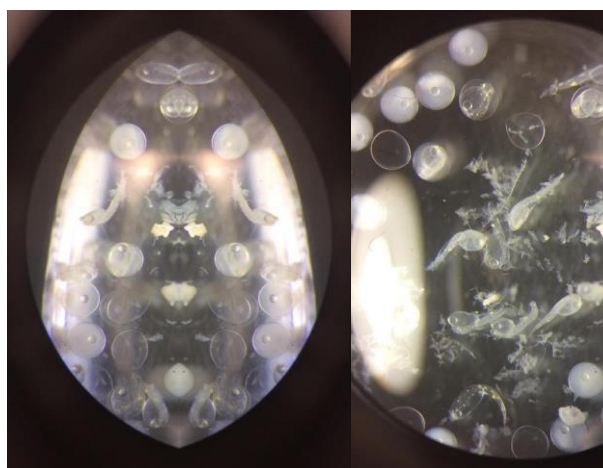
**Tabla 5.** Abundancia de especies presuntivas de *Vibrio* a 24 horas post tratamiento con fago vB\_Pd\_PDCC-1.

Tratamiento	Abundancia de <i>Vibrio</i> spp. (UFC mL <sup>-1</sup> )	
	Huevos desinfectados	Huevos no desinfectados
Control	$1.21 \times 10^3$	$1.1 \times 10^5$
vB_Pd_PDCC-1	ND	ND

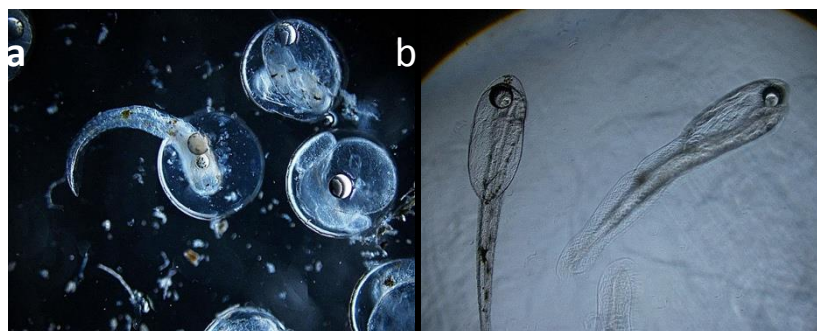
\* ND, No detectable.



**Figura 20.** Porcentajes de eclosión por tratamientos de huevos. No desinfectados Control (DC); Desinfectados con bacteriófago 1 (DF1); Desinfectados con bacteriófago 2 (DF2); No Desinfectados Control (NDC); No desinfectados con bacteriófago 1 (NDF1); No desinfectados con bacteriófago 2 (NDF2).



**Figura 21.** A) Huevos de jurel control. B) Larvas de jurel con tratamiento de bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1. Se observa una larva de mayor tamaño y con una mejor movilidad que las que no presentaron fagos.



**Figura 22.** Diferentes estadios de los embriones de *S. rivoliana*: (a) huevos sin fagos en el estadio de miotomas a las 24 h, con melanóforos en el saco vitelino y corazón latiendo, (b) larvas recién eclosionadas con bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1vBa las 24 h.

#### 7.4.2 Permanencia de bacteriófagos en huevos

Para el análisis de la permanencia del fago vB\_Pd\_PDCC-1 por medio de la prueba de gota, se observó el efecto inhibitorio y la aparición de calva en todas las muestras tratadas con fago vB\_Pd\_PDCC-1. Por lo que tanto en agua de cultivo, así como en los organismos tanto en huevo como larva se encontró la presencia del fago, aún transcurridas las 24 horas.

#### 7.4.3 Análisis microbiológicos de huevos de jurel

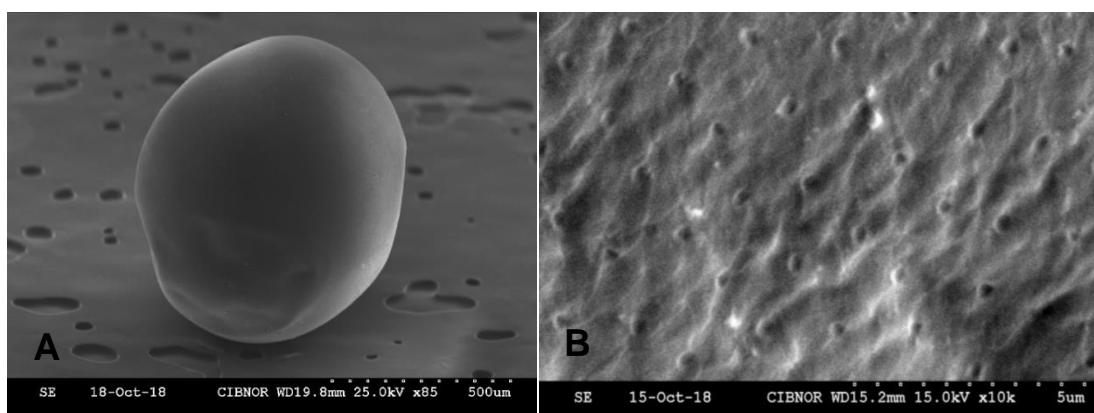
Los análisis microbiológicos en huevos de jurel mostraron la mayor concentración de bacterias en el grupo desinfectado donde se pudo observar la mayor concentración de *Vibrio* spp en el tratamiento de vB\_Pd\_PDCC-1 en el tiempo 2 (12 horas) alcanzando un UFC de  $3.02 \times 10^{12}$  bacterias por mL siendo inclusive más alto que el grupo no desinfectado. A pesar de que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 logró contener la mayor carga bacteriana para el tiempo 4 (24 horas) se observa un UFC de *Vibrios* no detectable por lo que las bacterias se vieron inhibidas totalmente.

Para el caso de los tratamientos control para ambos grupos (desinfectado y no desinfectado) se observó una mayor carga de *Vibrio* pasadas las 24 en contraste con los demás tratamientos donde se implementó el uso del fago, siendo así que vB\_Pd\_PDCC-1 presenta en todos los casos una reducción de UFC para *Vibrios* llegando inclusive a una concentración no detectable.

Las eclosiones registradas en los tratados con  $2 \times 10^8$  UFP·mL<sup>-1</sup> no fueron estadísticamente diferentes entre ellos o en comparación con los controles ( $p > 0.05$ ). En este caso observamos que una dosis única de vB\_Pd\_PDCC-1, aplicada en el momento inicial de la eclosión, fue suficiente para controlar la carga bacteriana de especies presuntas de *Vibrio* durante la incubación de los huevos de *S. rivoliana*. De hecho, los huevos tratados con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 eliminaron el efecto de las especies de *Vibrio* u otras bacterias patógenas durante la eclosión de *S. rivoliana*.

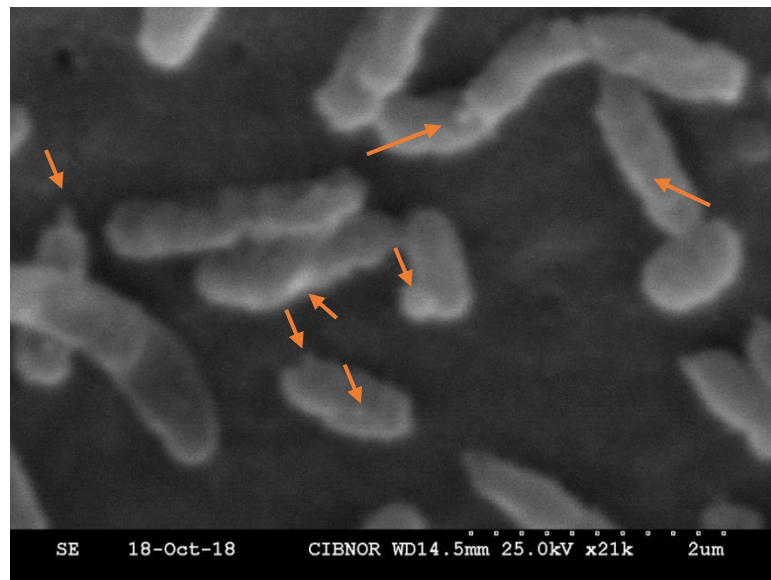
### 7.5 Microscopía electrónica de barrido

Las fotografías tomadas con ayuda de la microscopía electrónica de barrido de los huevos de Jurel *S. rivoliana* muestran una serie de poros que recubren la superficie del huevo. Estos poros se presentan como una cavidad que conecta la parte externa y se extiende hasta la capa interna del huevo (Fig. 25). El tamaño de los poros fue de 250 nanómetros aproximadamente en comparación con el del fago vB\_Pd\_PDCC-1 que es de 100 x 120 nanómetros aproximadamente, por lo que la entrada de éste al interior del huevo es factible. A su vez, el análisis de microscopía por este medio indica que las bacterias presentes que recubren la superficie del huevo muestran un tamaño de 1,193 nanómetros de ancho por 324 nanómetros de largo, por lo que éstas no pueden penetrar al huevo antes de la eclosión; sin embargo, éstas recubren la superficie a lo largo de todo el huevo.

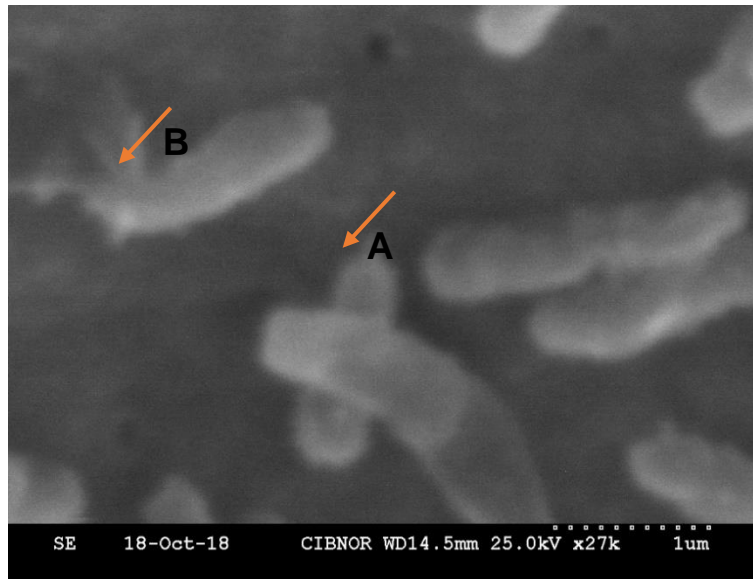


**Figura 23.** A) Huevo de Jurel *S. rivoliana* a 85X. B) Superficie porosa del huevo de jurel. Fotografía tomada con un aumento de 10,000X.

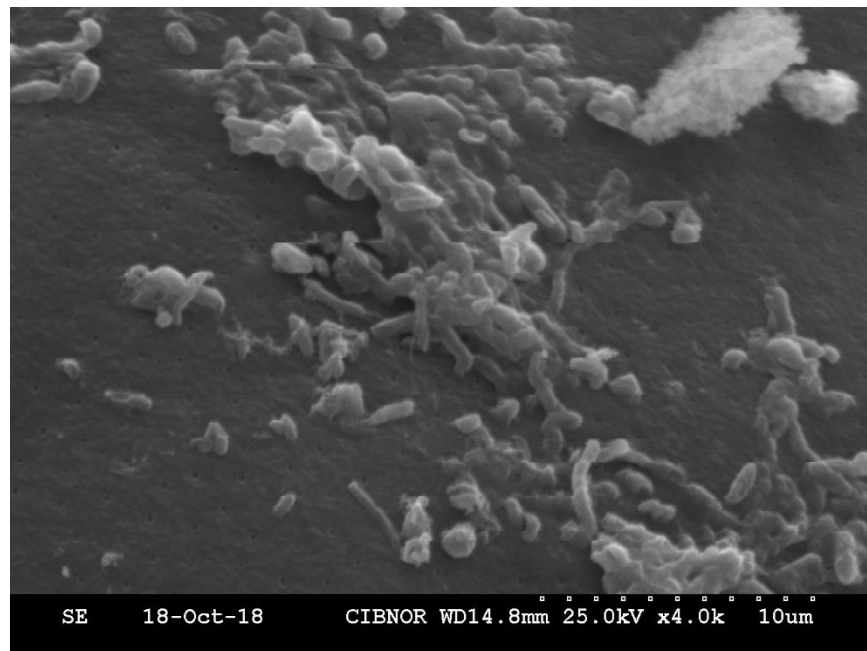
Simultáneamente se observa que los tratamientos que presentan el bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 presentan una reducción de bacterias en la superficie del huevo o inclusive una eliminación total de éstas. Réplicas de vB\_Pd\_PDCC-1 se presentan en la fotografía como cuerpos diferentes de color blanco recubriendo las bacterias adheridas en la superficie del huevo; se observa cómo el bacteriófago causa daño en éstas (Fig. 24). Asimismo, en los huevos tratados con fagos, se puede apreciar el efecto de lisis sobre la bacteria donde se muestra con su membrana celular abierta debido al estallido producido (Fig. 25B), dando lugar a la replicación de más bacteriófagos. Sin embargo, en las muestras de huevos sin la presencia de fagos (Fig. 26) se observan las colonias de bacterias de manera completas y saludables al no presentar el daño por parte de los bacteriófagos. Las bacterias se observaron a lo largo de la superficie del huevo.



**Figura 24.** Bacterias recubiertas por bacteriófagos. Las bacterias se muestran con daños en su estructura debido a la lisis provocada. (Flechas indican bacteriófagos).



**Figura 25.** Bacterias recubiertas con bacteriófagos. A) Bacteriófago en superficie de bacteria; B) Bacteria lisada por bacteriófago; estallido de la bacteria



**Figura 26.** Huevo de jurel *S. rivoliana*. Tratamiento control sin bacteriófago. Se muestran bacterias recubriendo la superficie del huevo.

