

# Evaluación de la carga bacteriana y resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en zonas marinas de alta influencia de producción larvaria en Ecuador

Evaluation of the bacterial load and antibiotic resistance of isolated of marine bacteria in marine areas of high influence of larval production in Ecuador

Mendoza S.<sup>1,2</sup>, Tinoco Gómez O.<sup>2</sup>, Nieto K.<sup>3</sup>

RECIBIDO: 20/10/2016 - APROBADO: 17/11/2016

## RESUMEN

Ante la continua incidencia de muertes ocurridas en los cultivos larvarios de Mar Bravo, se consideró pertinente levantar información de las cargas bacterianas de la zona de estudio de muestras de aguas de mar al ingreso de los laboratorios, perfil costero, de mar abierto, descargas de tanques de cultivos y de descargas tratadas. Los muestreos fueron realizados en ambas estaciones, tanto en la época seca como en la estación lluviosa. Las muestras de agua fueron sembradas en agar para *Vibrios* TCBS y TSA, para su cuantificación, y pruebas posteriores de antibiograma para medir su resistencia a antibióticos e identificación bioquímica, empleando el método miniaturizado (Solís, 1996). Los análisis microbiológicos permitieron conocer las ufc.ml en los puntos analizados, así como la presencia de luminiscencia en las cepas bacterianas, factor relacionado con respuesta de quorum sense, comunicación entre bacterias con patogenicidad y posible muerte de animales domesticados. La caracterización bioquímica de 132 cepas bacterianas permitió determinar, de acuerdo a la estacionalidad, una compatibilidad superior al 65 % de identificación por el método miniaturizado empleado por Solís (1996). Existe una presencia del 38 % de *Vibrio parahaemolyticus*; seguido de *V. alginolyticus* con 21 %; *V. harveyi* junto con *V. damsela* con 6 %; *V. splendidus I.* con 5 %; *V. nereis*, *V. fischeri*, *V. anguillarum* con 3 % cada uno; *V. vulnificus*, *V. tubiashi*, *V. splendidus II*, *V. marinus*, *V. cholerae*, *V. campbelli* con 2 % correspondientemente; y el organismo con menor prevalencia fue *V. logei*, con 1%. Las cepas que se encontraron resistentes en los antibiogramas, 26 %, respondieron a los géneros de *Vibrio tubiashii* y *Vibrio cholera*; otras cepas reportadas presentaron porcentajes de resistencias inferiores. Esta comparación nos permitió determinar si la producción larvaria impacta negativamente sobre el medio ambiente o si son las condiciones estacionales las que producen una variabilidad bacteriana modificando los géneros bacterianos existentes, provocando pérdidas por mortalidades en los sistemas de cultivos y alteraciones en el medio marino. Las características macroscópicas de las cepas mayormente encontradas reportaron que los diplococos y cocos se encuentran en un porcentaje superiores al 40 %, morfologías de streptococos (9.1 %), siendo de menor prevalencia los tetracocos (5.1%); algunas de estas características macroscópicas se encuentran ausentes en algunos muestreos y reaparecen en otros, lo que indica que la estacionalidad influye sobre la morfología bacteriana.

**Palabras clave:** Cargas bacterianas, actividad antimicrobiana, larvicultura, microbiología, bioquímica.

## ABSTRACT

Given the continuing incidence of mortality occurred in the larval cultures Mar Bravo, it was considered appropriate to remove information from bacterial loads of the study area of water samples of shrimp laboratories, open sea, downloads tanks crops and downloads treated. The samplings were conducted at both stations both in the dry season and the rainy season. Water samples were seeded in *Vibrio* TCBS agar and TSA, for quantification, and subsequent tests to measure their resistance antibiotic and biochemical identification using the miniaturized method (Solís, 1996). Microbiological analyzes allowed to know the ufc.ml. in the points analyzed, and the presence of luminescence in the bacterial strains associated with response factor quorum sense, communication between pathogenic bacteria and possible death of domesticated animals. The biochemical

1 Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). E-mail: sonnya.mendoza@gmail.com

2 Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3 Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE).

characterization of bacterial strains allowed 132 determined according to seasonal superior compatibility to 65% by the method of identification used by miniaturized Solis (1996), there is a presence of 38% *V. parahaemolyticus*; *V. alginolyticus* followed by 21%; *V. damsela* *V. harveyi* with 6%; *V. I. splendidus* with 5%; *V. nereis*, *V. fischeri*, *V. anguillarum* with 3% each; *V. vulnificus*, *V. tubiashi*, *V. splendidus II*, *V. marinus*, *V. cholerae*, *V. campbelli* with 2% correspondingly; and the body lower prevalence was *V. logei* with 1%. For resistant strains were found in 26% susceptibility testing; responded to genres tubiashii and *Vibrio Cholera Vibrio*, other strains showed percentages reported lower resistance. This comparison enabled us to determine whether the larval production negatively impacts on the environment or are seasonal conditions which produce a bacterial variability by modifying existing bacterial genera, causing losses mortalities in cropping systems and changes in the marine environment The Macroscopic Characteristics of the strains mostly found, reported that diplococos and coconuts are at a higher percentage than 40%, morphologies of streptococcus in a (9.1%) being the tetracos the lowest prevalence (5.1%), some of these macroscopic features are absent in some samples and re appear in other, which indicates that seasonality influences the bacterial morphology

