



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL USO DE VIBRIÓFAGOS ENCAPSULADOS
EN EL ALIMENTO PARA EL CONTROL DE *Vibrio*
parahaemolyticus CAUSANTE DE AHPND EN EL CAMARÓN
Penaeus vannamei.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

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

P r e s e n t a

Esther Imelda Ponce García

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 23 del mes de noviembre del 2023, 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:

"Evaluación del uso de vibriófagos encapsulados en el alimento para el control de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND en el camarón *Penaeus vannamei*."

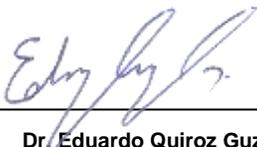
Presentada por el alumno:

Esther Imelda Ponce García

Aspirante al Grado de MAESTRO 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



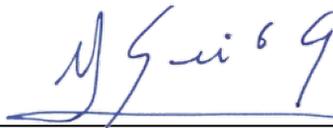
Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis



Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Co-Tutora de tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



La Paz, Baja California Sur, a 23 de noviembre de 2023.

Los miembros del comité de tesis de la estudiante ESTHER IMELDA PONCE GARCÍA del Programa de Maestría en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales con orientación en acuicultura, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Citas y Bibliografía
- Porcentajes de similitud:
11 %
Se muestra captura de pantalla

Rank	Source	Words	Similarity
1	Internet	519 palabras	3%
2	Internet	68 palabras	<1%
3	Internet	55 palabras	<1%
4	Internet	54 palabras	<1%
5	Internet	44 palabras	<1%
6	Internet	44 palabras	<1%

Firmas del Comité

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Co-Tutora

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.-Unidad Mazatlán
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez

Jurado de Examen

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez

Suplente

Dra. Regina Elizondo González

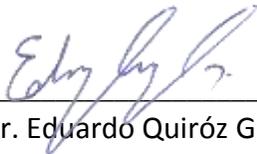
Resumen

Las enfermedades causadas por bacterias del género *Vibrio* en el cultivo de camarón son de gran importancia debido a su impacto negativo en la industria acuícola. Estas bacterias pueden causar diversas enfermedades en camarones, como la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). La fagoterapia es una alternativa para el biocontrol de estas bacterias patógenas que presenta importantes ventajas, como la alta especificidad a sus huéspedes, la replicación en el sitio de infección, y la capacidad de infectar a bacterias resistentes a antibióticos. Sin embargo, la estabilidad de los fagos en el sistema de cultivo es una preocupación latente, ya que los fagos presentan una estabilidad limitada en solución y experimentan una caída significativa en el título de fagos durante el procesamiento y almacenamiento. El método de encapsulación de bacteriófagos, un área que aún no se estudia del todo, se presenta como una potencial alternativa para atender esta problemática. En el presente estudio se evaluó la eficacia terapéutica de un cóctel de bacteriófagos (vB_Vp_PvVp05, vB_Vp_PvVp07 y vB_Vp_PvVp11), encapsulados en alginato de sodio comercial y de mediana viscosidad, pectina, carboximetilcelulosa, liposomas y liofilizado en pectina como agente de biocontrol de *Vibrio parahaemolyticus* para su uso en terapias fágicas pasiva y activa. Se observó que el encapsulado en alginato de sodio de mediana viscosidad presentó la mayor liberación de fagos activos y al momento de ser incorporado a alimento para camarón y horneados a 80 – 100°C, se mantuvo una concentración de 1.3×10^5 UFP/g después de 100 días de almacenamiento. Para la evaluación de las terapias pasiva y activa se realizó una infección experimental en juveniles de *Penaeus vannamei* para conocer la efectividad de los encapsulados, utilizando para la terapia pasiva la cepa Vp M0904 y para la activa la cepa Vp M0605. El experimento de terapia pasiva mostró una mortalidad del 80.6% en los camarones a las 48 hpi ($p > 0.05$) y una concentración de 5×10^2 UFC/mL de *Vibrio* spp. no fermentativos en TCBS. En el caso de la terapia activa no se presentó mortalidades, pero hubo una disminución de la concentración de *Vibrio* spp. no fermentativos en TCBS con 5.56×10^1 UFC/mL a las 48 hpi ($p < 0.05$) y aumentó la densidad de vibriófagos en 1.4×10^2 UFP/mL en el agua de los acuarios ($p < 0.05$). Se determinó que la terapia pasiva no ofreció ninguna ventaja para el control de *Vibrio parahaemolyticus*, a diferencia de la terapia activa, que sí demostró ser efectiva en el control de esta bacteria.