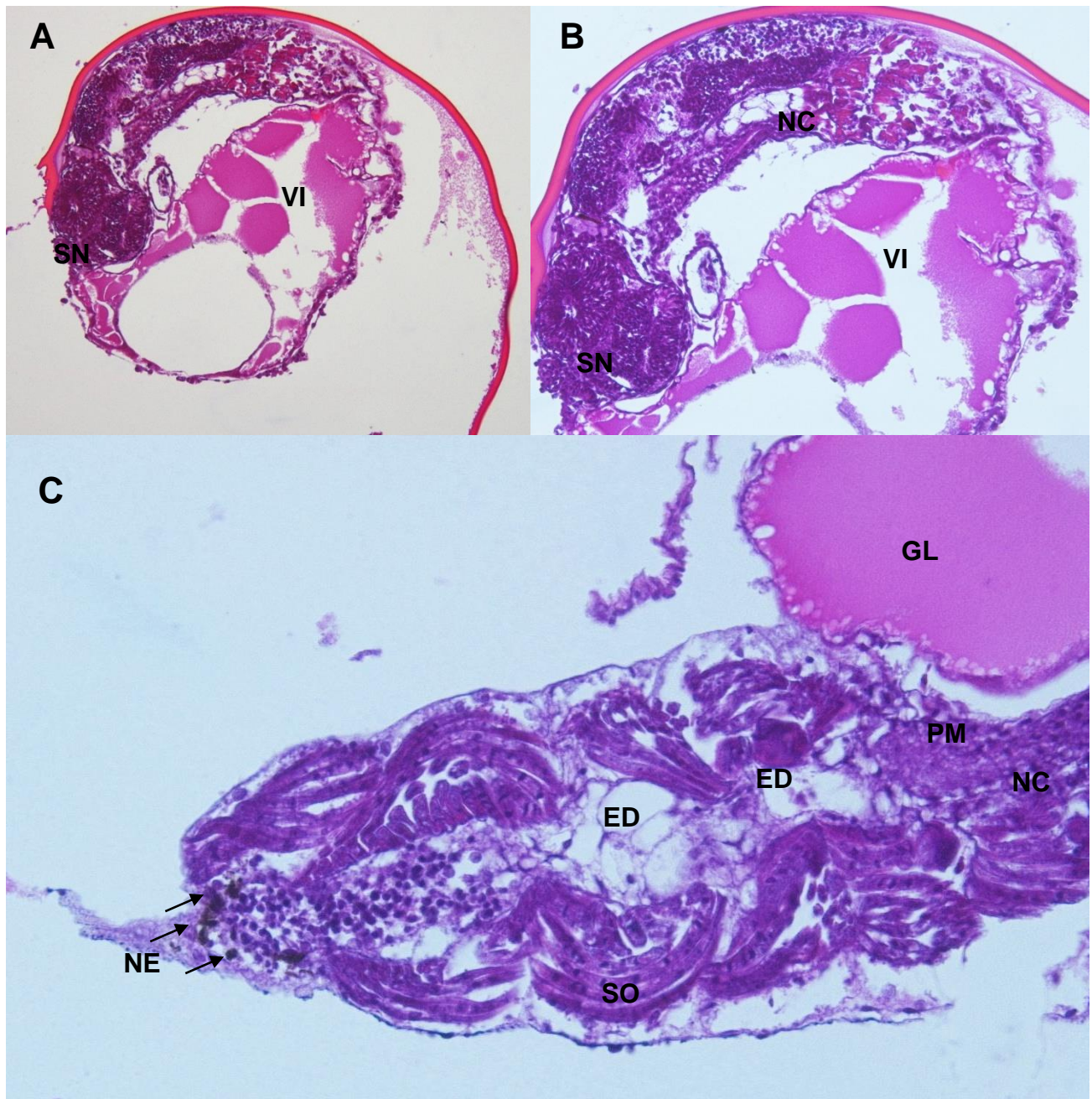


## 7.6 Análisis histológico

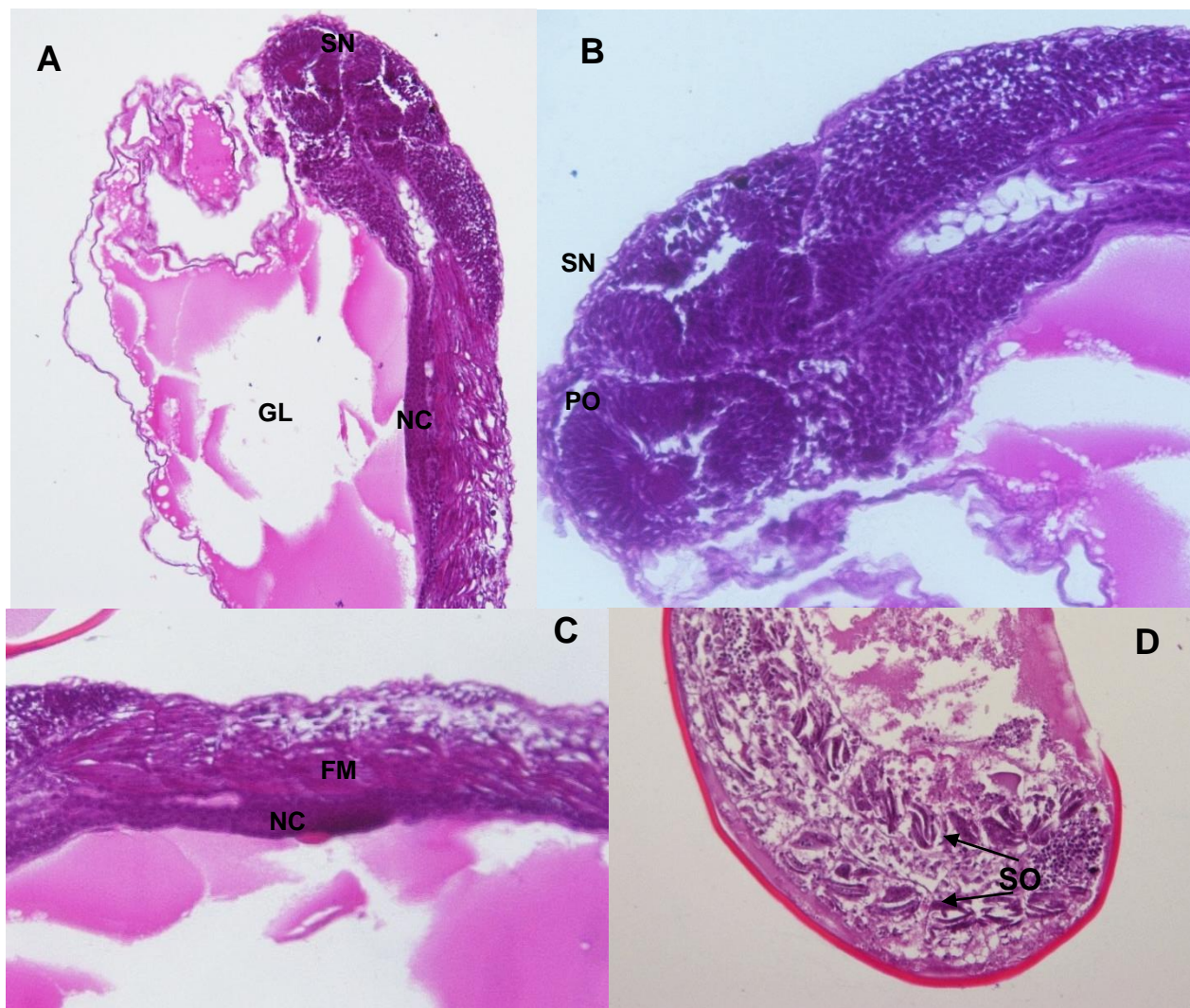
Los análisis histológicos mostraron en las larvas con 24 horas posteriores a la eclosión, un avance en el desarrollo de sus estructuras, encontrándose en etapa de somatogénesis. Se puede observar el desarrollo de un sistema nervioso distinguiéndose el telencéfalo y la notocorda. El sistema digestivo aún no se percibe debido al tiempo de desarrollo. En comparación entre los diferentes tratamientos se aprecia un proceso celular diferente en los grupos control comparado con los grupos donde se utilizaron bacteriófagos como tratamiento.

En los tratamientos control desinfectado, así como no desinfectado, se mostraron irregularidades en el proceso de separación de vitelo, dando lugar a una fragmentación vitelina (Fig. 27 B). En el caso de la división del sistema nervioso no se percibe un desarrollo al punto de distinguirse el telencéfalo, así como la notocorda. En la larva se aprecian espacios con daño en forma de edemas y se observan secciones con daño celular, así como necrosis (puntos negros Fig. 27 C). Para el caso de la gota lipídica no se formó su espacio debido a que no se observó una división en el vitelo, dando en su lugar la formación de burbujas que impiden un desarrollo adecuado.

En el caso de los tratamientos donde se empleó el bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1se observó un mejor desarrollo en la larva, teniendo una mejor formación en el sistema nervioso, presentando una mejor segmentación entre sus diferentes áreas (Fig. 29 A y B). A su vez se pudo apreciar el primordio del ojo a diferencia de los tratamientos sin bacteriófagos y la formación y separación de paquetes musculares de manera ordenada, presentando una forma completa durante su somatogénesis (Fig. 29 B). Se observaron fibras musculares y sobre todo una segmentación en somitas donde no se encuentran dañadas a diferencias del tratamiento control.



**Figura 27.** Corte longitudinal de larva de jurel. Tratamiento control sin bacteriófagos que presentan daño a nivel celular. A) Desarrollo sistema nervioso incompleto a 10X; B) 20X. C) Daño en somitas (SO) y paquetes musculares (PM); se aprecian edemas (ED) en el tejido, así como daño por necrosis (NE). Sistema nervioso (SN), Notocorda: NC, Vitelo: VI, Gota lipídica (GL).



**Figura 28.** Cortes longitudinales de larvas de jurel 24 horas después de eclosión expuesta a bacteriófago vB\_PdPDCC-1. A) Se observa formación del sistema nervioso (SN) seccionado, así como su respectiva notocorda (NC) (20X). Separación de vitelo para formación de gota lipídica (GL). B) Se percibe la formación de sistema nervioso (40X) y destaca el primordio de ojo (PO). C) Fibras musculares íntegras. D) Segmentación de somitas (SO).

### 7.7. Composición en la comunidad bacteriana

Después del recorte de calidad y el filtrado, el tamaño de la biblioteca de cada muestra se normalizó al número más pequeño de secuencias obtenidas de las muestras de huevos de *S. rivoliana* (8, 401 secuencias) para minimizar cualquier sesgo debido a la diferencia en el número total de las secuencias. En términos generales, el número de OTU fue mayor en los huevos

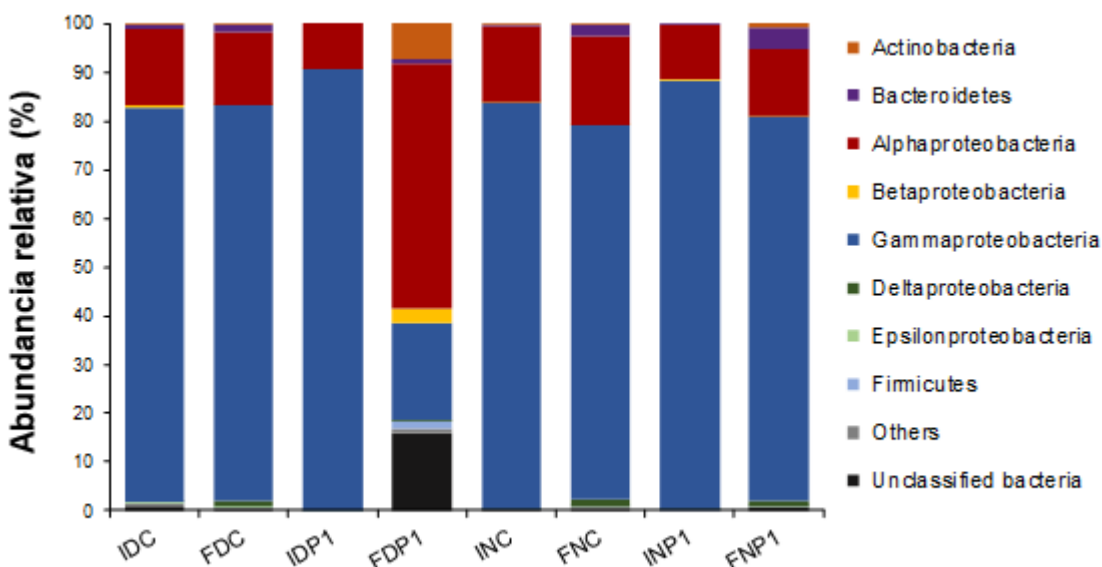
desinfectados con yodo (FDP1) y no desinfectados (FNP1) con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (283 a 508 OTU) (Tabla 6). A pesar de que el índice de diversidad de Shannon y los estimadores de riqueza de Chao demostraron que los huevos desinfectados (FDP1) y no desinfectados con fagos vB\_Pd\_PDCC-1 (FNP1) presentan una mayor diversidad y riqueza bacteriana al final del período experimental, a diferencia de las muestras recolectadas en el período inicial (IDP1 y INP1), no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos con y sin fagos al final del período experimental.

La caracterización taxonómica general de la comunidad bacteriana se realizó a nivel de phylum, y solo las *Proteobacterias* se clasificaron a nivel de clase (Figura 30). En todas las muestras de huevos, el phylum más frecuente fue *Proteobacteria*, principalmente representado por miembros que pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*. Los miembros que pertenecían a la clase *Alphaproteobacteria* solo prevalecían en muestras de huevos desinfectados con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 al final del período experimental. Además, los miembros que pertenecen al phylum *Bacteroidetes* aumentaron su abundancia al final del período experimental, independientemente del tratamiento recibido. Al final del período experimental, las familias más abundantes fueron *Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Vibrionaceae*, independientemente del tratamiento recibido (Figura 31). Solo la familia *Sphingomonadaceae* prevaleció en muestras de huevo desinfectadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1.

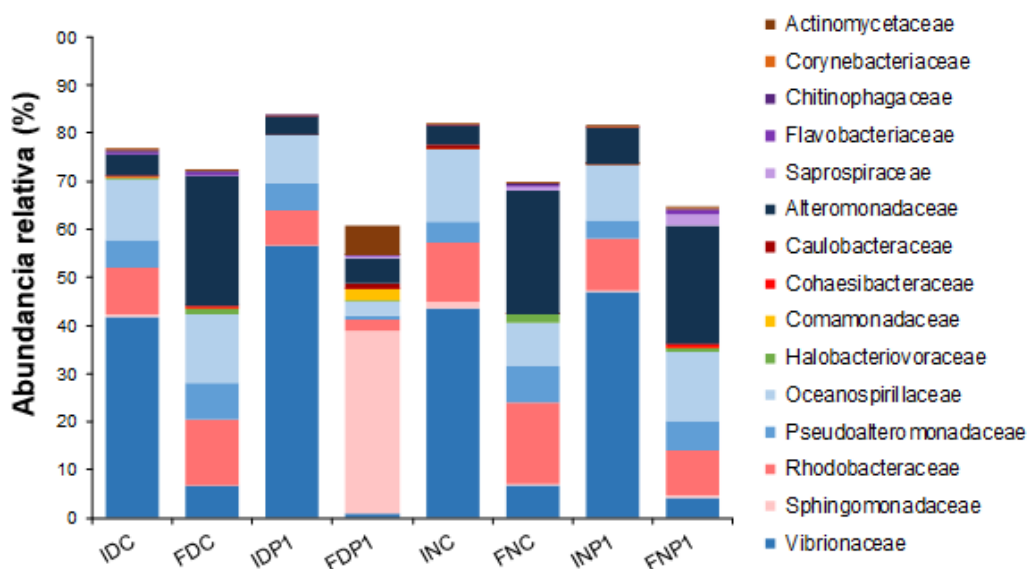
**Tabla 6.** Diversidad y riqueza bacteriana en huevos de *S. rivoliiana*

Grupo*	No. de lecturas	No. total de OTUs	Índice de diversidad de Shannon	Estimador de riqueza de Chao1
IDC	8,401	432	3.36	976.77
FDC	8,401	452	3.61	1133.94
IDP1	8,401	283	2.89	750.99
FDP1	8,401	508	3.22	1193.40
INC	8,401	388	3.13	879.60
FNC	8,401	435	3.58	1110.04
INP1	8,401	343	2.99	885.66
FNP1	8,401	474	3.87	1169.16

\* Muestras de control desinfectadas (IDC) y no desinfectadas (INC) del período inicial; muestras desinfectado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (IDP1), no desinfectado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (INP1) del período inicial; muestras de control desinfectadas (FDC) y no desinfectadas (FNC) del período final; muestras desinfectado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (FDP1), no desinfectado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (FNP1) del período final.



**Figura 29.** Abundancia relativa de linajes bacterianos dominantes (Phylum *Protobacteria* dividido a nivel taxonómico de Clase) que se encuentran en las muestras de huevos de *S. rivoliana* tratadas con o sin fagos.

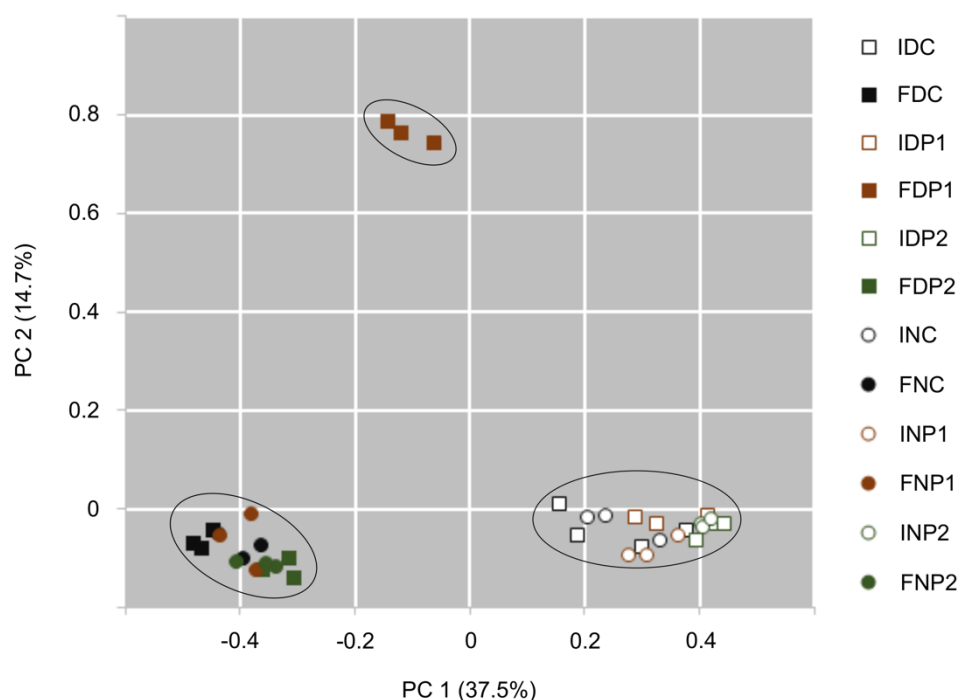


**Figura 30.** Abundancia relativa de familias dominantes encontradas en las muestras de huevos de *S. rivoliana* tratados con y sin fagos.