**Keywords:** Bacterial loads , antimicrobial activity, Larviculture, Microbiology , Biochemistry.

## I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la cría del camarón en cautiverio ha creado condiciones artificiales en los cuerpos de aguas, tanto de los afluentes como de los efluentes, influenciando el ecosistema natural por aporte de nutrientes y altas cargas de materia orgánica. Estas pueden ser limitantes para bacterias y algas, provocando una selección de condiciones que alteran la dinámica poblacional, presentando enfermedades por presencia de cepas patógenas, las que conllevan pérdidas en las producciones de cultivo y en algunas ocasiones impactan sobre el medio ambiente (Lightner, 2012) (Kobayashi, 2011) (Marriott, 2003) (Leyva, 2010). Estas descargas pueden ser aprovechadas por microorganismos del medio natural, causando modificaciones en las poblaciones bacterianas de esas aguas (Borbor, 2005). Estas alteraciones, de alguna manera, provocan una selección, adaptación y presencia de las comunidades bacterianas que son parte de la flora normal de los organismos acuáticos, causando un posible desplazamiento bacteriano de las poblaciones nativas, impactando el ecosistema natural, así como a los sistemas productivos, produciendo pérdidas económicas (Hernández et al., 2005).

El mayor problema que enfrenta la industria de la acuicultura (*Litopenaeus vannamei*) son las enfermedades causadas por bacterias del género *Vibrio sp.*, asociadas con mortalidades de hasta un 100 % en menos de 24 horas posinfecciones ante condiciones de estrés (Aguirre et al., 2013). En Ecuador, estas mortalidades ocurridas en los laboratorios de larvas de camarón han reportado pérdidas masivas de producción por afectaciones patológicas, como son el síndrome de bolitas y síndrome de zoeas, cuyos agentes son el *Vibrio harvey* y *V. penaeicida* respectivamente, provocando pérdidas significativas. (Cabello, 2004). Las principales especies que han sido reportadas como causantes de infecciones en larvicultura de camarones (*Fenneropenaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *P. semisulcatus*, y *L. vannamei*) son: *Vibrio campbellii*, *V. harveyi*, y *V. parahaemolyticus.*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. pe-*

*naecida*, *V. vulnificus* y *V. damsela*. (Ibarra et al., 2007). Las mortalidades que son generadas a causa de *Vibrio spp.* se pueden incrementar cuando la población de estas bacterias aumenta en los tanques de cultivo (Abraham, 2006).

Esta problemática ha levantando interrogantes donde se cuestiona sobre si las alteraciones y características patológicas son consecuencia de manejos inadecuados o son por alteraciones en los ecosistemas naturales por condiciones ambientales modificadas (Thompson y Swings, 2006) (Rodríguez-Camacho et. al., 2007).

Estas alteraciones, acompañadas del uso de productos terapéuticos y profilácticos, han sido incorporadas en las estrategias de manejos de los laboratorios de larvas de camarón de la zona de Mar Bravo, como medidas de aseguramiento de la calidad para la prevención de mortalidades por enfermedades bacterianas. Algunos de estos productos son considerados como amigables con los ecosistemas (Thimmalapura et al., 2006) (Lightner, 2003) y otros pueden ser de carácter contaminante, si son empleados en concentraciones o frecuencias equívocas, que en lugar de proporcionar una ayuda causen un deterioro al sistema, acumulación y metabolización distinta en cada aplicación, provocando una reacción cruzada con el consumidor final: el hombre. Se ha detectado que el uso de antibióticos en sistemas acuícolas causa alteraciones de las bacterias sistémicas causantes de enfermedades en humanos, lo que ha provocado una alteración de la sensibilidad de las bacterias frente a estos antibióticos en enfermedades humanas (Cabello, 2002) (Cabello, 2003) (Frankel et. al., 2012) (Chandraka, 2014). Es por esto que estudios de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los adaptados para el manejo de las cepas bacterianas (Isbary et al., 2010).

En la actualidad, en el Ecuador, no se conocen predictores ambientales claros de contaminación basada en concentraciones de bacterias tipo *Vibrios sp.*, ya que las bacterias que se incluyen para el control de contamina-

ciones ambientales son las *enterobacterias* del género *Coliformes fecales*, lo que hace importante el levantamiento de información para futuras regulaciones y controles de ambientes marinos.

Ante la falta de sociabilización de información sobre la variabilidad bacteriana de la zona, el panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito, por el momento, mecanismos de resistencia, permitirá tener estrategias de control ante futuros brotes bacterianos (Cayre, 2001) (Zhou, 2012) (García, 2000).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño

#### 2.1.1. Microbiología

Las muestras de agua fueron sembradas por triplicado en placas con agar TCBS por su especificidad para cultivos de *Vibrios sp.* y en agar universal con la variante de sal, empleando TSA sin sal y TSA con una concentración de 5 % de cloruro de sodio. Las muestras fueron sembradas según el método de las diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000, por siembra de vertido, empleando 1 ml de muestra; posteriormente fueron incubadas a  $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; para su posterior cuantificación, se realizó la estimación de las unidades formadoras de colonias por ml (ufc-ml.) y verificación de luminiscencia (modificado de Cuellar, 2008).