Palabras clave: vibriófagos, encapsulado, *Penaeus vannamei*, terapia activa, terapia pasiva.

ORCID: 0009-0009-2127-3888

Vo.Bo.



Dr. Eduardo Quiróz Guzmán
Co-Director



Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director

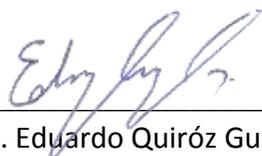
Summary

Diseases caused by bacteria of the *Vibrio* genus in shrimp farming are of great importance due to their negative impact on the aquaculture industry. These bacteria can cause various diseases in shrimp, such as acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Phage therapy is an alternative for the biocontrol of these pathogenic bacteria, offering significant advantages, including high specificity to their hosts, replication at the infection site, and the ability to infect antibiotic-resistant bacteria. However, the stability of phages in the farming system is a persistent concern, as phages have limited stability in solution and undergo a significant drop in phage titer during processing and storage. The method of bacteriophage encapsulation, an area that is not yet fully explored, emerges as a potential alternative to address this issue. In this study, the therapeutic efficacy of a cocktail of bacteriophages (vB_Vp_PvVp05, vB_Vp_PvVp07, and vB_Vp_PvVp11), encapsulated in commercial medium-viscosity sodium alginate, pectin, carboxymethylcellulose, liposomes, and lyophilized pectin, was evaluated as a biocontrol agent against *Vibrio parahaemolyticus* for use in passive and active phage therapies. It was observed that encapsulation in medium-viscosity sodium alginate showed the highest release of active phages, maintaining a concentration of 1.3×10^5 PFU/g after 100 days of storage when incorporated into shrimp feed and baked at 80–100°C. For the evaluation of passive and active therapies, an experimental infection was conducted on *Penaeus vannamei* juveniles to assess the effectiveness of the encapsulated phages. The passive therapy experiment showed a mortality rate of 80.6% in shrimp at 48 hpi ($p > 0.05$) and a concentration of 5×10^2 CFU/mL of non-fermentative *Vibrio* spp. on TCBS agar. In the case of active therapy, no mortalities were observed, but there was a decrease in the concentration of non-fermentative *Vibrio* sp. on TCBS agar to 5.56×10^1 CFU/mL at 48 hpi ($p < 0.05$), and the density of vibriophages increased to 1.4×10^2 PFU/mL in the aquarium water ($p < 0.05$). It was determined that passive therapy offered no advantage for the control of *Vibrio parahaemolyticus*, unlike active therapy, which proved to be effective in controlling this bacterium.

Keywords: vibriophages, encapsulated, *Penaeus vannamei*, active therapy, passive therapy.

ORCID: 0009-0009-2127-3888

Vo.Bo.



Dr. Eduardo Quiróz Guzmán
Co-Director



Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director

Dedicatoria

A mi familia que me acompañó en cada momento y me motivaron a salir adelante.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme realizar mis estudios de Maestría y emplear las instalaciones y recursos para la elaboración de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (No. 1084641).

Al Departamento de Becas de CIBNOR por la beca de “Apoyo parcial para gastos de manutención para finalizar maestría” (No. 123 ID 1528).

A mis Co-Directores Dr. Eduardo Quiroz Guzmán y Dr. Alberto Peña Rodríguez, así como a mi Co-Tutora Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez por su apoyo, guía y paciencia durante mis estudios de maestría.

Al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología para la Integración Agroacuícola y Multitrófica por proporcionarme los bacteriófagos, bacterias y recursos necesarios para la tesis.

Al Laboratorio de Nutrición Acuícola en especial al Dr. Ernesto Goytortúa Bores por permitirme el uso de las instalaciones y equipos.