### 7.8 Estructura de la comunidad bacteriana

Los efectos del tratamiento con fagos sobre la estructura de la comunidad bacteriana en los huevos de *S. rivoliana* se determinaron con una matriz de distancia utilizando la medida de Yue

& Clayton y se visualizaron utilizando gráficos de PCoA (Figura 32). Aunque los resultados revelaron una clara separación entre los tratamientos al inicio y hasta el final del período experimental, solo hubo diferencias en la estructura de la comunidad entre el control y los desinfectados con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (FDP1) al final del período experimental. Estas observaciones se validaron adicionalmente mediante pruebas de AMOVA, según lo implementado por MOTHUR, que reveló que las muestras de huevos desinfectadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (FDP1) fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).



**Figura 31.** Estructuras de la comunidad bacteriana de muestras de huevos de *S. rivoliana* tratadas con y sin fagos. Los diagramas de PCoA se basan en la medida de disimilitud de Yue y Clayton. Las elipses representan los intervalos de confianza del 95%. Los ejes primero y segundo representan el 37.5% y el 14.7% de la variación, respectivamente.

## 7.9 Bioensayo de desarrollo larvario de jurel *Seriola rivoliana*

### 7.9.1 Crecimiento y desarrollo de larvas de jurel *S. rivoliana*

Los análisis mostraron que la longitud larvaria al momento de la eclosión fue de  $1.77 \pm 0.10$  mm en el grupo control, y una longitud de  $1.87 \pm 0.04$  mm en el grupo tratado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1. A los 12 DDE, las longitudes mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre

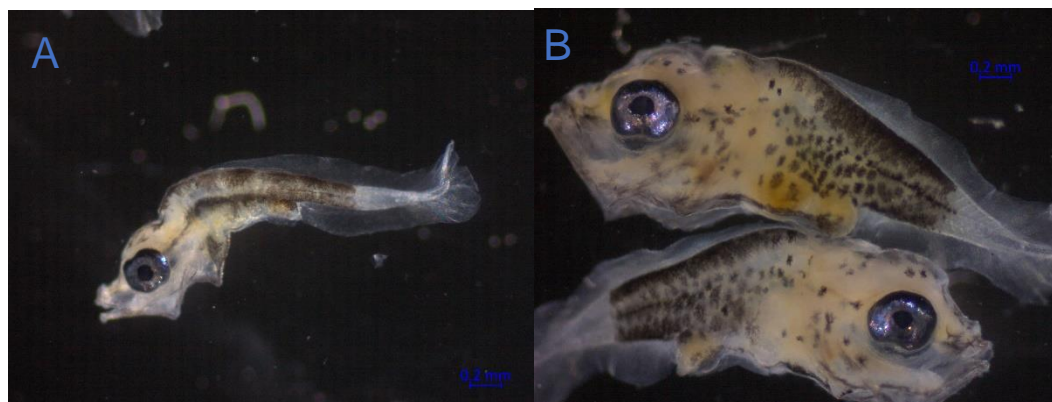
el grupo control ( $2.67 \pm 0.37$  mm) y el grupo tratado ( $3.63 \pm 0.03$  mm) (Fig. 33). Además, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) tanto en AGR como en SGR, que mostraron un aumento de  $0.08$  mm día<sup>-1</sup> (control) y  $0.15$  mm día<sup>-1</sup> (fago) en los grupos, con una tasa de  $3.42\%$  y  $5.52\%$  día<sup>-1</sup>, respectivamente. A su vez en los organismos tratados con vB\_Pd\_PDCC-1 se aprecia un mejor desarrollo en la larva que se puede reflejar en el ancho de la larva, la pigmentación de su tegumento, aparición temprana de escamas y un mayor diámetro de ojos (Fig. 33).

El desarrollo larvario mostró un crecimiento exponencial ( $r^2 = 0.86$ ). También se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el diámetro del ojo de las larvas de *S. rovoliana* a los 3 DDE, cuando la pigmentación del ojo era evidente, cuyos resultados mostraron una medición inicial de  $0.18 \pm 0.03$  y  $0.21 \pm 0.02$  mm en los grupos de control y tratados con fagos respectivamente. Asimismo, se registró un diámetro de  $0.33 \pm 0.02$  y  $0.46 \pm 0.01$  mm en los grupos de control y tratados, respectivamente, a los 12 DDE. Las mediciones oculares también siguieron un crecimiento exponencial ( $r^2 = 0.91$ ). Además, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la apertura de la boca del pez, cuyos resultados revelaron una longitud de  $0.31 \pm 0.06$  y  $0.40 \pm 0.08$  mm en los grupos control y tratado, respectivamente. Después de 24 h de alimentación, no se observó *Artemia* en el tracto digestivo del grupo control, mientras que el grupo tratado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 mostró una media de *Artemia* asimilada de  $2.54 \pm 0.94$  (Fig. 34).

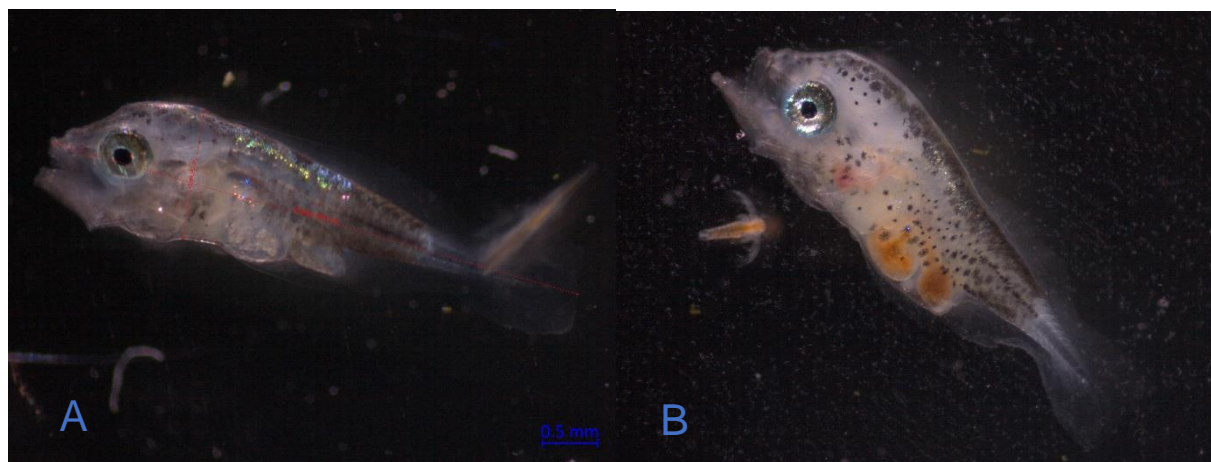
La tasa de eclosión fue de  $75.85 \pm 0.2\%$  para el grupo de control, mientras que se encontró  $90 \pm 0.11\%$  en el grupo tratado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1. La supervivencia de las larvas fue de  $77.34 \pm 0.19$  y  $84.91 \pm 0.11\%$  en los grupos de control y tratados a los 2 DDE, respectivamente.

Además, se observó una tasa de supervivencia de  $67.22 \pm 4.88$  y  $73.95 \pm 1.24\%$  en los grupos control y tratado respectivamente a los 5 DDE, mientras que se registraron valores de  $0.8 \pm 0.01$  y  $1.8 \pm 0.15\%$  a los 12 DDE, respectivamente, cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).





**Figura 32.** Larvas con 12 días post eclosión. A) Larva deforme en grupo control. B) Larva con tratamiento con bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1.

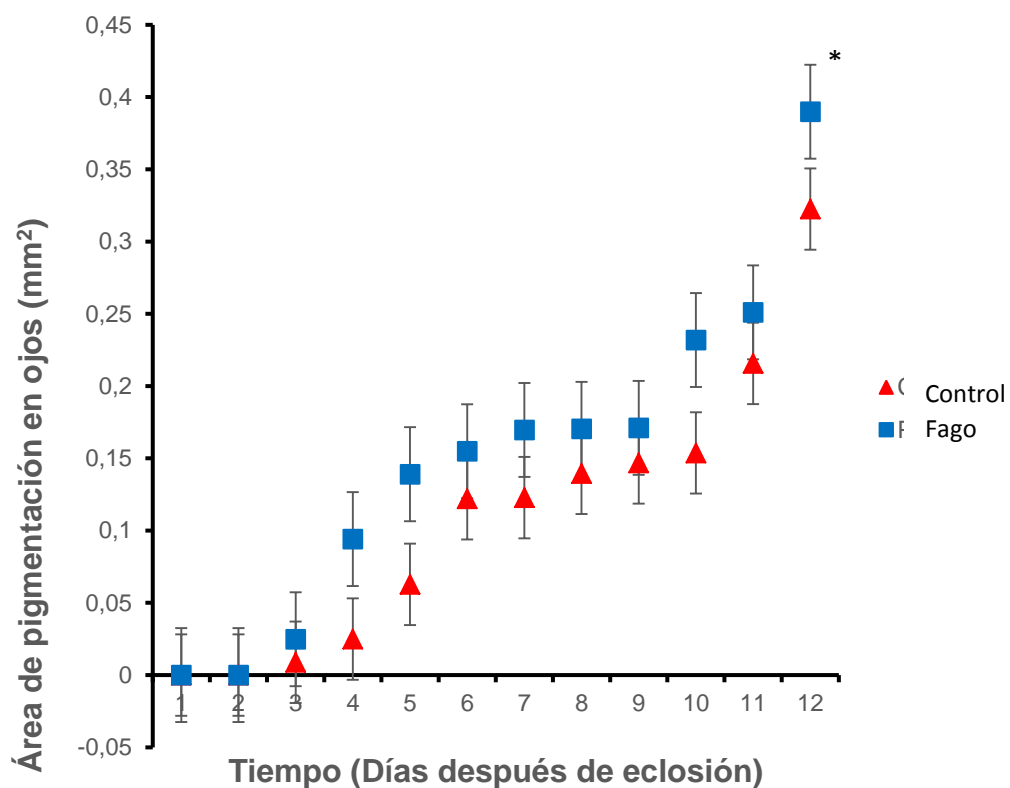


**Figura 33.** Larvas de *S. rivoliana* a los 12 DDE: a) larvas control, y b) larvas tratadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1, que mostraron una mejor pigmentación en su cuerpo, así como la ingesta de *Artemia* (naranja). La línea representa 0.5 mm.

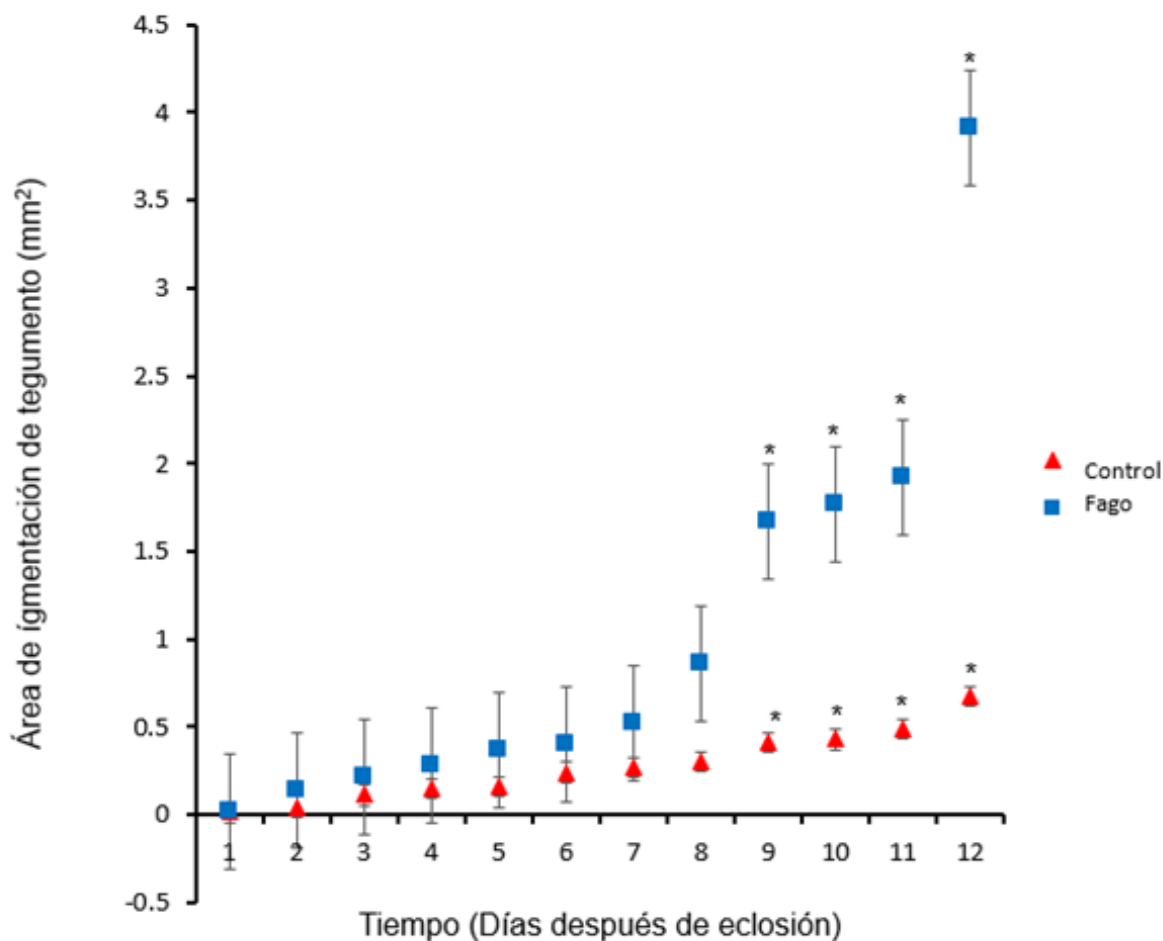
### 7.9.2 Efecto del fago vB\_Pd\_PDCC-1 sobre la pigmentación larvaria

El análisis de la pigmentación de ojos y el tegumento mostraron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos a los 12 DDE. Con respecto al área de pigmentación de los ojos, no se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los grupos control y tratado con fagos; sin embargo, el grupo tratado mostró un área de concentración más alta ( $0.3898 \pm 0.29 \text{ mm}^2$ ) que el control ( $0.3225 \text{ mm}^2 \pm 0.014$ ) a los 12 DDE (Fig. 35). También se observó una diferencia

significativa ( $p < 0.05$ ) en el área y grado de pigmentación, alcanzando un área máxima de  $3.9153 \pm 0.30 \text{ mm}^2$  en el grupo tratado a los 12 DDE, mientras que el grupo control alcanzó un área de  $0.6728 \pm 0.17 \text{ mm}^2$  (Fig. 36).



**Figura 34.** Área de pigmentación en ojos de larvas de *S. rivoliana* tratadas y no tratadas con fago. Los datos se basan en las medias  $\pm$  desviaciones estándar. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de control y tratados.



**Figura 35.** Área de pigmentación en tegumento de larvas de *S. rivoliana* tratadas y no tratadas con fago. Los datos se basan en las medias  $\pm$  desviaciones estándar. Los asteriscos (\*) denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de control y tratados.

### 7.9.3 Composición de la comunidad bacteriana

Se presentó un número mayor de OTUs para ambos grupos (221 para control y 210 para tratado con fago) el día 2 DDE, respecto a los demás días; sin embargo, el valor más alto se observó en el grupo control (Tabla 7). El índice de diversidad de Shannon y el estimador de riqueza de Chao mostraron una alta diversidad y riqueza bacteriana en ambos grupos a los 2 DDE, aunque no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos control y tratados a los 12 DDE, que corresponde al final del período experimental. La caracterización de la comunidad bacteriana se estimó a nivel de phylum, siendo *Proteobacteria* el único grupo que se clasificó a nivel de clase

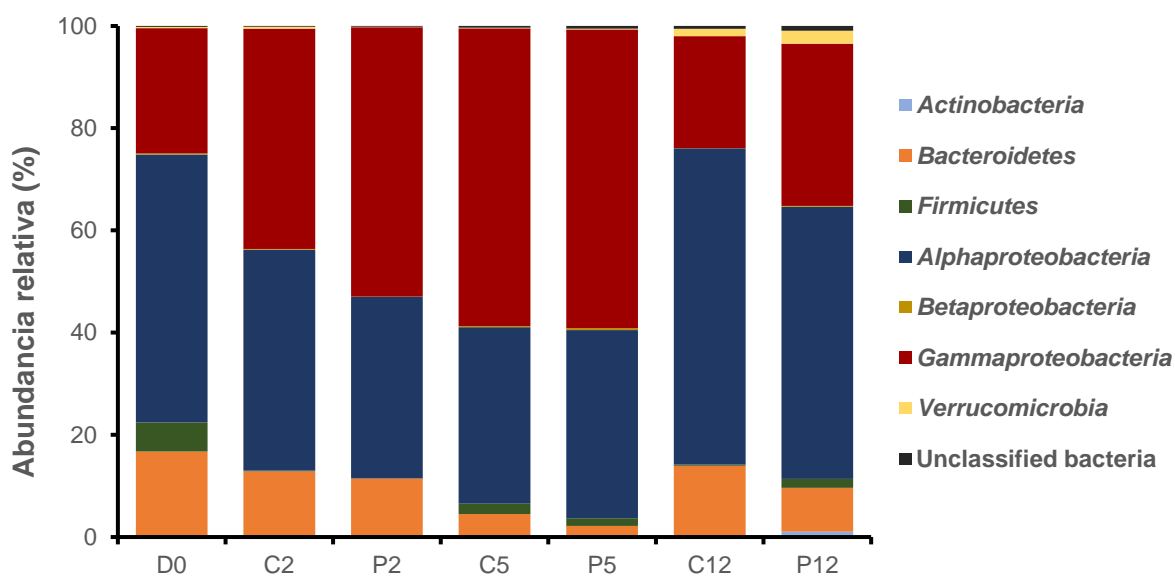
(Fig. 37). En todos los grupos, desde huevos hasta el último tiempo en larvas, el phylum más abundante fue *Proteobacteria*, representado por miembros pertenecientes a las clases *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*. Se observó un cambio significativo ( $p < 0.05$ ) a los 5 y 12 DDE, donde se apreció una disminución en el grupo *Gammaproteobacteria*, mientras que *Alphaproteobacteria* aumentó. Los miembros pertenecientes al phylum *Bacteroidetes* también se observaron en un alto porcentaje en ambos grupos. Aunque en un momento inicial se detectaron miembros pertenecientes al phylum *Firmicutes*, su abundancia se redujo en ambos grupos trascurriendo en los demás tiempos. Asimismo, se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de miembros pertenecientes al phylum *Verrucomicrobia* en ambos grupos a las 12 DAD, con mayor abundancia en el grupo tratado.