#### 2.1.2. Bioluminiscencia

El proceso de análisis de bioluminiscencia fue complementario al proyecto, que ayudó a la determinación de cepas posiblemente patógenas en cada placa mediante la diferenciación de ellas. Su detección se realizó en un cuarto oscuro, diferenciándolas sobre cada placa con marcador permanente, para su posterior resiembra, antibiograma y congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  (modificado de Vezzulli et al., 2010), (Jawahar, 1997).

#### 2.1.3. Tinción de Gram

Se basó en el método establecido por Ligthner (1996), el cual es determinado como el método estándar para la diferenciación de Gram+ y Gram-.

#### 2.1.4. Método de antibiograma disco-placa

Se utilizó el método disco-placa realizado por Bauer, Kirby y colaboradores (1962), el cual es recomendado por el

NCCLS para la determinación de la sensibilidad bacteriana ante antimicrobianos.

#### 2.1.5. Bioquímica bacteriana

Se basó en el método miniaturizado de pruebas bioquímicas establecido por Solis (1996).

### 2.2. Entorno

Este estudio fue realizado en la provincia de Santa Elena, sector de Mar Bravo, parroquia José Luis Tamayo, cantón Salinas, zona donde se desarrolla el 70 % de la producción de larvas de camarón del Ecuador (Figura N° 1).

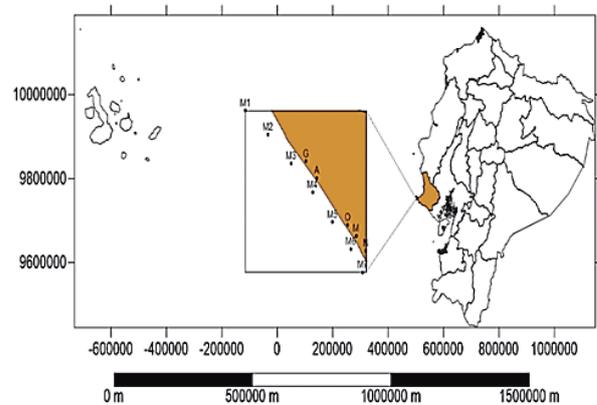


Figura N° 1. Mapa geográfico del área de estudio. Provincia de Santa Elena.

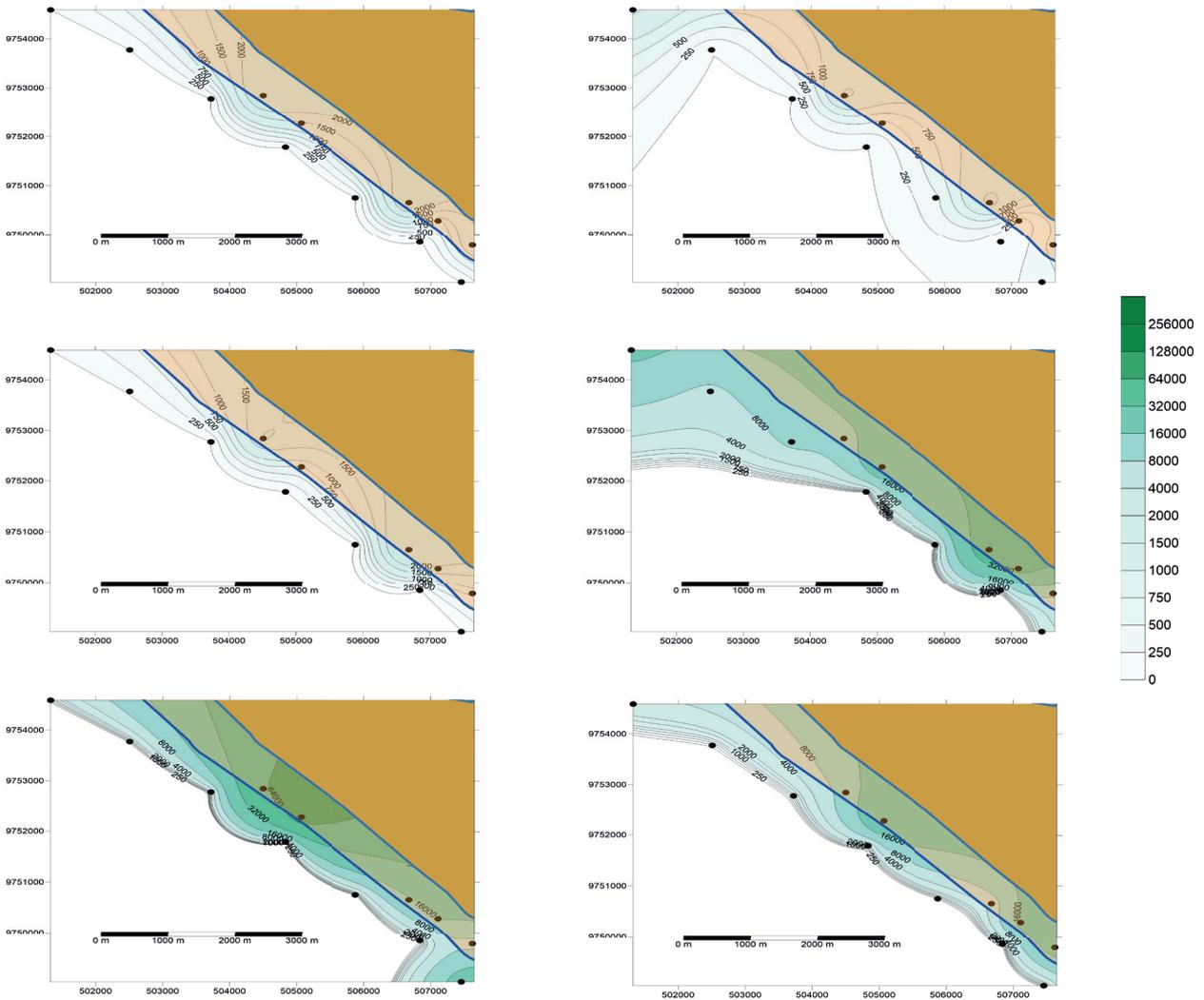
Los muestreos se realizaron en sitios determinados por GPS. Dentro de las descargas de los laboratorios de la zona de estudio, así como en las salidas de aguas tratadas. Las muestras de mar se tomaron de la toma de agua de los laboratorios. Las muestras fueron guardadas en hielera a  $4^{\circ}\text{C}$  para su posterior traslado al laboratorio y realización de análisis inmediato (modificado Gonzalez, 2003).