Al Laboratorio de Diagnostico Microbiológico en especial a la Dra. Norma Angélica Ochoa Álvarez por la disponibilidad de las instalaciones y en asesoría que nos ha brindado a mis compañeros y a mí.

Al Laboratorio de Fisiología Comparada en especial a la técnico Patricia Hinojosa Baltazar, Q.E.P.D., por su amabilidad y apoyo otorgado.

Al grupo de Nanotecnología y Biocontrol Microbiano adscrito al Programa de Agricultura en Zonas Áridas en especial a José Manuel Melero Astorga por permitirme hacer uso de su laboratorio y equipo.

Víctor Álvarez de GENAMEX por su apoyo en la donación de organismos para los bioensayos de terapia activa.

Al Laboratorio de Bacteriología en el CIAD especialmente a Karla Aguilar por la compañía y asesoría brindada.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio Bernardo Veyrand, Omar Lomelí, Diana Barajas y Marbella Rodas por todos los momentos agradables trabajando junto a ellos y por ser un apoyo invaluable.

A Diana Rojas por su amistad que hizo que esta etapa fuera amena.

A Alexis Martínez por siempre alegrarme los días y acompañarme en los buenos y malos tiempos.

A mi Hermana y mi Madre, quienes me han motivado a continuar este proyecto.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Glosario	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 El estado actual de la acuicultura de camarón	3
2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y AHPND	4
2.3 Herramientas para el bio-control de patógenos	5
2.3.1 Probióticos	5
2.3.2 Desarrollo de líneas de camarones tolerantes a AHPND	6
2.3.3 Compuestos derivados de plantas	6
2.3.4 Tecnología biofloc	7
2.3.5 Fagoterapia	7
2.4 Encapsulamiento de bacteriófagos líticos	8
2.4.1 Liposomas	9
2.4.2 Hidrogeles	10
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPOTESIS	12
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivos específicos	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 Cepas bacterianas	14
6.2 Bacteriófagos	14
6.3 Encapsulación en alginato	15
6.4 Encapsulación en pectina	16
6.5 Encapsulación en carboximetilcelulosa (CMC)	17
6.6 Encapsulación en liposoma	17
6.7 Encapsulación en liofilizados	18
6.8 Evaluación de presencia de vibriófagos en las microesferas	18
6.9 Producción de alimentos a diferentes temperaturas	19
6.10 Preparación de los alimentos para camarón para el desafío experimental	20
6.11 Evaluación de la actividad de los vibriófagos encapsulados en el alimento	20
6.12 Liberación de los fagos en el tracto digestivo del camarón	21
6.13 Evaluación <i>in vivo</i> de la fagoterapia en camarón	21
6.13.1 Condiciones de aclimatación	22
6.13.2 Preparación del inóculo	23
6.13.3 Desafío experimental con camarones	23
6.14 Análisis estadísticos	25

7. RESULTADOS	26
7.1 Encapsulación en alginato.....	26
7.2 Encapsulación en pectina.....	28
7.3 Encapsulación con carboximetilcelulosa.....	28
7.4 Encapsulación de liofilizados y liposoma.....	29
7.5 Producción de alimentos a diferentes temperaturas.....	29
7.6 Evaluación de la estabilidad de los vibriófagos encapsulados en el alimento.....	30
7.7 Liberación de fagos en el tracto digestivo del camarón.....	34
7.8 Bioensayos de fagoterapia.....	35
7.8.1 Terapia pasiva.....	35
7.8.2 Terapia activa.....	38
8. DISCUSIÓN	42
8.1 Encapsulación del coctel de fagos.....	42
8.2 Evaluación de la actividad lítica de los encapsulados en el alimento.....	44
8.3 Fagoterapia <i>in vivo</i>	46
8.3.1 Terapia pasiva.....	46
8.3.2 Terapia activa.....	47
9. CONCLUSIONES	49
10. LITERATURA CITADA	50
11. ANEXOS	58
Anexo 1. Fotos de las pruebas de superposición de agar suave de los encapsulados.....	58
Anexo 2. Hepatopáncreas diseccionados de los organismos a las 48 h post infección en la terapia pasiva.....	64
Anexo 3. Análisis de supervivencia durante el bioensayo de infección con M0605 (terapia activa) y el alimento experimental.....	64
Anexo 4. Hepatopáncreas diseccionados de los organismos a las 48 h post infección.....	67