A nivel de familia, seis taxa (*Pseudoalteromonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* y *Vibrionaceae*) fueron dominantes en ambos grupos a los 12 DDE (Fig. 38). Los miembros pertenecientes a la familia *Rhodocabacteraceae* fueron los más abundantes, encontrándose el mayor porcentaje en el grupo control ( $61.7 \pm 7.4\%$ ). Además, el grupo tratado con fago vB\_Pd\_PDCC-1, mostró una mayor abundancia de los taxa *Sphingomonadaceae* y *Vibrionaceae* que en el grupo de control. Aunque no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para *Vibrionaceae*, se presentó una diferencia con valores más altos de la familia *Sphingomonadaceae* ( $p < 0.05$ ) en el grupo tratado con fago en comparación al grupo control.

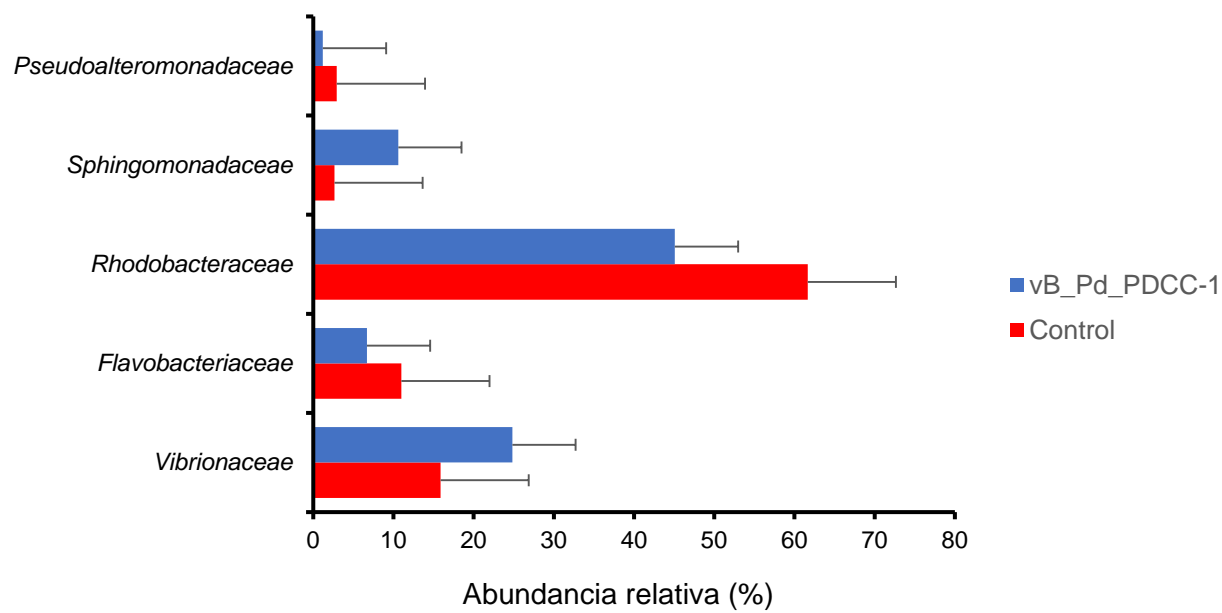
**Tabla 7.** Diversidad y riqueza bacteriana en larvas de *S. rivoliana* tratadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1.

Tratamientos *	No. total de OTUs	Índice de diversidad de Shannon	Estimador de riqueza de Chao1
D0	173	2.70	343.04
C2	221	3.32	487.82
C5	176	2.99	386.37
C12	136	2.51	309.77
P2	210	2.96	455.39
P5	185	2.48	373.21
P12	181	2.83	394.87

\* D0, día inicial; C2, control a 2 DDE; C5, control a 5 DDE; C12, control a 12 DDE; P2, grupo tratado a 2 DDE; P5, grupo tratado a 5 DDE, y P12, grupo tratado a 12 DDE. No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos.



**Figura 36.** Abundancia relativa de linajes bacterianos dominantes (Phylum *Protobacteria* dividido a nivel taxonómico de Clase) encontrados en huevos y larvas de *Seriola rivoliana*. D0, huevos en día 0; C2, C5 y C12, controles en días 2, 5 y 12, respectivamente; P2, P5 y P12, larvas tratadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 en días 2, 5 y 12, respectivamente.



**Figura 37.** Abundancia relativa de familias bacterianas dominantes encontradas en larvas de *S. rivoliana* tratadas con o sin el fago vB\_Pd\_PDCC-1. No se mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) excepto en familia *Sphingomonadaceae* (\*  $p < 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

El aumento de bacterias resistentes a los antibióticos, las consecuencias de la liberación de antibióticos en ambientes acuáticos y la contaminación de los productos del mar y los producidos a través de la acuicultura, están llevando a la investigación de medios alternativos para el control de patógenos. La aplicación terapéutica con bacteriófagos para controlar las infecciones bacterianas, ha despertado interés recientemente como una posible alternativa a la terapia con antibióticos tradicionales, con nuevos resultados teóricos y experimentales (Defoirdt *et al.*, 2011; Rørbo *et al.*, 2018; Kowalska *et al.*; 2020).

En acuicultura, se han reportado estudios sobre la aplicación de bacteriófagos como alternativa al uso de antibióticos para combatir enfermedades bacterianas en peces, como el caso de *Edwardsiella tarda* la cual ocasiona artritis séptica en anguilas (*Anguilla anguilla* y *Anguilla japonica*); *Flavobacterium psychrophilum*, causante de la enfermedad del agua fría en salmónidos como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); *Flavobacterium columnaris* causante de la enfermedad columnaris en bagres como el caso de *Plecoglossus altivelis* y *Lactococcus* spp. Causante de lactococcosis en jurel *Seriola lalandi* (Richards, 2014).

El fago vB\_Pd\_PDCC-1 presentó una morfología con cabeza isométrica y una cola retráctil, características de los miembros de la familia Myoviridae, del orden Caudovirales. Fagos de esta magnitud resultan activos contra especies de *Vibrio* como el caso de Yamaki *et al.* (2015), quienes presentan al fago Phda1 específico para *P. damsela* subsp. *damsela* (*Vibrio damsela*) con una longitud de cabeza de 62 nm, y cola contráctil de 110 nm de longitud. Matamp y Bhat (2019), obtuvieron el fago  $\phi$ VP-1 con cabeza icosaédrica con un diámetro de  $87.59 \pm 1.34$  nm conectada a una cola contráctil de  $94.43 \pm 1.71$  nm, el cual se obtuvo utilizando *Vibrio parahaemolyticus* como bacteria blanca. Asimismo, se reportan únicamente dos fagos de la familia Myoviridae en India con potencial contra *V. parahaemolyticus*. VVP-1 y Vp-7 reportando una simetría binaria con un diámetro de cabeza de 50-60 nm y cola sin región de collar; sin embargo, en nuestro estudio vB\_Pd\_PDCC-1 también presentó efecto contra *V.*

*parahaemolyticus*, aunque presentó una forma diferente con una cabeza de 99.3 nm (Alagappan *et al.*, 2010; Stalin y Srinivasan, 2016).

El genoma del fago vB\_Pd\_PDCC-1 consta de 237,509 pb con 43.3% de contenido de G+C, mientras que el del fago Phda1 resultó de solo 35,200-39,500 pb, lo que mostró que el ADN tiene muchos sitios de enzimas de restricción utilizados en este estudio. En el caso de *Vibrio parahaemolyticus*, el fago PVP-1 contiene un genoma de ADN lineal bicatenario de 150.764 pb con un contenido de G + C de 41.84%, 66 promotores putativos y un gen de ARNt: tRNA-Asn (GTT). El análisis completo del genoma muestra una similitud de proteínas homólogas superiores al 90% con otros fagos de *Vibrio*, mientras que  $\phi$ VP-1 solo muestra una similitud del 55% (Matamp y Bhat, 2019).

Al presentar vB\_Pd\_PDCC-1 un genoma mayor a 200 kbp se considera un fago jumbo debido al tamaño que presenta. Estos fagos son aislados en su mayoría de bacterias gran-negativas como en el caso de cepas de *Vibrio*, donde hay seis fagos descritos que van de los 236 a 248 kbp (Serwer *et al.* 2007; Yuan y Gao, 2017). Lo más notable en este tipo de virus es el tamaño de sus partículas y genomas el cual se relaciona con su estructura (cabeza-cola) teniendo un gran tamaño en contraste con otros fagos, como el caso de fagos contra *V. parahaemolyticus*;  $\phi$ pp2 (90x50 nm) y KVP40 (140x70 nm) (Miller *et al.* 2003; Lin and Lin, 2012).

La estabilidad estructural de los fagos hacia diferentes condiciones ambientales (físicas y químicas), es uno de los factores más relevantes para su potencial como agente biológico. La estabilidad térmica de los fagos usados en este trabajo es adecuada debido a su amplio rango que cubría la temperatura de crecimiento de las bacterias empleadas. Basado en comparación contra otros fagos de *Vibrio* podemos observar que vB\_Pd\_PDCC-1 presenta un periodo de latencia menor (25 minutos) con un superior tamaño de estallido (286 UFP por célula infectada) con referencia a otros fagos: Vp15p 70 minutos periodo de latencia, 7 partículas por célula; Vp17P con periodo de latencia de 55 min y 350 partículas por estallido; Vp25P con 90 min y 18



partículas; Vp33P con 65 minutos y 200 partículas. Para el caso de  $\phi$ VP-1 presenta un periodo de latencia corto con un tamaño de estallido de 44 partículas/ célula.

Mientras que para el caso de *P. damselae* se encuentra el fago Phda1 con tamaño de estallido de 60 min, pero con un menor 19 UFP por célula infectada (Hidaka and Tokushige, 1978; Alagappan *et al.*, 2010; Yamaki *et al.*, 2015; Matamp y Bhat, 2019). Se asume una correlación teórica positiva entre el tiempo de lisis y el tamaño de estallido, es decir, entre mayor sea el tiempo de lisis, mayor es el tamaño de estallido. Esto se corrobora al observarse la titulación de vB\_Pd\_PDCC-1 durante los primeros 25 minutos y después permaneció en fase de meseta (Wang, 2006; Matamp y Bhat, 2019). Un entendimiento preciso de la supervivencia de fagos en condiciones de estrés es necesario para su aplicación como agentes de biocontrol en diferentes ámbitos de la acuicultura (Ackerman *et al.*, 2004; Jończyk *et al.*, 2011).

De acuerdo con Austin y Austin (2016) es fundamental prevenir la ocurrencia de enfermedades causadas por bacterias. Uno de los principales pasos para lograrlo, es conocer y delimitar la carga bacteriana a la que están expuestos los organismos en cultivo y su monitoreo a través del tiempo. Como se había mencionado, una de las principales enfermedades bacterianas más frecuentes en cultivos de peces marinos es la vibriosis (Álvarez *et al.*, 2001). En el caso de nuestra investigación, en las primeras 18 horas se encontraron valores altos de carga de *Vibrio*, teniendo una mayor concentración de UFC ml<sup>-1</sup> a las 12 hora; sin embargo, pasadas las 24 horas los huevos impregnados con el bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 presentaron una carga bacteriana de *Vibrio* de 0 UFC ml<sup>-1</sup> (No detectable) tanto para el grupo desinfectado, como el no desinfectado, siendo éste un valor estable para el control de *Vibrio* en el medio dado. De acuerdo a Ganesh *et al.* (2010) para evitar la enfermedad de vibriosis en cultivos, la carga de *Vibrio* debe mantenerse por debajo de 1.00E+03 UFC ml<sup>-1</sup>.

El uso de bacteriófagos líticos ofrece una promesa como un medio alternativo para controlar las cepas patógenas de *Vibrio* que causan grandes pérdidas de producción de peces, sobre todo en estado larvario (Rørbo *et al.*, 2018; Kowalska *et al.*; 2020). Realizar estudios enfocados a prevenir la proliferación de *Vibrio* desde el huevo como en este trabajo, se exhibe como manera para

implementar y mejorar técnicas para la larvicultura, al no haber trabajos que se enfocan en esta etapa, mucho menos en la aplicación de los bacteriófagos en la misma. Con respecto a estudios enfocados en larvas de peces no se tiene conocimiento salvo el trabajo de Silva *et al.* (2014), quienes describieron el aislamiento y caracterización de bacteriófagos capaces de infectar *Vibrio anguillarum* patógeno y su aplicación para prevenir la infección bacteriana en larvas de peces cebras. Se obtuvo que la mortalidad de las larvas después de 72 horas presentó diferencias significativas ante el grupo infectado sin tratamiento, indicando que el suministro directo de fagos en el agua de cultivo fue efectivo; siendo así un tratamiento eficaz para reducir el impacto negativo de la vibriosis en la larvicultura de peces tanto dulceacuícolas como marinos.

Estos efectos a su vez se vieron reflejados en los análisis histológicos (Fig. 27 y 28) donde los organismos tratados con el bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 presentaron un mejor desarrollo en su sistema nervioso observándose una correcta división del telencéfalo, así como en la formación de su notocorda (Fig. 27 B). La formación y segmentación adecuada de somitas y paquetes musculares podría justificar por qué estas larvas presentaban en contraste, una mejor movilidad que el resto de los grupos. En comparación los organismos de los tratamientos sin bacteriófagos (Fig. 28 C), que presentaron daños en sus tejidos como edemas o malformaciones en sus estructuras e incluso llegando al punto de tener necrosis (Rivas *et al.*, 2013). Esto puede deberse al estar en contacto con bacterias que proliferaron al no ser controladas. Las bacterias pueden causar infección o inclusive producir necrosis en tejidos blandos (Rivas *et al.*, 2013; Eissa *et al.*, 2018). Esta infección puede entrar al cuerpo por una herida menor o alguna raspadura del organismo al presentar estrés. Estas bacterias comienzan a multiplicarse y a liberar sustancias tóxicas las cuales destruyen los tejidos y afectan el flujo sanguíneo (Labella *et al.*, 2017; Eissa *et al.*, 2018).