### 2.3. Análisis estadístico

Para el respectivo análisis estadístico, se realizaron pruebas de regresión lineal, gráficas de series de tiempo, gráficas de barras y gráficas circulares, junto con análisis de X-barras y de residualidad para la confiabilidad de los resultados. Esto por medio del programa de análisis estadístico Minitab Statistical Software en su versión 17, también se realizó el análisis de gráficos de contorno para comparar cargas bacterianas de muestreos de ambas estaciones mediante el empleo de Surfer 11.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Resultados



Figuras N° 2 y 3. (Superior Izq., Der.) Carga bacteriana presente en muestreos 2 y 3, respectivamente.

Figuras N° 4 y 5. (Centro Izq., Der.) Carga bacteriana presente en muestreos 4 y 5 respectivamente.

Figuras N° 6 y 7. (Inferior Izq., Der.) Carga bacteriana presente en muestreos 6, 7 respectivamente.



Figura N° 8. Carga bacteriana de época seca (en agar universal).



Figura N° 9. Carga bacteriana de época lluviosa (en agar universal).

Comparando las cuantificaciones en agar TSA, universal, tanto con sal como sin sal, reflejan cuantificaciones mucho más altas para las zonas de las descargas con respecto a las reportadas para el agar TSA en agua de mar y en el agua de la playa (Véase Figuras N° 8 y 9).

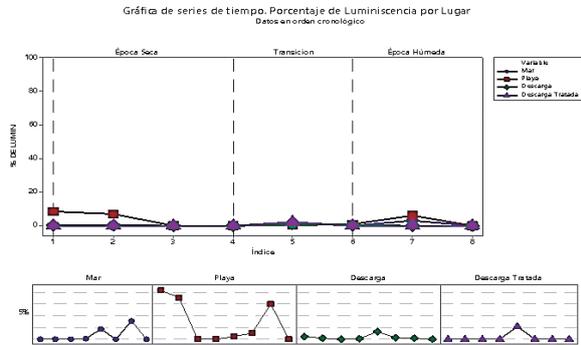


Figura N° 10. Porcentaje de luminiscencia por lugar.

El porcentaje de cepas bioluminiscentes (Figura N° 10) presentes, en mayor cantidad en el mar (=3%) y la playa (=8%), no repercute en las cantidades presentes en las aguas de descargas (=1%) y descargas tratadas (=2%) de los cultivos.

La sensibilidad de las cepas bacterianas aisladas a partir de organismos con bioluminiscencia presentes en las placas son susceptibles =64%, intermedio =13% y resistentes =23% en promedio; este último porcentaje resulta importante de analizar debido a que los antimicrobianos utilizados son de amplio espectro y la presencia de resistencias indica que ciertos organismos generaron resistencia ante ciertos antibióticos.

El porcentaje específico de cepas resistentes a los antimicrobianos utilizados en las pruebas de sensibilidad presentaron una mayor resistencia a los antibióticos, tales como amoxicilina (AX)(30µg) (=65%), kanamicina (K) (30µg) (=11%), mycomicina (MY)(30µg) (=48%) y oxitetraciclina (Oxi)(30µg) (=20%). En la Figura N° 11 no se consideran los siguientes antibióticos: ciprofloxacino (5µg), enrofloxacina(5µg), florfenicol(30µg) y norfloxacino (10µg), debido a que su sensibilidad ante los antibióticos mencionados fue relativamente alta (=90±5%) durante los muestreos.

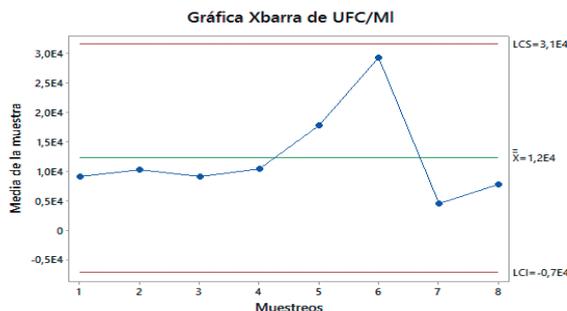


Figura N° 11. Gráfica de XBarra para los muestreos.