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de los tratamientos del desafío experimental en terapia pasiva con la cepa M0904 y el alimento experimental con encapsulados de vibriófagos.	24
Figura 2. Esquema de los tratamientos del desafío experimental en terapia activa con la cepa M0605 y el alimento experimental con encapsulados de vibriófagos..	25
Figura 3. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 80°C durante 2 meses y medio.	31
Figura 4. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 90°C durante 2 meses y medio.	32
Figura 5. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 100°C durante 2 meses y medio.	32
Figura 6. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 110°C y, cuantificados durante 2 meses y medio.	33
Figura 7. Análisis de UFP/g del alimento experimental con encapsulados en alginato de sodio horneado a 80°C.	34
Figura 8. UFC/mL de las colonias verdes durante el bioensayo de terapia pasiva con M0904 y el alimento experimental elaborado para el desafío con vibriófagos encapsulados en alginato de sodio.	37
Figura 9. Análisis de UFC/mL de las colonias amarillas durante el bioensayo de terapia pasiva con M0904 y el alimento experimental elaborado para el desafío con vibriófagos encapsulados en alginato de sodio.	37
Figura 10. Análisis de supervivencia durante el bioensayo de terapia pasiva con M0904 y el alimento experimental.	38
Figura 11. Análisis de UFC de las colonias verdes durante el bioensayo de terapia activa con M0605 y el alimento experimental con fagos encapsulados en alginato de sodio (n=3).	40
Figura 12. Análisis de UFC de las colonias amarillas durante el bioensayo de terapia activa con M0605 y el alimento experimental con fagos encapsulados en alginato de sodio (n=3).	41
Figura 13. Análisis de UFP/mL de agua durante el bioensayo de terapia activa con M0605 y el alimento experimental con fagos encapsulados en alginato de sodio, n=3.	41

Lista de tablas

Tabla 1. Colección de bacteriófagos empleados en este trabajo.	14
Tabla 2. Producción de encapsulados con alginato de sodio comercial y de mediana viscosidad.	16
Tabla 3. Producción de encapsulados con pectina y alginato de sodio de mediana viscosidad. ...	17
Tabla 4. Producción de encapsulados con carboximetilcelulosa.	17
Tabla 5. Liofilizados de fago-polímeros	18
Tabla 6. Alimentos experimentales con diferentes tipos de encapsulados de vibriofagos en alimentos de camarón horneados a 80, 90, 100 y 110°C.	19
Tabla 7. Ingredientes y formulación de alimento balanceado para camarón (para 1000 g).	20
Tabla 8. Efecto de una prueba de superposición de agar suave de las soluciones polímero-vibriofagos.	26
Tabla 9. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en alginato de sodio.	27
Tabla 10. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en alginato de sodio elaborados en la sección 6.3, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.	27
Tabla 11. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en pectina con alginato de sodio elaborados en la sección 6.4, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.	28
Tabla 12. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en carboximetilcelulosa elaborados en la sección 6.5, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.	29
Tabla 13. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en carboximetilcelulosa elaborados en la sección 6.6 y 6.7, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.	29
Tabla 14. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de los alimentos que contienen encapsulados de acuerdo con la sección 6.9 y horneados a temperaturas de 80 – 110°C.	30
Tabla 15. Evaluación de la composición química proximal del alimento referencial y experimental.	34
Tabla 16. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de la prueba de digestibilidad de los alimentos con encapsulados en camarón a partir de estómago, intestinos y heces de los organismos luego del consumo del alimento.	35

Glosario

Alginato de sodio: son polisacáridos de la sal del ácido algínico obtenido de algas marinas pardas y algunas bacterias, su composición está dada por los ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico ordenados en bloques con secciones alternadas (Avendaño-Romero *et al.*, 2013; Bennacef *et al.*, 2021).

Carboximetilcelulosa: es un éter derivado de la celulosa constituida por grupos carboximetilo de sodio enlazados a grupos hidroxilos de la unidad β -anhidroglucosa (Franco y Mercê, 2006; Franco *et al.*, 2007).