Esta diferenciación por el uso de bacteriófagos y sus efectos benéficos a nivel histológico puede verse en otros estudios. Como en el caso del trabajo de Morello *et al.* (2011) quienes analizaron pulmones dañados de ratones infectados con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Éstos fueron tratados con bacteriófagos y observaron la eliminación de las bacterias, así como

mejorías en el organismo, además obtuvieron una supervivencia del 100% de los ratones con un tratamiento de cuatro días con una sola aplicación. El efecto se vio reflejado a nivel histológico obteniendo mejorías en las células de los pulmones sin presentar necrosis o daño por fibrosis. Estos resultados sugieren que los bacteriófagos pueden ser una alternativa efectiva de control contra carga excesiva de bacterias en huevos de peces; sin embargo, no se han realizado otros trabajos sobre el efecto de bacteriófagos previo a la eclosión de los huevos en cualquier especie. El trabajo de Farfrán-Ortega (2010) mostró que los fagos fueron capaces de lograr disminuciones significativas ( $p < 0.05$ ) de *Salmonella* en huevos aviares por medio de inmersión, donde además se comprobó que la actividad lítica de los bacteriófagos en el huevo se mantuvo hasta por 5 días. También dado que en la literatura no existen estudios publicados sobre la capacidad de penetración de bacteriófagos a través del cascarón de huevos inclusive en especies aviares. Por ello Farfrán-Ortega (2010) utilizaron técnicas para permeabilizar la membrana por medio de métodos químicos para poder remover la cutícula y facilitar la penetración de las partículas fágicas; sin embargo, su terapia con fagos no redujo la incidencia de contaminación en el contenido del huevo ( $p > 0.05$ ), siendo resultados similares a otras investigaciones donde emplean diferentes alimentos tratados con fagos contra diferentes enteropatógenos como es en los estudios de Leverentz *et al.* (2001) en cortes de melones y manzanas contaminados con *Salmonella* y *Listeria* y Fiorentin *et al.* (2005) en piernas de pollo contaminadas con *Salmonella* Typhimurium. Por otra parte, O' Flynn *et al.* (2004) emplearon una mezcla de tres bacteriófagos específicos en trozos de carne logrando una reducción significativa de la incidencia de contaminación en un 70 % de sus muestras.

Por su parte, Geer (2005) afirma que las razones por las que no se ha logrado una disminución en la incidencia de contaminación en huevos de aves es debido a la no penetración de los fagos a través de la membrana del caparazón. Sin embargo, para el caso de nuestra investigación, gracias al microscopio electrónico (Fig. 24 y 25) se observó que debido al tamaño del poro presente en el cascarón (250 nm) es factible que los bacteriófagos puedan penetrar al huevo y ayudar a la descontaminación bacteriana desde el interior. Asimismo, la mayor parte de los

bacteriófagos parecen encontrarse en la superficie del huevo al estar presentes en las bacterias que por su tamaño, no pueden entrar por el poro del huevo.

Gary Richards (2014) establece que es difícil comparar los resultados de los diversos estudios sobre el uso de fagos en acuicultura ya que no hay métodos estandarizados para la realización del trabajo o para análisis de muestra. Los reportes existentes brindan diferente información en cuanto a la dosis de los fagos y bacterias, así como su MOI o el estado general de salud de los peces al inicio del estudio, así como la edad y el tamaño de los organismos. Se deben realizar pruebas para identificar dosis efectivas de fagos para los peces y patógenos específicos a tratar, procedimientos de administración, edades de los peces a tratar, especificidad de fagos, reducción general de la enfermedad o mortalidad de los peces, así como el costo de estos estudios. A su vez el monitoreo de rutina para patógenos específicos de los organismos permitirá que se tomen acciones correctivas de manera oportuna. En la mayoría de los casos, el tratamiento temprano puede ser la clave para reducir significativamente la morbilidad y la mortalidad. Además, es necesaria investigación para identificar riesgos ambientales y desarrollar salvaguardas para mitigar dichos riesgos.

Considerando lo anterior, la evidencia presentada en revisiones bibliográficas muestra que la terapia con bacteriófagos administrada de manera adecuada es muy eficaz para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas bacterianas, especialmente las causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos (Matsuzaki *et al.*, 2005). Aunque se debe indicar que algunos problemas aún no se han resuelto, muchos expertos opinan que la terapia con bacteriófagos encontrará un nicho en la medicina occidental moderna en el futuro.

Por otro lado, se han descrito una gran variedad de bacteriófagos del medio marino, incluyendo su tipo de morfología y requerimiento de las concentraciones de NaCl del agua de mar para su desarrollo y proceso de infección de bacterias patógenas (Zachary, 1974). La mayoría de los bacteriófagos suelen ser encontrados en las partes cercanas a la costa o en la superficie de ambientes marinos, ya que por lo regular es el sitio en el cual se encuentran la mayoría de las

bacterias patógenas para humanos, peces y crustáceos, resaltando las del género *Vibrio* (Spencer, 1963). Sin embargo, los bacteriófagos más activos en el presente trabajo fueron aislados de un tiburón de profundidad contrastando con otros trabajos que especifican que los más activos son los encontrados en Bahías o zonas cercanas a la costa y en la superficie del medio marino (Spencer, 1963; Zachary, 1974). Trabajos más recientes indican que a pesar de la gran abundancia de fagos en los océanos, los cercanos a zonas costeras son menos activos (Alonso-Sáez *et al.*, 2018).

En cuanto a los ensayos de tolerancia fisicoquímica *in vitro*, algunos autores coinciden que la temperatura óptima de los vibriófagos es de 30 °C permitiendo tener una actividad en un periodo de 18 horas, mientras que el bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 resistió una temperatura de 70 °C sin haber tenido una disminución en su actividad lítica permaneciendo el efecto aún pasadas las 48 horas (Matsuzaki *et al.*, 1992). La salinidad al bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 no le presentó alguna diferencia en su variación, aun cuando se ha establecido que el óptimo es de 25 ‰ dado que en conjunto con temperatura óptima el tiempo de producción de fagos es muy rápida en agua de mar artificial, tal es el caso de Park *et al.*, (2000) y Quiróz-Guzmán (2005), quienes aislaron bacteriófagos con esta misma característica de resistencia a la salinidad.

Dado que el bacteriófago vB\_Pd\_PDCC-1 resistió una alta exposición a radiación UV, así como hasta un 10 % de cloroformo en su medio se estima que presenta una gran resistencia por parte de su cápside. Esto podría deberse al ser aislado de un medio de profundidad, por lo que podría tratarse un bacteriófago termófilo con una estructura funcional con la presencia de HNH endonucleasa (Zhang, *et al.*, 2017).

Los resultados de este estudio sugieren fuertemente que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 puede proteger a los huevos y larvas de *Seriola rivoliana* contra infecciones de *P. damselae*. Donde los huevos tratados con el fago obtuvieron un 80 % siendo incluso mejor que el control obteniendo un aumento 30 % en supervivencia larvaria. Este comportamiento de fagos en cultivos larvarios puede observarse en otros trabajos donde con la utilización de diversos fagos como el VP-2

protegeron larvas de peces contra infecciones de *Vibrio*, y observaron que las larvas infectadas con *V. anguillarum* resultaban en una baja supervivencia (17 %), mientras que la supervivencia de las infectadas en presencia de fago incrementaba significativamente (Silva *et al.*, 2014). Asimismo, el fago vB\_Pd\_PDCC-1 no mostró efectos de alteraciones morfológicas en las larvas por lo que fue necesario realizar una secuenciación de genoma para observar la presencia de genes que codificaran endotoxinas o antígenos bacterianos.

La distribución general de los taxa más dominantes para las muestras de huevos de *S. rivoliana* oscila en su mayoría en clases pertenecientes a los phyla de Proteobacteria, así como Gammaproteobacteria (Figura 30). En un estudio realizado previamente en huevos de salmón del Atlántico *Salmo salar*, se encontró que sus phyla más dominantes fueron Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, coincidiendo con nuestro trabajo en abundancia para Proteobacteria, aunque para Actinobacteria y Firmicutes en huevos de *S. rivoliana* no se encontró una abundancia relativa dominante (Nguyen *et al.*, 2020). Sin embargo, en el tiempo final del grupo del fago vB\_Pd\_PDCC-1 (FDP1 y FNP1) se puede observar un aumento en la abundancia de Actinobacteria y Firmicutes a diferencia de los demás tratamientos (Figura 30).

Esto podría coincidir también con el trabajo de huevos de salmón, donde se observaron valores altos de OTUs exclusivamente en muestras sanas, especialmente en taxones de Streptomycetaceae, Microbacteriaceae y Micrococcaceae pertenecientes al grupo de Actinobacterias (Liu *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2020).

Los OTUs que fueron significativamente más abundantes en las muestras con excepción de FDP1 pertenecían a Gammaproteobacteria, phyla a la que se encuentra la familia Vibrionaceae (Figura 31), grupo al cual pertenecen bacterias patógenas oportunistas, resaltando las especies *Vibrio spp.* y *Photobacterium spp.* (Frans *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014). Esto se observa también en la disminución de carga de CFU mL<sup>-1</sup> de *Vibrio* al utilizar el fago vB\_Pd\_PDCC-1 (Tabla 3). Para el caso de FDP1 se puede observar que al eliminar *Vibrio* hay una sucesión ecológica que da como resultado un aumento en la abundancia relativa de OTUs por parte del phyla Alapaprotobacteria (Figura 32); en este grupo se observa en abundancia la familia Sphingomonadaceae, la cual

comprende todas las Sphingomonas. Algunas especies son capaces de producir esfingolípidos, los cuales intervienen en tejidos nerviosos para la transmisión de señales entre células individuales, a lo que podría atribuirse una eclosión más rápida, así como una mejor movilidad en la larva por un mejor desarrollo en el sistema nervioso (Figura 29b) (Madigan *et al.*, 2006; Acton, 2012). Para el caso de Liu *et al.* (2014) el grupo de Sphingobacterias presentó un bajo número de OTUs significativos en huevos de salmón.

En nuestro experimento con larvas de *S. rivoliana*, en el momento de la eclosión, la longitud de las larvas resultó de  $1.77 \pm 0.10$  mm para el grupo de control y de  $1.87 \pm 0.04$  mm para el grupo tratado con el fago vB\_Pd\_PDCC-1, siendo las longitudes menores a las previamente informadas. Por ejemplo, Teles *et al.* (2017; 2019) observaron larvas de *S. rivoliana* con longitudes que van desde  $2.6 \pm 0.12$  a  $2.98 \pm 0.14$  mm después de la eclosión. Asimismo, Dopico (2010) y Burgoin (2015) reportaron longitudes de 2.54 y 2.47 mm luego de la eclosión en larvas de *S. rivoliana* cultivadas a 23-24 ° C.

Para el AGR, se obtuvo un incremento de 0.08 y 0.15 mm día<sup>-1</sup> en los grupos control y tratado a los 12 DDE, siendo valores inferiores a los obtenidos previamente para *S. rivoliana* hasta 0.37 mm día<sup>-1</sup> a los 30 DAD, además se observó un aumento en la SGR de 3.42% día<sup>-1</sup> en el grupo control, mientras que se obtuvo un 5.52% día<sup>-1</sup> en el grupo tratado, con valores superiores a los reportados previamente para *S. rivoliana* (Teles *et al.*, 2017; 2019).

Respecto a la supervivencia final a los 12 DDE, los valores en el grupo control ( $0.8 \pm 0.01\%$ ) fueron similares a los encontrados por Roo *et al.* (2014) y Teles *et al.* (2019), quienes obtuvieron una supervivencia de 0.5% y 0.7%, respectivamente, utilizando condiciones y densidad de cultivo larvario similares. Sin embargo, se encontró una supervivencia final más alta de  $1.8 \pm 0.15\%$  (supervivencia 2.5 veces mayor que el control) en el grupo tratado. Se han reportado tasas de supervivencia entre 0.5 y 2.5% para esta especie en otros lugares, como Ecuador y Hawai (Blacio *et al.*, 2003; Laidley *et al.*, 2004), así como en otras especies de *Seriola*, como *S. lalandi* y *S. dumerili* (Tachihara *et al.* 2007; Papandroulakis *et al.* 2005; Hamasaki *et al.* 2009). La

mayor mortalidad larvaria se registró a los 8 y 12 DDE, cuyos valores fueron similar a los descritos en el trabajo de Roo *et al.* (2014).

Los fagos se han propuesto como una alternativa para mejorar el desarrollo biológico, ya que no solo se utilizan contra bacterias patógenas resistentes, sino también como inmunización pasiva y modulación de la respuesta inmune (Krut y Bekeredjian-Ding, 2018). Al igual que los probióticos o inmunomoduladores, los fagos pueden eliminar cepas de *Vibrio* dentro del ecosistema intestinal de organismos marinos, cuyos restos celulares (células bacterianas muertas) pueden ayudar a combatir y proteger contra otras infecciones debido a respuestas inmunes inespecíficas (Alagappan *et al.* 2010; Alagappan y Deivasigamani, 2016).

Los estudios sobre inmunoestimulantes han demostrado un efecto positivo sobre el crecimiento, la supervivencia y la respuesta inmune en diferentes especies de peces, incluso a nivel larvario (Lobo *et al.* 2010; García de la Banda *et al.* 2012; Guzmán-Villanueva *et al.* 2014). Además, los inmunoestimulantes pueden promover cambios en la microbiota intestinal, que participa en la regulación de la expresión de genes que van desde la proliferación del epitelio hasta una mejor respuesta inmune (Rawls *et al.* 2004; Merrifield *et al.*, 2010).

En cuanto a la zona de pigmentación de los ojos, las larvas tratadas con fago presentaron un mayor rango de cobertura en comparación con las encontradas en el control. Sin embargo, no fue hasta el día 3 DDE, cuando mostraron pigmentos visibles. Se ha informado que, al momento de la eclosión, el ojo de larvas de peces es indiferenciado, compuesto por el cristalino y una retina indiferenciada (Peña y Dumas 2007; Yúfera 2018; Viader-Guerrero 2019). Los fotoreceptores se activan en el momento de la primera alimentación (2 DDE), de acuerdo con la aparición de pigmentos a 3 DDE (Yúfera 2018).

Se conoce que las bacterias pueden afectar de forma negativa los diferentes tejidos del organismo. En el caso de ojos en peces afectados, estos pueden presentar hipertrofia e hiperplasia afectando simultáneamente el órgano. Sin embargo, en trabajos donde tratan a los



peces con probióticos, prebióticos o simbióticos se ha observado que no presentan estos daños, atribuyéndole un incremento en la respuesta inmune del pez, volviéndolo resistente al daño (Evans *et al.*, 2006; Hardi, 2011; Agatis y Campus, 2015). Las larvas tratadas con fago podrían presentar una mejor visión debido a la pigmentación ocular, lo que les ayudará a absorber más fotones de luz, así como los conos se estimularán fácilmente, lo que puede ayudarles a encontrar mejor su alimento (Yoseda *et al.* 2008; Yúfera 2018; Viader-Guerrero 2019).

La pigmentación deficiente es un problema común en la producción comercial de peces y una causa común de pérdidas en la industria acuícola (Akyol y Şen 2012; Purchase *et al.* 2002; Macieira *et al.* 2006). Uno de los principales factores de la mala pigmentación de los peces es la alimentación, donde una buena alimentación se considera un aspecto fundamental para mejorar la pigmentación en las especies de cultivo (Næss y Lie 1998; Izquierdo y Koven 2011).

En nuestro estudio, el grupo tratado mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control, demostrando un mayor grado de pigmentación en su tegumento. Esto puede deberse a un mejor desarrollo larvario asociado a la presencia del fago vB\_Pd\_PDCC-1, lo que se refleja en un mejor desarrollo del tamaño de ojos y boca, teniendo un mejor desempeño para la caza de presas vivas. Además, estas observaciones pueden estar respaldadas por un mayor consumo de Artemia en el grupo tratado, en comparación con el grupo de control.

El metabolismo del crecimiento se correlaciona con otros factores que pertenecen a receptores, como el caso de vitaminas, los cuales funcionan como receptores naturales y son moduladores importantes para lograr un crecimiento óptimo, un desarrollo óptimo y una pigmentación adecuada en peces marinos. (Rainuzzo *et al.*, 1997; Panigrahi *et al.*, 2005; Avella *et al.*, 2010).

Existen estudios, donde presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en pigmentos de peces, obteniendo valores más altos en los que fueron tratados con dietas con probióticos e inmunoestimulantes como el caso de carotenoides. Obteniendo una relación entre los pigmentos y la cantidad de estos en sangre. (Teimouri *et al.*, 2013; Safari *et al.*, 2015). También

se ha observado que esto mejora la coloración del filete en especies como salmón del Atlántico (*Salmo salar*), y trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Hynes *et al.*, 2009; Safary *et al.*, 2015; Rodríguez-Ramírez, 2016).

Las larvas de peces marinos en cautiverio, generalmente no se alimentan de una dieta artificial durante las primeras etapas de desarrollo, ya que requieren alimentos vivos como alternativa en su dieta diaria (Picchietti *et al.* 2009). Las larvas en nuestro estudio ya contaban con las características anatómicas requeridas para el inicio de la primera alimentación exógena, las cuales están relacionadas con la ubicación de la presa como los ojos y otros órganos quimiosensoriales, la boca y aletas para atrapar presas, y el sistema digestivo para la ingestión y digestión (Yúfera y Darías 2007). A pesar de abrir la boca a los 2 DDE, se observó alimentación de presas vivas hasta los 3 DDE cuando comenzaron a observarse rotíferos en su tracto digestivo. Sin embargo, cuando se observó la ingestión de *Artemia* por las larvas tratadas con el fago al comienzo de las 12 DDE, no hubo evidencia de ingestión de presas en el grupo de control, por lo que no tuvieron una nutrición adecuada.