El analisis por Xbarra, durante este periodo de estudio, indica la confiabilidad de los resultados obtenidos para ambas épocas del año, debido a que estos valores se encuentran dentro de los limites de confianza superior e inferior, a 3 desviaciones estandar, con una media de =1.2E4 UFC/ml (Unidades formadoras de colonias por ml). Figura N° 12.

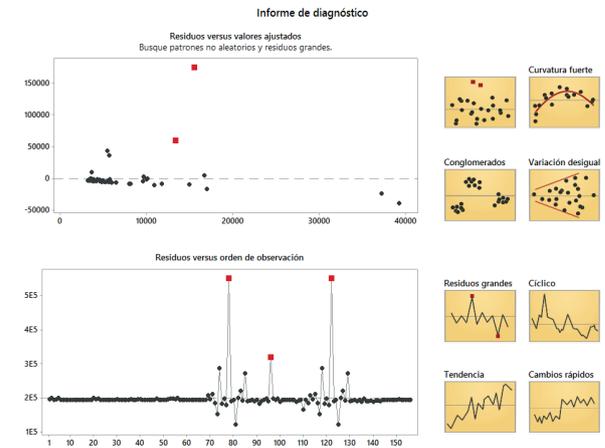


Figura N° 12. Dispersión de residuos para las observaciones totales.

La presencia de residuos en un orden cíclico conlleva la determinación de la existencia de puntos de observación que poseen una variación de la carga bacteriana en ciertos periodos de tiempo, probablemente el efecto del manejo técnico de las áreas de producción es el causante de estas áreas de variabilidad aisladas. Figura N° 13

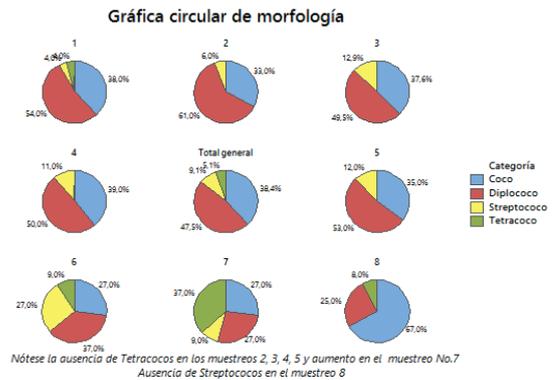


Figura N° 13. Gráfica circular de morfología presente.

Con respecto al análisis morfológico de las cepas, refleja que existe una prevalencia de las bacterias con forma de diplococos (47.9%), seguido de cocos (38.4%), luego streptococos (9.1%) y con menor prevalencia dentro de los muestreos de las cepas de forma tetracocos (5.1 %); también se observa la variabilidad de la presencia de ciertas cepas con forma de streptococos, las cuales se encuentran ausentes en el 8vo muestreo correspondiente a la época húmeda. Es notable la ausencia total de tetracocos durante los muestreos 2, 3, 4, 5, los cuales aumentan significativamente durante el séptimo muestreo, todos correspondientes a la época seca (>28%). Figura N° 13.

Tabla N° 1. Resultado de pruebas bioquímicas obtenido

cepas	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	Especie	% compati- bilidad
1.1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	<i>V. fischeri</i>	68%
3.1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
4.1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0	0	<i>V. fischeri</i>	68%
6.1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. tubiashii</i>	75%
7.1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. harveyi</i>	63%
8.1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
9.1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	63%
10.1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	2	1	0	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	63%
11.1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	63%
12.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
13.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
14.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
15.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
16.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
17.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
18.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
19.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
20.1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
21.1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	<i>V. vulnificus</i>	75%
22.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
23.1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
24.1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	0	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
25	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. logei</i>	69%
26	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	<i>V. fischeri</i>	75%
27	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. tubiashii</i>	75%
28	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
1.2	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
2.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
3.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
4.2	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
5.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
5".2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
6.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	2	1	0	1	0	<i>V. vulnificus</i>	63%
7.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	2	<i>V. alginolyticus</i>	69%
7A.2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%
8.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	63%
10A.2	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	63%
10.2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%
11.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
16.2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
17.2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	<i>V. fischeri</i>	57%
19.2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%
20.2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%
22.2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	<i>V. cholerae</i>	69%
23.2	1	1	1	1		0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	69%
1.3	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	69%
2.3	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	69%
cepas	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	especie	%compati- bilidad
3.3	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	63%
4.3	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	63%
5.3	1	1	1	0	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
6.3	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	63%
7.3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	<i>V. campbelli</i>	56%
7A.3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	<i>V. campbelli</i>	56%