Epizootia: enfermedad animal de tipo contagioso que ataca a un número alto de animales en un mismo periodo de tiempo (Uribe-Mendoza, 2015).

Hemocitos: células del sistema inmune encontradas en la sangre de invertebrados (hemolinfa) (Lavine y Strand, 2002).

Hepatopáncreas: órgano del sistema digestivo de crustáceos con diversas funciones entre las que se encuentra la secreción de enzimas, almacenamiento de nutrientes, desintoxicación, entre otros (Zeng *et al.*, 2010).

Lecitina: término genérico que designa a sustancias grasas obtenidas de tejidos animales y vegetales compuestas de ácidos fosfórico y grasos, glicerol, glicolípidos, triglicéridos y fosfolípidos (Calviño *et al.*, 2017).

Liofilización: es un proceso de deshidratación de productos a baja presión (vacío) y moderada temperatura lo que permite la evaporación del agua por sublimación (Terroni, 1997).

Patógenos oportunistas: microorganismo que causa enfermedad en organismos cuya defensa inmune humoral o innata se encuentra comprometida (Rocha-Gracia *et al.*, 2004).

Pectina: polímero que se encuentra en la pared celular de plantas y en la cascara de las frutas compuesto por cadenas lineales de ácido galacturónico cargadas negativamente (Brejnholt, 2010; Sampaio *et al.*, 2019).

Profiláctico: medidas aplicadas para prevenir el riesgo de infección y transmisión de enfermedades (Astigarraga *et al.*, 2016).

Quitosano: biopolímero derivado desacetilado de la quitina que se puede encontrar en crustáceos, insectos y hongos, está constituido por monómeros de poli β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina (Lárez-Velásquez, 2006; Cusihamán-Noa *et al.*, 2018).

Vibrio: género de bacterias gram-negativas, con forma de bacilos rectos o curvos, metabolismo fermentativo y generalmente móviles con flagelación polares, encontrados generalmente en ambientes marinos y esteros (Colquhoun y Lillehaug, 2014).

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el sector de producción de alimento con el crecimiento a nivel mundial más rápido y se ha establecido como una fuente de proteína necesaria para satisfacer la ascendente demanda de alimentos (FAO, 2018). En las últimas décadas, la alta demanda de productos acuícolas a derivado en el desarrollo de sistemas de producción intensivos, sin embargo, este tipo de cultivos presenta desafíos sanitarios con la presencia de bacterias patógenas que pueden generar pérdidas en la producción (Lightner, 1993). Muchos de estos microorganismos patógenos son oportunistas, y pueden permanecer indetectables hasta que una fuente de estrés vuelve a los organismos de cultivo susceptibles a enfermedades. Algunos de estas condiciones de estrés pueden ser provocadas por parámetros inadecuados o con fluctuaciones rápidas de temperatura, pH o salinidad; pobre oxigenación; acumulación de productos tóxicos; sobrepoblación; exceso o falta de alimento; exceso de manipulación; y en general, una baja calidad de agua (Richards, 2014). Un ejemplo son las bacterias pertenecientes al género *Vibrio*, que son los principales agentes causales de numerosas epizootias en la camaronicultura, debido a que estos son patógenos oportunistas (de Souza-Valente y Wan, 2021; Ghosh *et al.*, 2021). Algunas cepas de especies de *Vibrio* como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. mimicus*, *V. damsella*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. cambelli*, *V. ordalli*, *V. mediterrani*, *V. orientalis* y *V. logei* pueden producir enfermedades infecciosas en camarón en todas sus etapas de vida y son responsables de mortalidades masivas en granjas de camarón (Ghosh *et al.*, 2021; Bamel *et al.*, 2022).