El tracto gastrointestinal en larvas recién eclosionadas, tiende a contener pocas bacterias. Las bacterias que habitan posteriormente se adquieren cuando las larvas de peces abren la boca y comienzan a pasar agua para controlar la osmorregulación y luego el microbioma se diversifica aún más durante la alimentación (Nayak, 2010; Banerjee y Ray, 2017). Sin embargo, varios estudios han demostrado que la dieta inicial influye en la configuración de la comunidad microbiana intestinal y desde las primeras alimentaciones se produce una diversificación sustancial (Korsnes *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2009; Lauzon *et al.*, 2010).

La presencia de fagos es un componente relevante para el equilibrio de la microbiota. Como tratamiento se utiliza ampliamente para reducir bacterias patógenas y ha surgido como nuevo método para modular la diversidad de la microbiota. Los fagos se seleccionan para infectar un amplio espectro de bacterias específicamente resistentes. Entre las perspectivas sobre la modulación terapéutica, el uso de fagos puede manipular la población bacteriana para

reequilibrar la microbiota positivamente, disminuyendo la microbiota que produce enfermedades (Paule *et al.*, 2018; Richards *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019).

Aunque las presas vivas son esenciales para el mantenimiento de los organismos, esta práctica podría introducir patógenos oportunistas en el sistema de producción (Dehasque *et al.* 1991; Ringo, 1999). En este estudio, a diferencia del grupo control, las larvas tratadas con el fago vB\_Pd\_PDCC-1 mostraron la injección de *Artemia*, lo que explicaría la alta carga de Vibrionaceae (Balcázar *et al.* 2010; Interaminense *et al.*, 2014). El género *Vibrio* representa el grupo más común de bacterias marinas. Por tanto, aunque se desinfectan los quistes de *Artemia*, se ha observado que la carga bacteriana perteneciente al grupo Vibrionaceae puede aumentar drásticamente en la etapa de nauplios, ya que este grupo bacteriano suele estar presente tanto en el agua circulante como en el medio de enriquecimiento. Esto podría sugerir que los miembros pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* estarían presentes en el medio de enriquecimiento, colonizando *Artemia* sp. después de la eclosión (Gomez-Gil *et al.* 1998; Riddle, *et al.* 2013; Balcázar *et al.* 2010; Tkavc *et al.* 2011; Interaminense, *et al.*, 2014).

Estudios anteriores han demostrado el efecto de los fagos para controlar cepas de *Vibrio* patógeno y su aplicación para prevenir la infección bacteriana en larvas de pez cebra, bacalao y lenguado (Silva *et al.* 2014; Rørbo *et al.* 2018). Estos estudios han demostrado que dosis repetidas de fagos benefician a los estanques de cultivo, aumentando la supervivencia de las larvas y reduciendo la población de patógenos (Vinod *et al.* 2006; Karunasagar *et al.* 2007; Silva *et al.* 2014). Como el fago vB\_Pd\_PDCC-1 no se administró diariamente, el último día de administración no coincidió con *Vibrio* introducido a través de *Artemia*. Agregar una dosis más del fago podría reducir los niveles de Vibrionaceae asociados con la microbiota intestinal de las larvas de jurel, como se ha demostrado previamente en larvas recién nacidas expuestas a este fago (Veyrand-Quirós *et al.* 2020). Estudios anteriores también han informado que la aplicación de fagos para controlar las especies de *Vibrio* no tuvo un impacto negativo en la microbiota asociada a los huevos y nauplios de *Artemia*. Además, una sola dosis redujo los niveles de

especies de *Vibrio* a niveles indetectables (Quiroz-Guzmán *et al.*, 2018; Lomelí-Ortega, *et al.* 2020).

En cuanto a la composición y estructura de la comunidad bacteriana, el phylum más abundante presente en larvas de jurel *S. rivoliana* fue Proteobacteria. Estudios anteriores han revelado resultados similares en otras especies de peces, donde, a diferencia de Bacteroidetes y Firmicutes, parece que Proteobacteria comprende hasta el 90% del microbioma intestinal de los peces (Rombout *et al.* 2011; De Paula Silva *et al.*, 2011; Ghanbari *et al.*, 2015; Estruch *et al.* 2015). Entre ellos, Alphaproteobacteria apareció como grupo dominante en peces, siendo la familia Rhodobacteraceae la más abundante.

El grupo de las Rhodobacteraceae son bacterias ubicuas en ambientes marinos, que producen compuestos antibacterianos contra varias especies, incluidos los miembros de la familia Vibrionaceae. Estas observaciones podrían explicar en parte el aumento de Rhodobacteraceae en detrimento de las poblaciones de Vibrionaceae en el grupo de control (Balcázar *et al.* 2007; Balcázar *et al.* 2010). La disminución de miembros pertenecientes al filo Proteobacteria puede verse agravada por la administración del fago vB\_Pd\_PDCC-1, ya que este fago tiene una amplia gama de huéspedes contra las especies de *Photobacterium* y *Vibrio*. Cabe señalar que el fago vB\_Pd\_PDCC-1 pertenece a la familia Myoviridae, que utiliza bacterias Gram-negativas como hospedadores naturales (Reyes *et al.* 2010; Mirzaei y Maurice, 2017).

A nivel de familias, se observó un aumento de Sphingomonadaceae en las larvas tratadas, que incluye especies de *Sphingomonas*. Estudios previos han sugerido que estas especies pueden producir esfingolípidos que son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la integridad funcional del sistema nervioso y, en consecuencia, pueden contribuir al desarrollo y movilidad de las larvas para cazar mejor (Babenko 2010; Babenko *et al.* 2016; Sepahi *et al.* 2016).

## 9. CONCLUSIONES

A manera de conclusiones por parte de la investigación tenemos que:

1. La administración del fago vB\_Pd\_PDCC-1 tuvo un impacto positivo en la calidad de eclosión, supervivencia y desarrollo en larvas de jurel *Seriola rivoliana*. En larvas se observó el efecto positivo en el crecimiento y talla respecto a su tasa de crecimiento específico y absoluto. Asimismo, las larvas tuvieron un impacto en la concentración de pigmentos en sus ojos y tegumento. Estas características pueden atribuirse al fago, el cual además de eliminar las bacterias patógenas del medio, podrían actuar de manera indirecta como un inmunoestimulante en el organismo de las larvas.
2. La administración del fago vB\_Pd\_PDCC-1 demostró la eliminación de bacterias pertenecientes a la familia Vibrionacea a números no detectables en huevos, modificando el resto de la microbiota dando una sucesión ecológica en las demás familias presentes. Sin embargo, para el caso de larvas transcurrido el experimento larvario, no se obtuvo una eliminación de *Vibrio*, al ser esta bacteria introducida en gran cantidad por medio de la incorporación de *Artemia* en el medio. Por lo que es necesario administrar otra dosis de fago en el sistema al alimentar, o ser tratados los quistes de *Artemia* previamente con el fago activo.

Se recomienda darle seguimiento al estudio de la aplicación del fago vB\_Pd\_PDCC-1 como modulador del metabolismo e inmunoestimulante en larvas de peces marinos, por lo que es necesario observar su efecto sobre la expresión de genes de sistema inmune, así como el análisis de expresión y actividad de enzimas digestivas.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abedon, S.T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage* 1, 46–49. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>.
- Ackermann, H.W., Tremblay, D., Moineau, S. (2004). Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newslett*, 38:35–40.
- Acton, Ashton. (2012). *Advances in Alphaproteobacteria Research and Application*. ScholarlyPaper Edition. USA. 29 pp.
- Adriaenssens, E.M., Sullivan, M.B., Knezevic, P. (2020). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Arch Virol*, 165: 1253–1260. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04577-8>
- Ajuebor, J., McAuliffe, O., O'Mahony, J., Ross, R. P., Hill, C., y Coffey, A. (2016). Bacteriophage endolysins and their applications. *Science progress*, 99(2), 183-199.
- Akyol O., y Şen, H. (2012). First record of abnormal pigmentation in a wild 1 common sole, *Solea solea* L., from the Aegean Sea. *Turk J Vet Anim Sci*, 36(6):727-729. doi:10.3906/vet-1110-7
- Alagappan, K., Karuppiah, V., Deivasigamani, B. (2016). Protective effect of phages on experimental *V. parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (Fabricius, 1798). *Aquaculture*, 453:86-92. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.11.037
- Alagappan, K.M., Deivasigamani B., Somasundaram S.T., and Kumaran, S. (2010). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in East Coast of India. *Curr. Microbiol.* 61 (4), 235–240. doi:10.1007/s00284-010-9599-0
- Alfenas, R. D. C. G. (2012). Gut microbiota and the development of obesity. *Nutr Hosp*, 27(5): 1408-1414.
- Almeida, A., Cunha, A., Gomes, N.C., Alves, E., Costa, L. y Faustino, M.A. (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar Drugs*, 7: 268–313.
- Alonso-Sáez, L., Morán, X. A. G., y Clokie, M. R. (2018). Low activity of lytic pelagiphages in coastal marine waters. *The ISME journal*, 12(8), 2100-2102.

- Álvarez González, C.A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE). Tesis de Doctorado, CICIMAR-IPN. 164 pp.
- Andreoni, F. y Magnani, M. (2014). Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *J Immunol Res*, 2014: 1–7.
- Austin B. y D. A. Austin. (2012). *Bacterial Fish Pathogens*. 5th ed. New York. Springer. 652 pp.
- Austin, B. y D. A. Austin. (2016). *Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish*. 6ta Edición. Springer International Publishing, Switzerland.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A. R., y Carnevali, O. (2010). Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(2), R359-R371.
- Babenko, N.A. (2016). Brain, fish oil-enriched diet, and sphingolipids. In: Raatz S, Bibus D (ed) *Fish and fish oil in health and disease prevention*. Academic Press, pp 263-272.
- Babenko, N.A., Semenova, Y.A. (2010). Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats. *Exp Gerontol*, 45(5):375-380. doi:10.1016/j.exger.2010.02.010
- Bakke, I., Coward, E., Andersen, T., y Vadstein, O. (2015). Selection in the host structures the microbiota associated with developing cod larvae (*Gadus morhua*). *Environmental microbiology*, 17: (10), 3914-3924.
- Balcázar J.L., Lee, N.M., Pintado, J., Planas, M. (2010). Phylogenetic characterization and in situ detection of bacterial communities associated with seahorses (*Hippocampus guttulatus*) in captivity. *Syst Appl Microbiol*, 33(2):71-77. doi:10.1016/j.syapm.2009.11.005
- Balcázar J.L., Rojas-Luna, T., Cunningham, D.P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J Invertebr Pathol* , 96(2):147-150. doi:10.1016/j.jip.2007.04.008
- Balon, E. K. (1984). Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 178-185.

- Balon, E. K. 2002. Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. *Environ. Biol. Fish.* 65: 1-35.
- Banerjee, G., y Ray, A.K. (2017). Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis*, 72, 1–11. doi: 10.1007/s13199-016-0441-8
- Benetti, D., Acosta, C., y Ayala, J. C., (1995). Cage and pond aquaculture of marine finish in Ecuador. *World Aquaculture* 26(4): 7-13.
- Benetti, D., Garriques, D., y Wilson, E. E. (1998). Maturation, spawning and larval rearing techniques of Pacific yellowtail, *Seriola mazatlana*. *Suisanzoshoku*, 46(3): 391-394.
- Blacio, E.; J. Darquea y S. Rodríguez. (2003). Avances en el cultivo de Huayaípe, *Seriola rivoliana* (VALENCIENNE 1833), en las instalaciones del CENAIM. *El mundo acuícola*. 9(1): 23-24.
- Bourassa, M.W.; Alim, I.; Bultman, S.J.; Ratan y R.R. Butyrate (2016). Neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neurosci. let.*, 625: 56–63; doi: 10.1016/j.neulet.2016.02.009.
- Bretin, A.; Gewirtz, A.T.; Chassaing, B. (2018). Microbiota and metabolism: What's new in 2018? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1, 315, doi: 10.1152/ajpendo.00014.2018.
- Bromage, N.R., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J. and Barker, G. (1992). Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141–166.
- Burgoin-Cota, M. (2015). Estudio de la incorporación de la levadura viva *Debaryomyces hansenii* a través del rotífero *Brachionus rotundiformis* durante los primeros días de desarrollo del jurel *Seriola rivoliana*. CICIMAR-EPN. Tesis de Maestría. 86 pp.
- Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, Sajjan US, Gonzalez CF, *et al.* (2009). Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J Infect Dis*, 2010: 264–271.
- Chang, C.; Lin, H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. (2016). *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, 30, 3–15; doi:10.1016/j.bpg. 2016.02.001.
- Chhibber S, Bansal S and Kaur S. (2015). Disrupting the mixed-species biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO using bacteriophages alone or in combination with xylitol. *Microbiology*, 161: 1369-77.



- Civera-Cerecedo, R.; C. A. Álvarez-González y F. J. Moyano-López. (2004). Nutrición y alimentación de peces marinos. En: Cruz Suárez, L. E.; D. Ricque Marie, M. G. Nieto López, D. Villareal, U. Scholz y M. González. 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Clements, K. D., Angert, E. R., Montgomery, W. L., and Choat, J. H. (2014). Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Mol. Ecol.* 23: 1891–1898. doi: 10.1111/mec.12699
- CONAPESCA. (2013). Anuario. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca de México.
- Cousin, J. C. B.; F. Baudin-Laurencin y J. Gabaudan. (1987). Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus*. *L. J. Fish Biol.* 30: 15-33.
- Crothers-Stomps, C., Høj, L., Bourne, D. G., Hall, M. R., y Owens, L. (2010). Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1744-1750.
- Das, A. P., y Biswas, S. P. (2016). Carotenoids and pigmentation in ornamental fish. *Journal of Aquaculture and Marine Biology*, 4(4): 00093.
- De Paula Silva FC, Nicoli JR, Zambonino-Infante JL, Kaushik S, Gatesoupe FJ, (2011). Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiol Ecol* ,78: 285–296. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01155.x
- De Schryver, P. y Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME journal* 8, 2360–8.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. y Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol* 25, 472–479.
- Defoirdt, T.; P. Sorgeloos y P Bossier. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol.* 14: 251-258.

- Dehasque M, Verdonck, L, Sorgeloos P, Swings J, Léger, P, Kersters K. (1991). Determination of the bacterial contamination in live food production systems in marine fish hatcheries in southern Europe. *Larvi*, 91:399-402.
- Eissa IAM, Derwa HI, Ismail M, El-Lamie M, Dessouki AA, Elsheshtawy H, Bayoumy EM. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Photobacterium damsela* among some marine fishes in Lake Tamsah. *Microbial Pathogenesis*, 114: 315–322.
- Espinoza, N; E. Escala y E. Balacio. (2009). Estudio de la factibilidad técnica del cultivo de huayaipe (*Seriola rivoliana*) en piscinas con y sin geomembranas. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Vidal, A. T., Cerdá, M. J., Martínez, G. P., & Martínez-Llorens, S. (2015). Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PloS one*, 10(8), e0136389.
- FAO. (2017). Higiene y sanidad de los peces. FAO. Programa para la formación de Acuicultores en el centro regional latinoamericano.
- FAO. (2000). El Estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2000. Food & Agriculture Org. Roma. 243 pp.
- FAO. (2012). The State of World fisheries and aquaculture. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries and Aquaculture Dept. 212 pp.
- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO. (2016b). National aquaculture sector overview, Malta. Roma.
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. 233 pp.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in action. Roma and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Farfán-Ortega, F J. (2010). Efecto de una mezcla de Bacteriófagos sobre el recuento de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF, experimentalmente infectados. Universidad de Chile. 71 pp.

- Finn, R. N. y H. J. Fyhn. (1995). Metabolic fuels in developing cod and halibut embryos and larvae. *ICES Mar. Sci. Symp.* 201: 70-73.
- Fortuna, W., Międzybrodzki, R., Weber-Dąbrowska, B., y Górski, A. (2008). Bacteriophage therapy in children: facts and prospects. *Medical Science Monitor*, 14(8), RA126-RA132.
- Frans I, Michaelis Cw, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Redier H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J Fish Dis.* 34: 643-661.
- Froese, R. y D. Pauly. (2010). Editors. Fish Base. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)
- Ganesh, E, Sunita Das, Chandrasekar K, Arun G y Balamurugan S. (2010). Monitoring of total heterophic bacteria and *Vibrio* Spp. In a Aquaculture Pond. *Research Journal of Biological Sciences.* 2 (1): 48-52.
- Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q., y Qin, H. (2015). Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in microbiology*, 6: 20.
- García de la Banda I, Lobo C, León-Rubio JM, Tapia-Paniagua S, Moriñigo MA, García-Millán I, Moreno-Ventas, X. (2009). Administración de dos probióticos relacionados (Pdp11 y Pdp13) en preengorde de lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In XII Spanish Aquaculture Society Meeting (24-26).
- Gasparini, J.L. y S. R. Floeter. (2001). The Shore fishes of Trindade Island, western South Atlantic. *J. Nat.. Hist.* 35: 1639-1656.
- Gauthier, G.; B. Lafay, R. Ruimy, V. Breittmayer, J. L. Nicolas, M. Gauthier, R. Christen. (1995). Small subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurellapiscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* comb nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 45 (1): 139-144.
- Ghanbari M, Kneifel W, Domig KJ, (2015). A new view of the fish gut microbiome: 1 advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448:464–475. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.06.033
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., y Verdegem, M. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific reports*, 5(1), 1-15.