9 <sup>o</sup> .3	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
9.3	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%
10.3	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%
11.3	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	<i>V. damsela</i>	69%	
13.3	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	63%	
14.3	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	<i>V. damsela</i>	69%	
15.3	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
17.3	1	1	1	1	1	0	0	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. harveyi</i>	69%	
1.4	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	0	<i>V. harveyi</i>	69%	
2.4	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
3.4	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%	
4.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0	<i>V. cholerae</i>	63%	
5.4	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	2	<i>V. anguillarum</i>	82%	
6.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
7.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
8.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
9.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
10.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	2	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	75%	
11.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	2	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
12.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
14.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
15.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	63%	
16.4	1	1	1	1	1	0	1	0	0	2	1	1	1	1	1	1	<i>V. alginolyticus</i>	56%	
17.4	1	1	1	0	1	0	1	0	2	1	2	1	1	0	1	0	<i>V. harveyi</i>	56%	
18.4	1	1	1	0	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. harveyi</i>	69%	
19.4	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. harveyi</i>	69%	
1.5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. damsela</i>	63%	
2.5	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	2	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
3.5	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%	
4.5	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%	
5.5*	1	1	1	1	0		1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%	
5.5	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. marinus</i>	69%	
6.5	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. marinus</i>	69%	
7.5	1	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	<i>Pseudomonas spp.</i>	50%	
8.5	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
9.5	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	75%	
10.5	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. damsela</i>	75%	
11.5	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	63%	
12.5	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
13.5	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
14.5	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
cepas	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	especie	%compati- bilidad	
15.5	1	1	1	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	<i>V. campbelli</i>	75%	
16.5	1	1	1	0	1	0	0	1	0	2	1	0	2	0	0	0	<i>V. damsela</i>	75%	
17.5	1	1	1	1	0	2	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
18.5	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
1.6	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
3.6	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
4.6	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
5.6	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	63%	
6.6	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%	
7.6	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	69%	
8.6	1	1	1	1	1	0	1	0	2	2	2	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%	
10.6	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	1	1	1	1	0	<i>V. harveyi</i>	69%	
11.6	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	2	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%	
12.6	1	1	1	0	1	0	1	0	2	1	2	1	1	0	1	0	<i>V. alginolyticus</i>	69%	
1/7	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. splendidus l.</i>	81%	

3/7	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	<i>V. splendidus I.</i>	81%
4/7	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. damsela</i>	69%
6/7	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	<i>V. splendidus I.</i>	75%
7/7	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	<i>V. hollisae</i>	81%
8/7	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	<i>V. splendidus I.</i>	69%
9/7	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. damsela</i>	75%
11/7	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>V. splendidus I.</i>	81%
12/7	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	<i>V. splendidus II.</i>	69%
13/7	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	<i>V. nereis</i>	69%
15/7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. nereis</i>	69%
1/8	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>V. splendidus II.</i>	69%
2/8	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	<i>V. harveyi</i>	75%
3/8	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	<i>V. anguillarum</i>	75%
4/8	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	<i>V. nereis</i>	75%
5/8	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	<i>V. splendidus II.</i>	75%
5A/8	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	<i>V. marinus</i>	75%
6/8	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>V. splendidus I.</i>	81%
8/8	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	<i>V. anguillarum</i>	69%
9/8	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	<i>V. nereis</i>	69%
11/4	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	<i>V. anguillarum</i>	81%
12/8	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	<i>V. anguillarum</i>	75%
15/8	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>V. damsela</i>	69%

P1: 0% CIna P2:0F (0) P3:0F(F) P4:Indol P5:Voges-Proskauer P6:Citrato Simmons P7:Ornitina Descarboxilasa P8:Arginina Dihidrolasa P9:L-Arabinosa P10:Celobiosa P11:D-Manosa P12:D-Manitol P13:Sucrosa P14:D-Glucuronato P15:D-Gluconato P1:D-Galactosa

Los resultados de las bioquímicas realizadas muestran la presencia del 38 % de *Vibrio parahaemolyticus*; seguido de *V. alginolyticus* con 21 %; *V. harveyi* junto con *V. damsela* con 6 %; *V. splendidus I.* con 5 %; *V. nereis*, *V. fischeri*, *V. anguillarum* con 3 % cada uno; *V. vulnificus*, *V. tubiashii*, *V. splendidus II*, *V. marinus*, *V. cholerae*, *V. campbelli* con 2% correspondientemente; y el organismo con menor prevalencia fue *V. logei*, con 1 %. Tomando en consideración las grandes pérdidas obtenidas en la producción larvaria mundial, cuyo responsable es la cepa *V. parahaemolyticus*, causante del síndrome de la mortalidad temprana en camarones. Encontrándose en nuestros como la cepa que mayormente se reportó en los análisis bioquímicos, se debe tener precaución en las estrategias de manejo de los laboratorios de larvas de camarón del país, para descartar que esta cepa sea la responsable del mayor porcentaje de mortalidades en todas las fases productivas del camarón (Soto, 2015).

Existe una presencia del 26 %, tanto de *Vibrio cholerae* como de *V. tubiashii*, seguido de *V. campbelli* con 10 % en cepas que fueron reportadas como resistentes para las cepas bacterianas aisladas de ambas épocas, donde indican que el *V. parahaemolyticus* estuvo resistente solo con 1 %. Tabla N° 1.

### 3.2 Discusión

Son varios los respaldos que atribuyen que las descargas de aguas de laboratorios de larvas y camarónicas ricas en nutrientes ayudan al afloramiento de fitoplancton, produciendo presencia de mareas rojas, que en estadios larvarios de camarón causan mortalidades agresivas, relacionándolas con la presencia de ciertas toxinas que pu-

dieron ser las responsables de las mortalidades no solo de especímenes naturales, sino de especímenes domesticados (Leyva, 2010).

Se ha observado que ciertas condiciones ambientales, el manejo, la estación del año (que dividen las temperatura y precipitaciones según los meses del año) fueron las correlaciones más significativas de la incidencia de las especies patógenas de *Vibrio*; concentraciones superiores a este exponente han sido relacionadas con mortalidades dentro de los sistemas de cultivos y, en algunos casos, generan problemas en el ecosistema (Thompson, 2006) (Thhimmalapura et al, 2006).