En este contexto, Tran *et al.* (2013) reportaron una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) como el agente causal de la enfermedad emergente en camarón denominada Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND por sus siglas en inglés) la cual provoca hasta un 100% de mortalidad de la postlarvas en los primeros 20-30 días de cultivo (De Schryver *et al.*, 2014). El signo más común de la infección es el hepatopáncreas atrofiado blanco a pálido, y a nivel histológico se observa el desprendimiento masivo de las células epiteliales en los túbulos hepatopancreáticos en la etapa aguda de la enfermedad. Por otro lado, en la etapa terminal se observa necrosis de las células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos e infiltración hemocítica masiva (Tran *et al.*, 2013; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015). Las medidas profilácticas

como manejo del estanque (aeración, alimentación, control del pH, temperatura, etc.) y la desinfección de los estanques antes de la siembra de las postlarvas, no han sido capaces de detener la proliferación de AHPND una vez que aparece en el estanque o en estanques vecinos (De Schryver *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2016). Algunas medidas convencionales como interrumpir la alimentación o la aplicación de antibióticos y desinfectantes no han sido efectivos (Angulo *et al.*, 2019). Adicionalmente, existe el riesgo del desarrollo de multirresistencias en bacterias lo que implica un riesgo para los cultivos, por lo que, hay una necesidad urgente por desarrollar métodos eficaces para el manejo de esta enfermedad (Rushton *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2016). Algunos de los posibles tratamientos o agentes de control son el uso de probióticos, inmunoestimulantes, compuestos derivados de plantas, líneas de organismos tolerantes a enfermedades, o tecnologías de biofloc (Kumar *et al.*, 2021).

Otra alternativa es la fagoterapia, que implica el uso de bacteriófagos (o fagos) basándose en la actividad bactericida que muestran. Los fagos son virus que infectan únicamente a bacterias, por lo cual, se consideran parásitos obligados de estas, ya que, requieren de los recursos de la célula para poder llevar a cabo su replicación (Zuppi *et al.*, 2022). Los estudios sobre el mecanismo de los bacteriófagos líticos es esencial para el desarrollo de la fagoterapia, donde la infección conduce exclusivamente a la muerte celular, lisis y liberación de partículas de la progenie del bacteriófago (Kropinski 2006; Cisek *et al.*, 2017). Los bacteriófagos han sido probados en los campos de la medicina, agricultura y alimentación, debido a que, en comparación a los antibióticos, estos presentan alta eficiencia, especificidad y se han mostrado amigables con el medio ambiente (Liu *et al.*, 2022).

Actualmente existen numerosos avances en la aplicación de fagos, sin embargo, los desafíos a los que se enfrenta la fagoterapia para el control de infecciones son, la administración en los organismos y la pérdida de actividad lítica por las condiciones ambientales como la luz UV, temperatura, pH, entre otros (Nedovic *et al.*, 2011). Por ello, en el presente trabajo se propone la inmovilización o encapsulación de estas partículas en biopolímeros que los protejan de estas condiciones y puedan administrarse de forma más sencilla a través del alimento de los organismos y, disminuir los signos de infección y mortalidad provocada por la cepa Vp AHPND.

2. ANTECEDENTES

2.1 El estado actual de la acuicultura de camarón

Uno de los sectores de producción de alimento con el crecimiento más acelerado a nivel mundial es la acuicultura, que comprende el cultivo controlado de todo tipo de animales acuáticos y plantas en ambientes de agua dulce, salobre o marina (Pillay y Kutty, 2005). El incremento en la actividad acuícola es consecuencia de que ha demostrado tener la capacidad de satisfacer la creciente demanda de alimentos con una alta contribución nutricional. Adicionalmente, esta actividad genera empleos directos y secundarios que forman una parte importante del desarrollo económico de los países productores. Por otro lado, las actividades pesqueras presentan un declive debido a la sobreexplotación de los recursos naturales y el cambio climático (FAO, 2014; FAO, 2002). A nivel global se ha tenido una producción anual de 114.5 millones de toneladas con un valor de 263.6 billones de dólares en 2018 (FAO, 2020). Uno de los productos con más importancia son los crustáceos, donde la acuicultura genera un 55% de estos organismos (FAO, 2018). Entre estos, la especie más relevante es el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*, del cual se cultivan en promedio 3.4 millones de toneladas, con un valor estimado de entre 3,800 a 8,800 dólares por tonelada, lo que representa el 53% de los crustáceos producidos anualmente en el mundo (FAO, 2018). El camarón *P. vannamei* es el principal crustáceo producido en acuicultura debido a su alta productividad, baja susceptibilidad a las enfermedades y, un amplio rango de tolerancia de salinidades y temperaturas (Li *et al.*, 2017; Thornber *et al.*, 2020). Aun cuando el camarón no es un producto básico, su producción en aumento, contribuye a suplir de alimento a la población creciente. En este sentido, se ha optado por la tecnificación de los sistemas de cultivo, aplicación de nuevas fórmulas alimenticias, y la cría de postlarvas libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés), que han permitido a la acuicultura de camarón llegar a una intensificación y expansión de nivel industrial (Thornber *et al.*, 2020).