- Golkar, Z.; O. Bagasra y S. G. Pace. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J. Infect Dev Ctries.* 8 (2): 129-136.
- Gomez-Gil B, Herrera-Vega MA, Abreu-Grobois FA, Roque A. (1998). Bioencapsulation of Two Different *Vibrio* Species in Nauplii of the Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol*, 64(6):2318-2322. doi:10.1128/AEM.64.6.2318-2322.1998
- Gorski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, (2012). Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Advances in virus research*, 83: 41-71.
- Govoni, J. J.; G. W. Boehlert y Y. L. Watanabe. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes.* 16 :59-77.
- Greer, G. (2005). Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection.* 68:1102-1111.
- Grossi-Dopico, E. (2010). Primeras experiencias de cultivo larvario del medregal negro (*Seriola rivoliana*, Valenciennes 1833) en Canarias. Tesis de Maestría. Las Palmas de Gran Canaria, España. 151 pp.
- Guzmán-Villanueva LT, Tovar-Ramírez D, Gisbert E, Cordero H, Guardiola FA, Cuesta A, Esteban M.A. (2014). Dietary administration of  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish Shellfish Immunol* 39(1): 34-41 doi:10.1016/j.fsi.2014.04.024
- Guzmán-Villanueva, L. T. (2014). Efecto del  $\beta$ -Glucano 1,3/1,6 sobre la respuesta inmune, la actividad enzimática digestiva y la expresión de genes de *Lutjanus peru* y *Sparus aurata*. Tesis de Doctorado CIBNOR. México. 139 pp.
- Hamasaki K, Tsuruoka K, Teruya K, Hashimoto H, Hamada K, Hotta T, Mushiake K. (2009). Feeding habits of hatchery-reared larvae of greater amberjack *Seriola dumerili*. *Aquaculture* 288:216-225. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.11.032
- Hansen, G. H. H. y Olafsen, J. A. A. (1999). Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microbial Ecology* 38, 1–26.
- Hidaka, T., y Tokushige, A. (1978). Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages in sea water. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University.*

- Higuera, G., Bastías, R., Tsertsvadze, G., Romero, J. y Espejo, R.T. (2013). Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 392, 128–133.
- Hsiao, E.Y.; McBride, S.W.; Hsien, S.; Sharon, E.R.; McCue, T.; Codelli, J.A.; Chow, J.; Reisman, S.E.; Petrosino, J.F.; Patterson, P.H. (2013). Microbiota modulate behavioural and physiological abnormalities associated with neuronal developmental disorders. *Cell*, 155: 1451–1463, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
- Hultberg A, Tremblay D M, De Hard H, Verrips T, Moineau S, Hammaström L and Harold Marcotte. (2007). Lactobacilli expressing llama VHH fragments neutralize Lactococcus phages. *BMC Biotechnology*. 7 (58): 1-7. doi:10.1186/1472-6750-7-58.
- Inal, J. M. (2003). Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Exp*. 51: 237-244.
- INAPESCA. (2004). Manual para el cultivo de *Seriola lalandi* (PISCES: CARANGIDAE) en Baja California Sur México. 49 pp.
- Interaminense JA, Ferreira Calazans, N, do Valle BC, Lyra Vogeley J, Peixoto S, Soares R., Lima Filho, J.V. (2014). *Vibrio* spp. control at brine shrimp, *Artemia*, hatching and enrichment. *J World Aquac Soc*, 45(1): 65-74. doi:10.1111/jwas.12096
- Izquierdo M., Koven W., (2011). Lipids. In: Holt GJ (ed) *Larval fish nutrition*, 1st edn. Wiley, New York, pp 47–81.
- Jerez, S., Samper, M., Santamaría, F. J., Villamandos, J. E., Cejas, J. R., y Felipe, B. C. (2006). Natural spawning of greater amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. *Aquaculture*, 252(2-4), 199–207. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.06.031
- Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia Microbiol* 56(3):191–200.
- Karunasagar I, Shivu MM, Girisha SK, Krohne G, Karunasagar, I. (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268(1-4): 288-292. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.049
- Karunasagar, I., S.K. Otta, I. Karunasagar and K. Joshua. (1996.) Applications of *Vibrio* vaccine in shrimp culture. *Fish. Chim.*, 16(2): 49-50.

- Karunasagar, I.; R. Pai, G. R. Malathi y I. Karunasagar. (1994). Mass mortality of *Panaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 128: 203-209.
- Kawahara, E.; Y. Fokuda y R. Kusuda. (1998). Serological differences among *Photobacterium damsella* subs. *Piscicida* isolates. *Fish Pathology*. 33: 281-285.
- Kejariwal, M. R. (2016). Do You Have Guts to Have Food. *Annals of Woman and Child Health*, 2(4), R13-18.
- Ki Cha, B.; Mun Jung, S.; Hwan Choi, C.; Song, I-D.; Woong Lee, H.; Joon Kim, H.; Hyuk, J.; Kyung Chang, S.; Kim, K.; Chung, W-S.; Seo, J-G. (2012). The effect of a multispecies probiotic mixture on the symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *J. Clin. Gastroenterol*, 46: 220–227, doi: 10.1097/MCG.0b013e31823712b1.
- Kieser, S.; Sarker, S.A.; Sakwinska, O.; Foata, F.; Sultana, S.; Khan, Z.; Islam, S.; Porta, N.; Combremont, S.; Betrisey, B.; *et al.* (2018). Bangladeshi children with acute diarrhea show fecal microbiomes with increased Streptococcus abundance, irrespective of diarrhea etiology. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462–2920.14274.
- Kjørsvik, E. (1994). Egg quality in wild and broodstock cod *Gadus morhua* L. *J World Aquacult Soc* 25, 22-31.
- Korskella, B. y M. A. Brocjhurst. (2014). Bacteria-phage coevolution as a driver of ecologic evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev.* 38 :916-931.
- Korsnes, K., Nicolaisen, O., Skår, C. K., Nerland, A. H., and Bergh, Ø. (2006). Bacteria in the gut of juvenile cod *Gadus morhua* fed live feed enriched with four different commercial diets. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 296–301. doi: 10.1016/j.icesjms.2005.10.012
- Kowalska, J. D., Kazimierczak, J., Sowińska, P. M., Wójcik, E. A., Siwicki, A. K., & Dastyh, J. (2020). Growing Trend of Fighting Infections in Aquaculture Environment—Opportunities and Challenges of Phage Therapy. *Antibiotics*, 9(6), 301.
- Krut O, Bekeredjian-Ding I. (2018). Contribution of the immune response to phage therapy. *J Immunol* 200(9): 3037-3044. doi:10.4049/jimmunol.1701745

- Krut, O., y Bekeredjian-Ding, I. (2018). Contribution of the immune response to phage therapy. *The Journal of Immunology*, 200(9), 3037-3044.
- Labella, A. M., Arahal, D. R., Castro, D., Lemos, M. L., y Borrego, J. J. (2017). Revisiting the genus *Photobacterium*: taxonomy, ecology and pathogenesis. *Int Microbiol*, 20(1), 1-10.
- Laidley CW, Shields RJ, Ostrowski AO. (2004). Progress in amberjack culture at the Oceanic Institute in Hawaii. *Global Aquaculture Advocate*, 7:42-43.
- Lauzon, H. L., Gudmundsdottir, S., Petursdottir, S., Reynisson, E., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., *et al.* (2010). Microbiota of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing systems at pre- and posthatch stages and the effect of different treatments. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1775–1789. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04806.x
- Lazo, J. P.; J. M. Darias y E. Gisbert. (2011). Ontogeny of the digestive tract. 6-46. En Holt, G. J. (Ed.). *Larval fish nutrition*. John Wiley & Sons, Inc. 434 p.
- Lieske, E. y R. Myers. (1994). Collins Pocket Guide. Coral reef fishes. Indo-Pacific & Caribbean including the Red Sea. *Haper Collins Publishers*. 400 pp.
- Lilly, D. M. y R. H. Stillwell. (1965). Probiotics: Growth-Promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147 (3659): 747-748.
- Lin, Y. R., and Lin, C. S. (2012). Genome-wide characterization of *Vibrio* phage phipp2 with unique arrangements of the mob-like genes. *BMC Genomics* 13:224. doi: 10.1186/1471-2164-13-224.
- Liu Y, Brujin I, Kacj ALH, Drynan K, Van den Berg A, Toen E, Sandoval-Sierra V, Van West P, Diéguez-Uribeondo J, Van der Voort M, Mendes R, Mazzola M y Raaijmakers J M. (2014). Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases. *The ISME journal*, 8(10), 2002-2014.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., and Derome, N. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front. Microbiol.* 5:207. doi: 10.3389/fmicb.2014.00207
- Lobo C, García de la Banda, I., León-Rubio, J. M., Moriñigo, M. A., Arijo, S., Moreno-Ventas, X., y Canteras, J. C. (2010). Pdp11 *Shewanella* probiotic addition on larval senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup) culture. In European Aquaculture Society Meeting (5-9).

- Lomelí-Ortega, C. O., Martínez-Sández, A. J., Barajas-Sandoval, D. R., Reyes, A. G., Magallón-Barajas, F., Veyrand-Quíros, B., Gannon, L., Harrison, C., Michniewski, S., Millard, A. y Quiroz-Guzmán, E. (2020). Isolation and characterization of vibriophage vB\_Vc\_SrVc9: an effective agent in preventing *Vibrio campbellii* infections in brine shrimp nauplii (*Artemia franciscana*). *Journal of Applied Microbiology*.
- Macieira RM, Joyeux JC, Chagas LP. (2006). Ambicoloration and morphological aberration in the sole *Achirus declivis* (Pleuronectiformes: Achiridae) and two other cases of color abnormalities in achirid soles from southeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 4(2):287-290. doi:10.1590/S1679-62252006000200016
- Madiga, MT, Martinko JM y Jack Parker. (2006). *Brock-Microbiologie*. Pearson Studium. Alemania.
- Martínez-Díaz, S. F. y A. Hipólito-Morales. (2013). Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shirmp. *Aquacultue*. 400: 120-124.
- Matamp, N. and Bhat, S.G. (2019). Genome characterization of novel lytic Myoviridae bacteriophage  $\phi$ VP-1 enhances its applicability against MDR-biofilm-forming *Vibrio parahaemolyticus*. *Arvh. Virol*. 165 (2), 387-396.
- Matsuzaki, S.; M. Rashel, J. Uchiyama, S. Sakurai, T. Ujihara, M. Kuroda, M. Ikeuchi, T. Tani, M. Fujieda, H. Waiguchi y S. Imai. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases*. 11: 211-219.
- Mayer, E.A.; Tillisch, K.; Gupta, A. Gut/brain axis and the microbiota. *J. Clin. Invest*. (2015). 125, 926–938, doi:10.1172/JCI76304.
- Mazón-Suástegui, J. M., Salas-Leiva, J., Teles, A., y Tovar-Ramírez, D. (2019). Immune and antioxidant enzyme response of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles to ultra-diluted substances derived from phosphorus, silica and pathogenic *Vibrio*. *Homeopathy*, 108(01), 043-053.
- Mazzola, A., Favaloro, E. and Sard, G. (2000). Cultivation of the Mediterranean amberjack, *Seriola dumerili* (Risso, 1810) in submerged cages in the Western Mediterranean Sea. *Aquaculture*, 181: 257 - 268.



- Merino, S., Camprubi, S., y Tomas, J. M. (1990). Isolation and characterization of bacteriophage PM2 from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS microbiology letters*, 68(3), 239-244. J. Munro, J. Oakey, E. Bromage and L. Owens, Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 2003, 187–194.
- Merrifield DL, Harper GM, Dimitroglou A, Ringø E, Davies SJ. (2010). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquacult Res* 41(8): 1268-1272. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02397.x
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bøggwald, J., Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2), 1-18.
- Merrifield, D. L., y Rodiles, A. (2015). “The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues,” in *Mucosal Health in Aquaculture*, ed. E. Peatman (San Diego, CA: Academic Press), 273–295.
- Mesa-Rodríguez, A. (2017). Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larval rearing: skeletal development and effects of increasing dietary DHA levels at weaning phase (Doctoral dissertation).
- Miller, E. S., Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Durkin, A. S., Ciecko, A., *et al.* (2003). Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *J. Bacteriol.* 185, 5220–5233. doi: 10.1128/JB.185.17.5220-5233.2003
- Mirzaei MK y Maurice, CF. (2017). Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nat Rev Microbiol* 15(7):397-408. doi:10.1038/nrmicro.2017.30.
- Mirzaei M K, Eriksson H, Kasuga K, Haggard-Ljungquist E, Nilsson AS. (2014). Genomic, Proteomic, Morphological and Phylogenetic Analyses of vB\_EcoP\_SU10, a *Podoviridae* Phage with C3 Morphology. *PLoS ONE*. 9 (12): e116294. doi:10.1371/journal.pone.0116294.

- Moran, D., Smith, C. K., Gara, B., & Poortenaar, C. W. (2007). Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). *Aquaculture*, 262(1), 95–104. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.10.005
- Morello, E.; E. Sausseureau, D. Maura, M. Huerre, L. Touqui y L. Debarbieux. (2011). Pulmonary Bacteriophage Therapy on *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Strains: First Steps Towards Treatment and Prevention. *PLoS ONE*. 6 (2): e16963. doi:10.1371/journal.pone.0016963.
- Moreno-Figueroa, L. D. (2011). Efecto de la temperatura en el desarrollo larvario temprano de Huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922). Tesis de Maestría. Programa de posgrado del CIBNOR. 62 pp.
- Næss T, Lie Ø. (1998). A sensitive period during first feeding for the determination 1 of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., juveniles: the role of diet. *Aquacult Res* 29(12): 925-934. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.29120925.x
- Nakada, M. (2002). Yellowtail culture development and solutions for the future. *Reviews in Fisheries Science* 10, 559 - 575.
- Nakai, T., y Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in microbiology*, 153(1), 13-18.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K. H., Matsuoka, S., Mori, K. I., Nishioka, T., y Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of aquatic organisms*, 37(1), 33-41.
- Nakai, T., y Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in microbiology*, 153(1), 13-18.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.* 41, 1553–1573. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x
- Nguyen, C. D., Amoroso, G., Ventura, T., Minich, J. J., y Elizur, A. (2020). Atlantic Salmon (*Salmo salar* L., 1758) Gut Microbiota Profile Correlates with Flesh Pigmentation: Cause or Effect?. *Marine Biotechnology*, 1-19.

- Noorlis A.; F. M. Ghazali, Y. K. Cheah, T. C. Tuan Zainazor y H. Ponniah. (2011). Prevalence and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. *Int Food Res J.* 18: 689-695.
- Ortiz-Galindo, J. L. (2010). Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 64 pp.
- Ouwehand, A.C.; Salminen, S.; Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 279–289, doi: 10.1023/A:1020620607611.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., y Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243(1-4), 241-254.
- Papandroulakis N., Mylonas C. Maingot E., Divanach P. (2005). First results of greater amberjack (*S. dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture* 250:155-161. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.036
- Park, S. C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K. I., y Nakai, T. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1416-1422.
- Park, S. C., y Nakai, T. (2003). Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of aquatic organisms*, 53(1), 33-39.
- Patil, J. R.; S. Narayanamurthy Desai, P. Roy, M. Durgaiyah, R. S. Saravanan y A. Vipra. (2014). Simulated hatchery system to asses bacteriophage efficacy agianst *Vibrio harveyi*. *Diseases of aquatic organisms*. 112: 113-119.
- Paule, A., Frezza, D., y Edeas, M. (2018). Microbiota and phage therapy: future challenges in medicine. *Medical Sciences*, 6(4), 86.
- Peña, R. y Dumas, S. (2007). Development of the retina in spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) larvae under culture conditions. *Cienc Mar* 33(3):293-300. doi:10.7773/cm.v33i3.1224
- Phumkhachorn, P. y Rattanachaikunsopon, P. (2010). Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *Afr J Microbiol Res* 4, 1794–1800.