Estudios de *V. parahaemolyticus* indican que se encuentra mayormente durante la época de los meses más cálidos, en aguas del mar de Japón; esto se ha mantenido en otras partes del mundo, desapareciendo en los meses más fríos (Chowdhury et al., 1990). Las bacterias han tenido que adaptar condiciones de subsistencia ante las variaciones ambientales, las que producen estrés sobre las cepas bacterianas. Se ha demostrado que estas alteraciones producen que estas cepas, por subsistir, pierdan su capacidad por crecer en medios de cultivos selectivos, lo que hace que, de acuerdo a las condiciones ambientales, las bacterias puedan desarrollar la formación de células viables pero no cultivables (VNC). Se ha informado de más de 30 especies bacterianas (Xu et al., 1996). Esta polémica no ha sido aún resuelta y menos el papel que puedan desempeñar en el medio natural si no son detectadas por medios tradicionales (Barer et al., 1999). Para nuestro estudio, las cepas cultivadas en TCBS no reportaron un crecimiento sostenido sobre agar TCBS, lo que se vió y presentó en ambas muestras, de mar y muestras de playas. Para las muestras de descargas y descargas tratadas,

estas se mantuvieron en concentraciones superiores, demostrando que los manejos de laboratorios influyen sobre la concentración bacteriana de las muestras, sin embargo no se pudo detectar que esta agua de descargas influya directamente sobre las aguas marinas.

Shubha et al. (2005) indican que la variabilidad de las cargas bacterianas entre zonas de muestreo, tanto en aguas de sistemas productivos como en sedimentos, están mayormente encontradas en sus tracto digestivo, teniendo relación con el medio donde se desarrollan (Gómez et al., 1998).

En estudios de cuantificación y caracterización de especies de vibrios luminiscentes hallados en el hepatopáncreas de juveniles de *Penaeus monodon* (Leano et al., 1998), se reportó que, de las 172 muestras aisladas, el 90 % de ellas resultaron ser *Vibrios harveyi*, constituyendo un importante patógeno en los sistemas productivos de estos organismos.

#### IV. CONCLUSIONES

1. La carga bacteriana analizada reportó tener una relación directa con la época del año, presentando a las cepas del género *Vibrio parahaemolyticus* como el dominante en la estación seca y totalmente ausente en la época lluviosa.
2. Respecto a la presencia de cepas resistentes, de manera general se observa que existe un porcentaje considerable de cepas resistentes a los antibióticos de amplio espectro mayormente a los de 2° generación, lo cual denota la presencia de una resistencia generada posiblemente por factores antropogénicos, como la descarga de aguas residuales con antibióticos, por lo cual se recomienda ahondar en estudios futuros sobre la presencia de antibióticos en el canal de aguas de descarga de la zona, debido a la gran detección de cepas del género enterobacterias, identificadas por la prueba bioquímica miniaturizada, siendo además resistente a los antibióticos. Esta resistencia en las muestras analizadas puede conllevar una problemática al hombre por contacto con las aguas marinas de esta zona.
3. Se debe realizar un estudio que permita determinar los parámetros fisicoquímicos de las aguas de afluentes y efluentes de la zona de mar Bravo y determinar si la variación en carga bacteriana, identificación bioquímica, índices productivos infieren directamente sobre las especies predominantes de la zona. Estas cepas predominantes, al correlacionarse con parámetros de producción y estudios del perfil molecular, nos permitirá tener una correlación de la verdadera incidencia de la variabilidad bacteriana sobre la producción larvaria y el entorno natural.
4. Morfométricamente, predominan las bacterias con forma de diplococos y cocos; cabe destacar que todas las bacterias aisladas fueron Gram-negativas en las muestras, tanto de las aguas de afluentes como de efluentes, lo que nos brindan una idea general del efecto entre las cargas bacterianas de la zona de laboratorio de larvas de camarón y su fuente. Estos resultados, fluctuantes entre las épocas anuales exis-

tentes en el Ecuador, con mayores cantidades en la época húmeda, nos indican que existen variaciones climatológicas que afectan a las cargas y que deben ser analizadas a profundidad en estudios posteriores.

#### V. AGRADECIMIENTOS

A las diferentes empresas productoras de larvas de camarón de la zona de Mar Bravo, quienes permitieron tomar las muestras de agua en sus instalaciones, a la Espol por su apoyo para la realización de los estudios de doctorado en la UNMSM, a los estudiantes que colaboraron en los diferentes muestreos y que permitieron su culminación con éxito, Ketty, Johnathan y Joseph, y a cada uno de los amigos y colegas que colaboraron con su apoyo incondicional.

#### VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abraham, T.J. (2006). Virulence of *Vibrio harveyi* possessing a transferable chloramphenicol resistance determinate to larvae of Indian whit shrimp *Fenneropenaeus indicus* (Decapoda). *Indian Journal of Marine Science* 35: 275-278.
- [2] Aguirre, G., Guzmán, E., Vásquez, M. (2013). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Scientia Agropecuaria*.
- [3] Cabello, Felipe C. (2003). Antibióticos y acuicultura. Un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente y la salud humana y animal en Chile. *Análisis de Políticas Públicas*. Organización Terram, Publicación No 17.
- [4] Cabello, F.C.M. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile. Consecuencias para la salud humana y animal *Rev Méd Chile*; 132: 1001-1006.
- [5] Cabello, Felipe C. (2002). Changes in the epidemiology of infectious disease in Chile: 1990-2000. *Rev Méd Chile*; 130: 1185-7.
- [6] Cayre, M., Vignolo, G. & Garro, O. (2001). Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de Argentina.
- [7] Chandrakala, N., Priya, S. y Ganesh, S. (2014). Antibiotic Sensitivity and MIC of *Vibrio* Species Isolated from diseased *Penaeus monodon*. *Indian Journal Of Applied Microbiology*, 17 (47-54).
- [8] Chowdhury, M.A.R., Yamanaka, H., Miyoshi, S. and Shinoda, S. (1990). Ecology and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic environments of a temperate region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 1-10.
- [9] Cuéllar, J. y Morales, V. (2008). Guía técnica de patología e inmunología de camarones peneidos.
- [10] Frankel, M., Bekö, G., Timm, M., Gustavsen, S., Hansen, E. W., & Madsen, A. M. (2012). Seasonal variation of indoor microbial exposures and their relations to temperature, relative humidity and air exchange rates. *Applied and environmental microbiology*, AEM-02069.

- [11] García, J., Vila, J., Canton, R., García, E. (2000). Métodos básicos para el estudio de sensibilidad de antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica.
- [12] Gonzáles, J., Prado, P., Quiñónez, D. (2003). Técnicas de Bacteriología, Análisis en Fresco, Calidad de Agua y Buenas Prácticas de Manejo y Bioseguridad en Granjas Camaroneras. CESAIN-Maricultura del Pacífico.
- [13] Ibarra, G., González, G., Galavíz, S., Zinnia, J, Molina, G., & Luna, B. (2007). Vibriosis Asociadas al Cultivo de Camarón *Litopenaeus vannamei*. Instituto Tecnológico de Sonora, Dirección de Recursos Naturales, Laboratorio de Acuicultura. México, 56.
- [14] Isbary, G., Morfill, G., Schmidt, H. U., Georgi, M., Ramrath, K., Heinlin, J., Karrer, S. & Stolz, W. (2010). A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *British Journal of Dermatology*, 163(1), 78-82.
- [15] Jawahar, A., Ranjith, M., Palaniappan, R., Dheven-dran (1997). Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio Harveyi* isolated from diseased Penaeid shrimp. *Aquaculture Trop.* 12 (1)(1-8).
- [16] Kobayashi, M. y Melkonyan, T. (2011). Strategic incentives in biosecurity investment: Theoretical and empirical analyses. *Journal of Agricultural and Resource Economics* 36 (242-262).
- [17] Lightner, D., Redman, R., Pantoja, C., Noble, B., Tran L., 2012 Early Mortality syndrome affects shrimp In Asia. *Glob.Aquat. Advocate* 40 (jan/feb).
- [18] Lightner, D. (2003) Exclusion of specific pathogens for disease prevention in a Penaeid shrimp biosecurity program. In: Lee CS, O'Bryen PJ (eds) Biosecurity in aquaculture production systems: exclusion of pathogens.
- [19] Leano, E., Lavillaprtago, Paner. M., (1998). Bacterial flora in the hepatopancreas of pond reared *P. monodon* juveniles with luminous Vibriosis. *Aquaculture* 164 (367-374).
- [20] Leyva, G., Sáenz, L. y Guevara, S. (2010). Protocolo de presencia y contingencia para el cultivo de camarón en Baja California. Comité estatal de sanidad acuícola e inocuidad de Baja California. c.p. 22830, Ensenada, Baja California, México.
- [21] Lightner, D. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society.
- [22] Marriott, F. (2003). Análisis del sector camaronero. Apuntes de Economía No.29. Dirección de Estudios.
- [23] Ravi, A.V., Musthafa, K.S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K. y Pandian, S.K. (2007). Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology* 45: 219-223.
- [24] Rodríguez-Camacho, J.C., Méndez-Gómez, E.\*, Rivas-Montaño, A.M. y Cortés-Ruiz, J.A. (2014). Evaluation of presencia of *Vibrio Parahaemolyticus* in White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) estuarine ' wild from southern Sinaloa and northern Nayarit by microbiological analysis and per.
- [25] Shubha G., Subhendu O., Sanath K., Indrani K., Matsuaki N., Iddya K. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 102 (151- 159).
- [26] Solis, A. (1996). Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de grado, previo a la obtención de Título de Acuicultor. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, 1-83.
- [27] Soto-Rodriguez, S. a., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt- Lozano, M., Morales-Covarrubias, M.S., 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1689-1699. doi:10.1128/AEM.03610-14
- [28] Thimmalapura et al. (2006). Changes in bacterial populations and shrimp production in pond treated with commercial microbial products
- [29] Thompson, J. & Polz, M. (2006). Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*, Volumen 13, pp. 190-203.
- [30] Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D. G., & Cerrano, C. (2010). *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environmental microbiology*, 12(7), 2007-2009.
- [31] Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. and Golwell, R.R. (1982) Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 8, 313-323.
- [32] Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X. & Xie, L. (2012). A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with "bacterial white tail disease" of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *PloS one*, 7(2).