México se encuentra como uno de los 25 países con mayor importancia en la producción acuícola con un crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años de 4.56% y una producción de 182,110 toneladas de camarón en 2021. Esta producción representa un 72.8% de

la actividad camaronera del país que cada vez adquiere un mayor impulso e inversión por su capacidad de producción de alimento (CONAPESCA, 2022). Para nuestro país, la especie que más se cultiva es el camarón blanco, del cual se produjo 130,344 toneladas en 2017; donde las entidades con mayor producción son Sinaloa con 61,763 ton, Sonora con 55,933 ton, Jalisco con 36,858 ton, Veracruz con 33,910 ton y Chiapas con 29,158 ton (SADER, 2017).

Los sistemas de cultivo en el país siguen un modelo extensivo, semi-intensivo o intensivo, donde la diferencia está en la densidad de siembra, el nivel de tecnología aplicada, el control de variables fisicoquímicas y biométricas, el consumo de agua y la frecuencia de la dosificación de alimentación. En los últimos años, con el fin de suplir alimento y fuente de empleo a la población, se ha optado por expandir los sistemas de producción e intensificarlos (Cortés *et al.*, 2021). No obstante, la intensificación de los cultivos genera una serie de condiciones que provocan estrés en los organismos volviéndolos más susceptibles a enfermedades por virus, bacterias, hongos y parásitos (Thornber *et al.*, 2020; Vaiyapuri *et al.*, 2021). En este sentido, bacterias del género *Vibrio* están ampliamente distribuidas en el mundo y las infecciones que provocan, conocidas como vibriosis, son reportadas tanto en criaderos como en estanques de cultivo de camarón (Chandrakala y Priya, 2017). Estas bacterias se consideran como unas de las más importantes en la industria acuícola por las pérdidas económicas que provocan (Anh *et al.*, 2010; Defoirdt *et al.*, 2007). En la actualidad, varias especies del género *Vibrio* como *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) han tomado relevancia por su implicación en mortalidades severas en la acuicultura, especialmente en la industria del camarón (Austin y Austin, 2007).

2.2 *Vibrio parahaemolyticus* y AHPND

Se tienen bien identificados los principales factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* que van desde adhesinas como moléculas de adhesión multivalente 7 (MAM7), distintos tipos de flagelos, sistemas de secreción y diferentes toxinas (Broberg *et al.*, 2011). En particular la adquisición del sistema de secreción de las proteínas hemolisina directa termoestable (TDH) y la hemolisina relacionada con TDH (TRH) ha llevado a distintas cepas con varios tipos y niveles de patogenicidad (Okada *et al.*, 2010). Otro factor de virulencia es de las cepas asociadas a AHPND

que contienen un plásmido (~70 kbp) conocido como pVA1 con los genes de las toxinas PirA^{VP} y PirB^{VP}, que expresa homólogos a la toxina binaria relacionada con insectos (Pir) de *Photorhabdus*. (Lai *et al.*, 2015). En México en 2013 ha provocado pérdidas económicas de hasta 2.5 millones de pesos. Esta enfermedad tiene la capacidad de ocasionar una mortalidad de hasta el 100% en un tiempo de 20 a 30 días después de abastecer un estanque con post-larvas. Los signos característicos de infección por Vp AHPND son letargo, nado errático, intestino vacío y hepatopáncreas atrofiado blanco a pálido con consistencia acuosa en la etapa aguda (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015), y sus lesiones progresivas se han clasificado en cuatro etapas principales mediante análisis histopatológico. La etapa inicial se caracteriza por un alargamiento del epitelio celular de los túbulos de hepatopáncreas, que carecen de colonización bacteriana y una disminución de las vacuolas en las células R y B. En la fase aguda, lo más destacable es el masivo desprendimiento de las células epiteliales y ausencia de actividad mitótica en las células E. La etapa terminal se caracteriza por túbulos completamente necróticos, proliferación bacteriana y melanización causada por la respuesta inflamatoria (Tran *et al.*, 2013; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Soto-Rodríguez *et al.*, 2018).