- Picchietti, S., Fausto, A.M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A.R., Buonocore, F., Abelli, L (2009). Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 26(3): 368-376. doi:10.1016/j.fsi.2008.10.008
- Plaza, N., Castillo, D., Pérez-Reytor, D., Higuera, G., García, K. and Bastías, R. (2018). Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. *Electron J Biotechnol* 31, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.10.012>.
- Ponniah, J., Nakaguchi, Y. and Son, R. (2011). Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. *Int Food Res J* 18, 689–695.
- Purchase C.F., Boyce D.L., Brown J.A. (2002). Occurrence of hypomelanization 1 in cultured yellowtail flounder *Limanda ferruginea*. *Aquacult Res* 33(14):1191-1193. doi:10.1046/j.1365-2109.2002.00764.x
- Quiroz-Guzmán E, Peña-Rodríguez A, Vázquez-Juárez R, Barajas-Sandoval DR, Balcázar JL y Martínez-Díaz S.F. (2018). Bacteriophage cocktails as an environmentally-friendly approach to prevent *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* infections in brine shrimp (*Artemia franciscana*) production. *Aquac.* 492:273–279. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.04.025
- Quiroz-Guzmán, E. (2005). Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio spp.* Durante la eclosión de *Artemia*. CICIMAR-IPN. Tesis de maestría. 88 pp.
- Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., y Olsen, Y. (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155(1-4), 103-115.
- Ramirez-Sosa, A. J. (2020). Efecto de la inclusión de GroBiotic®-A en dietas bajas en harina de pescado sobre el desempeño biológico, digestión, salud y microbiota intestinal de *Seriola dorsalis*. Tesis de Maestría. CICESE, Ensenada, Baja California, México.
- Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci* 101(13):4596-4601. doi:10.1073/pnas.0400706101

- Reid, H. I., Treasurer, J. W., Adam, B., y Birkbeck, T. H. (2009). Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae. *Aquaculture* 288, 36–43. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.11.022
- Reitan, K. I., Natvik, C. M. y Vadstein, O. (1998). Drinking rate, uptake of bacteria and microalgae in turbot larvae. *Journal of Fish Biology* 53, 1145–1154.
- Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F.E., Heath A.C., Rohwer F., Gordon J.I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466(7304):334-338. doi:10.1038/nature09199
- Reyes-Becerril, M; F. Ascencio Valle, I. Hiroo, H. Kondo, W. Jirapongpaioj, M.A. Esteban y C. Angulo. (2016). TLR21's agoints in combination with *Aeromona antigens* synergistically up-regulate functional TLR21 and cytokine gene expression in yellowtail leucocytes. *Dev. Comp Immunol.* 61: 107-115.
- Richards, G. P. (2014). Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology. *Bacteriophage.* 4 (4): e975540 1-12.
- Richards, P. J., Connerton, P. L., y Connerton, I. F. (2019). Phage biocontrol of *Campylobacter jejuni* in chickens does not produce collateral effects on the gut microbiota. *Frontiers in microbiology*, 10, 476.
- Riddle M.R., Baxter B.K., Avery B.J. (2013). Molecular identification of microorganisms associated with the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Aquat Biosys* 9(1): 7. doi:10.1186/2046-9063-9-7
- Ringo, E. y Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture research* 30, 73–93
- Ringo, E. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquacult. Res.*, 30, 73-93.
- Rivas, A.J., Lemos, M.L. and Osorio, C.R. (2013). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Front Microbiol* 4, 283.
- Rombout JH, Abelli L, Picchietti S, Scapigliati G, Kiron V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol* 31: 616–626. doi:10.1016/j.fsi.2010.09.001

- Rong, R., Lin, H., Wang, J., Khan, M.N. and Li, M. (2014). Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after bacteriophage application during depuration. *Aquaculture* 418, 171–176.
- Rønnestad, I.; W. M. Koven, A. Tandler, M. Harel y H. J. Fyhn. (1994). Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biol.* 120: 187-196.
- Roo, J.; H. Fernández-Palacios, C. M. Hernández-Cruz, A. Mesa-Rodríguez, D. Schuchardit y M. Izquierdo. (2014). First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquaculture Research*. 45: 689-700.
- Rørbo N, Rønneseth, A, Kalatzis P, Rasmussen B, Engell-Sørensen K, Kleppen HP, Middelboe M. (2018). Exploring the effect of phage therapy in preventing *Vibrio anguillarum* infections in cod and turbot larvae. *Antibiotics* 7:42. doi:10.3390/antibiotics7020042
- Schroeder, B.O.; Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* 22, 1079–1089, doi: 10.1038/nm.4185.
- Sepahi A, Cordero H, Goldfine H, Esteban MA, Salinas, I. (2016). Symbiont-derived sphingolipids modulate mucosal homeostasis and B cells in teleost fish. *Sci Rep* 6(1): 1-13. doi:10.1038/srep39054.
- Serwer, P., Hayes, S.J., Thomas, J.A. and Hardies, S.C. (2007). Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class. *Viol. J.* 4 (21), 1-5.
- Sheppard, M. E. (2005). Aquatic Animal Health Subprogram: detection and management of health issues in yellowtail kingfish (YTK, *Seriola lalandi*) – the foundation for a health program for Australia finfish aquaculture. Deakin, A. C. T.: Fisheries Research and Development Corporation.
- Shivu, M. M., Rajeeva, B. C., Girisha, S. K., Karunasagar, I., Krohne, G., & Karunasagar, I. (2007). Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environmental microbiology*, 9(2), 322-331.
- Sicuro, B., y Luzzana, U. (2016). The state of *Seriola* spp. other than yellowtail (*S. quinqueradiata*) farming in the world. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4), 314-325.

- Silva- Rubio. A. A. (2007). Caracterización molecular y serológica de agentes causales de Vibriosis en salmónidos en el sur de Chile. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile. 84 pp.
- Silva, Y. J.; L. Costa, C. Pereira, C. Mateus, A. Cunha, R. Calado, N. C. M. Gomes, M. A. Pardo, I. Hernandez, A. Almeida. (2014). Phage Therapy as an Approach to Prevent *Vibrio anguillarum* Infections in Fish Larvae Production. PLoS ONE. 9 (12): e114197. doi:10.1371/journal.pone.0114197.
- Sinagra, E.; Tomasello, G.; Cappello, F.; Leone, A.; Cottone, M.; Bellavia, M., Rossi, F.; Facella, T.; Damiani, P.; Zeenny, M.N.; (1999). Probiotics, prebiotics and symbiotics in inflammatory bowel diseases: State-of-the-art and new insights. J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 27:919–933.
- Siwichi, A. K. (1998). Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp *Cyprinus carpio*. L. Dev Comp Immunol. 13: 87-91.
- Spencer, R. (1963). Bacterial viruses in the sea. In "Symposium on marine microbiology", p. 350-365, ed. by Oppenheimer, C. H., Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Stalin, N. y Srinivasan, P. (2016). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phage from shrimp pond in Palk Strait, South East Coast of India. Biologicals 44 (6), 526–533.
- Stevenson, R. M. W., y Airdrie, D. W. (1984). Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages. Applied and environmental microbiology, 47(6), 1201-1205.
- Sulakvelidze, A.; Z. Alavidez y J.G. Morris. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45 (3): 649-659.
- Tachihara K, El-Zibdeh MK, Ishimatsu A, Tagawa M. (2007). Improved seed production of goldstriped amberjack *Seriola lalandi* under hatchery conditions by injection of triiodothyronine (T3) to broodstock fish. J World Aquacult Soc 28:34-44. doi:10.1111/j.1749-7345.1997.tb00959.x
- Telechea, F. y Fontaine, P. (2014). Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. Fish Fisheries, Vol. 15, 181-195.

- Teles, A., Salas-Leiva, J., Alvarez-González, C. A., y Tovar-Ramírez, D. (2019). Changes in digestive enzyme activities during early ontogeny of *Seriola rivoliana*. *Fish physiology and biochemistry*, 45(2), 733-742.
- Teles, A., Salas-Leiva, J., Alvarez-González, C. A., Gisbert, E., Ibarra-Castro, L., Urbiola, J. C. P., y Tovar-Ramírez, D. (2017). Histological study of the gastrointestinal tract in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larvae. *Fish physiology and biochemistry*, 43(6), 1613-1628.
- Tkavc R, Ausec L, Oren A, Gunde-Cimerman N. (2011). Bacteria associated with *Artemia* spp. along the salinity gradient of the solar salterns at Eilat (Israel). *FEMS Microbiol Ecol* 77(2):310-321. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01112.x
- Toranzo AE, Barreiro S, Casal JF, Figueras A, Magariños B, Barja JL. (1991). Pasteurellosis in cultured gilthead seabream, *Sparus aurata*: First report in Spain. *Aquaculture* 99:1-15. doi:10.1016/0044-20 8486(91)90284-E
- Tovar-Ramírez, D., Teles, A., Salas-Leiva, J., Hernández Contreras, A., Asencio-Alcudia, G., Du, L., Bugoin-Cota, M., Alvarez-González, C., Llera-Herrera, R., Gisbert, E., Fernández Monzón, I., Perez-Urbiola, J.C., Ibarra, L., Mazón-Suástegui, M., Nuñez-Vazquez, E., Guzmán-Villanueva, L., y Reyes-Becerril, M. (2017). Enfoques Transcriptómicos en el Jurel *Seriola rivoliana*. 389-405.
- Tucker, J. W. (1998). *Marine Fish Culture*. Kluwer Academic Publisher. Norwell, Massachussets. Estados Unidos. 750 pp.
- Vadstein O, Bergh Ø, Gatesoupe FJ, Galindo-Villegas J, Mulero V, Picchiatti S, Scapigliati, G, Makridis P, Olsen Y, Dierckens K, Defoirdt T, Boon N, De Schryver, Bossier P. (2013). Microbiology and immunology of fish larvae. *Rev Aquacult* 5:S1–S25 doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655–671.
- Verschuere, L.; G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Vertraete. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (4): 655-671.



- Veyrand-Quirós B, Gómez-Gil B, Lomelí-Ortega CO, Escobedo-Fregoso C, Millard AD, Tovar-Ramírez, D, Balcázar JL, Quiroz-Guzmán E, (2020). Use of bacteriophage vB\_Pd\_PDCC-1 as biological control agent of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* during hatching of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) eggs. *J Appl Microbiol* 129:1497-1510 doi:10.1111/jam.14744
- Viader-Guerrero, M. (2019). Influencia de la temperatura sobre el desarrollo larval temprano del jurel *Seriola rivoliana* (Master's thesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC).
- Vinod MG, Shivu MM, Umesha KR, Rajeeva BC, Krohne G, Karunasagar I, Karunasagar I. (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255(1-4):117-124. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.12.003
- Vinod, M. G., Shivu, M. M., Umesha, K. R., Rajeeva, B. C., Krohne, G., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255(1-4), 117-124.
- Vitetta, L., Vitetta, G., & Hall, S. (2018). Immunological tolerance and function: associations between intestinal bacteria, probiotics, prebiotics, and phages. *Frontiers in immunology*, 9, 2240.
- Wang N. (2006). Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics*. 172(1):17–26
- Wu, J. L., Lin, H. M., Jan, L., Hsu, Y. L., y CHANG, L. H. (1981). Biological control of fish bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*, by bacteriophage AH 1. *Fish pathology*, 15(3-4), 271-276.
- Yamaki, S., Kawai Y. and K. Yamazaki. (2015). Characterization of a novel bacteriophage, Phda1, infecting the histamine-producing *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.
- Yamamoto, T. S. y W. Kobayashi. (1992). Closure of micropyle during embryonic development of some pelagic fish eggs. *J. Fish Biol.* 40: 225-241.
- Yoseda K, Yamamoto K, Asami K, Chimura M, Hashimoto K, Kosaka S. (2008). Influence of light intensity on feeding, growth, and early survival of leopard coral grouper (*Plectropomus*

- leopardus) larvae under mass-scale rearing conditions. *Aquaculture* 279(1-4):55-62. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.04.002
- Yuan, Y. and Gao, M. (2017). Jumbo Bacteriophages: An Overview. *Front. Microbiol.* 8 (403), 1-9.
- Yúfera M (2018) *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer. Ed 2018. USA.
- Yúfera M, Darias MJ (2007) The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268:53-63. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.050
- Zachary, A. (1976). Physiology and ecology of bacteriophages of the marine bacterium *Beneckeana natrigens*: salinity. *Appl Environ Microbiol.* 31 (3): 415-422.
- Zambonino-Infante, J. L.; E. Gisbertm C. Sarasquetem I. Navarro J. Gutiérrez y C. L. Cahu. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *Feeding and Digestive Functions of fishes*. 281-348.
- Zhang, L.; D. Xu, Y. Huang, X. Zhu, M. Rui, T. Wan, X. Zheng, Y. Shen, X. Chen, K. Ma y Y. Gong. (2017). Structural and functional Characterization of deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 HNH endonuclease. *Scientific Reports*. 42542.
- Zheng, D. W., Dong, X., Pan, P., Chen, K. W., Fan, J. X., Cheng, S. X., y Zhang, X. Z. (2019). Phage-guided modulation of the gut microbiota of mouse models of colorectal cancer augments their responses to chemotherapy. *Nature biomedical engineering*, 3(9), 717-728.
- Zheng, N. H. Wu, Y H. Zhang. (2016). Maternal transfer and protection role in zebrafish (*Dania rerio*) offspring following vaccination of the brood stock with a live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine. *Aquac. Res.* 47 (11): 3667-3678.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1: Fijación

Los tejidos se fijaron en solución Davidson para organismos marinos, durante 48 hr. Cambiar a alcohol etílico al 70% transcurridas las 48hr.

Formulación de la solución Davidson (1 galón stock)

REACTIVO	CANTIDAD (ml)
Glicerina	400 ml
Formaldehído	800 ml
Alcohol etílico 95%	1200 ml
Agua de mar filtrada *	1200 ml
Ácido acético**	(1:9)

Stock: glicerina, formaldehído, alcohol etílico y agua de mar.

\*\* Agregar una parte de ácido acético por 9 del stock en el momento de usarse. (Por ejemplo 900 ml de stock más 100 ml ácido acético). De preferencia almacenar a 4°C

## **Anexo 2: Técnica de Inclusión en Parafina**

### Deshidratación

- Alcohol etílico 70% I y II (una hora c/u) (larvas y huevos 30 min c/u.)
- Alcohol etílico 80° (1 hora para tejidos grandes ) (larvas y huevos 30 min.)
- Alcohol etílico 90° (1 hora) (larvas y huevos 30 min.)
- Alcohol etílico 96° I y II (una hora c/u) (larvas y huevos 30 min.)
- Alcohol etílico 100 I, II, III (1 hora en c/u) (larvas y huevos 30 min.)
- Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1) 20 minutos. (tiempo crítico)
- Xilol absoluto (100 %) 5-10 minutos. (tiempo crítico)

### Infiltración en parafina

- Parafina-xilol (1:1) 30 minutos (tiempo crítico, no dejar más tiempo)
- Parafina (Paraplast) I (1 a 2 horas)
- Parafina (Paraplast) II (1 a 2 horas)
- Parafina (Paraplast) III (1 a 2 horas)
- Parafina (Paraplast) IV (1 a 2 horas para tejidos muy grandes)

Corte en micrótopo de rotación a 4 micras

**Anexo 3: Técnica de Tinción Hematoxilina Eosina**

- 1.-Xilol I, II y III-(10 min en cada uno).
- 2.-Alcohol etílico 96% (2 min).
- 3.- Alcohol etílico 70% I y 70% II- 2 min c/u
- 4.-Agua destilada 5 min.
- 5.-Hematoxilina de Harris 4 min (dependiendo del tipo de hematoxilina y del tiempo de uso del colorante) (si se usa natural, 4 minutos, si es sintética 12 min)
- 6.-Agua corriente 5 min y agua destilada 5 min
- 7.-Alcohol ácido 10-15 segundos (1 L alcohol 96% con 5 gotas de ácido clorhídrico)
  
- 8.- Agua destilada 5 min
- 9.- Agua amoniacal (hidróxido de amonio, 5 gotas por caja de tinción)10-15 segundos
- 10.-Agua destilada 5 min
- 11.-Alcohol etílico 50% 2 min
- 12.- Alcohol etílico al 70% 2 min
- 13.- Eosina-Floxina alcohólica- 3 min (dependiendo del tiempo del colorante)
- 14.- Alcohol 96% I y II, 1-2 min c/u
- 15.- Alcohol 100% I y II, 1 min c/u
- 16.- Citrisolv I I, II, III (sustituto de xileno ó Hemo-De) 5 min c/u.
- 17.- Montar en resina sintética o Entellan.

Resultados:

Nucleos- color azul a morado

Citoplasmas- naranja-rojo-rosa