2.3 Herramientas para el bio-control de patógenos

2.3.1 Probióticos

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos, que confieren un beneficio en la salud del huésped cuando se consumen en cantidades adecuadas”, son ampliamente utilizados para mejorar la producción de animales de cultivo por su afectividad, su bajo costo y con mejores resultados que otras sustancias químicas para promover la salud del organismo (FAO/WHO, 2006; LaPorte, 2017). Los probióticos que se han empleado de manera exitosa en los cultivos de camarón pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Saccharomyces* y *Vibrio* no-patogénico (Tang *et al.*, 2020).

Los beneficios de su aplicación como suplementos en alimentos o aditivos en el agua es la mejora de la calidad del agua del estanque y de las respuestas fisiológicas e inmunológicas de los animales, además, reduce el uso de productos químicos y antibióticos en los cultivos (Tang

et al., 2020). Aunque, estos microorganismos pueden prevenir enfermedades cuando se aplican de forma profiláctica, no tienen los mismos efectos en la aplicación terapéutica y es poco probable que curen a los organismos enfermos (LaPorte, 2017).

Por otra parte se ha reportado que los probióticos secretan sustancias extracelulares y péptidos potencialmente antimicrobianos, dando como resultado una mejor digestión y absorción de alimentos, mejoramiento a la inmunidad de los camarones, sin embargo, para la administración del probiótico, se debe tener en cuenta diferentes factores que están relacionados con la capacidad que poseen los probióticos para llegar hasta el tracto gastrointestinal del organismo, la dosis, el método de administración, la cepa y la escala de cultivo (Kumar *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2021).

2.3.2 Desarrollo de líneas de camarones tolerantes a AHPND

Los programas de selección de crías de camarón *P. vannamei* se encuentran en proceso en México, pero se tienen buenos resultados en los programas de Tailandia donde se ha obtenido supervivencia de 30 a 85%. Los camarones no tienen un sistema inmune específico, por lo que es posible que la tolerancia a una enfermedad genere protección contra otras enfermedades, como AHPND. Se ha observado en estudios preliminares que la línea de camarón ecuatoriana generada de la fusión de otras líneas ecuatorianas con tolerancia al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés) mostró un mayor tiempo de supervivencia al ser infectada con AHPND que la línea mexicana (Tang *et al.*, 2020).

2.3.3 Compuestos derivados de plantas

Las plantas son una fuente rica de compuestos bioactivos como alcaloides, glucósidos y compuestos aromáticos como fenoles o sus derivados con sustituciones de oxígeno que tienen la capacidad de actuar como antimicrobianos. La función de estos compuestos es la unión a sustratos o iones metálicos impidiendo su uso por los patógenos, alteran la membrana celular de los microorganismos o de sus proteínas, pueden inhibir la unión de las bacterias a la membrana celular, inactivar enzimas, bloquear la fusión o la absorción de células virales en la

célula huésped, entre otros. Los compuestos de plantas son biodegradables en el ambiente y se ha demostrado que pueden minimizar los efectos de AHPND y mejorar la supervivencia, sin embargo, pueden afectar a otros microorganismos no blanco (Kumar *et al.*, 2021).

Las plantas medicinales y las algas contienen metabolitos secundarios y compuestos fitoquímicos que mejoran el consumo de alimento, la digestibilidad, el rendimiento del crecimiento y la salud de los camarones lo que las vuelven alternativas potenciales en la prevención y tratamiento de AHPND. Los compuestos con actividad inmunoestimulantes en plantas son los fenoles, alcaloides, terpenoides, aceites esenciales, lecitinas, polipéptidos y poliacetilenos. Las plantas se pueden administrar como partes completas o extractos añadidos al agua o alimentos y pueden mezclarse con prebióticos. Aunque, las plantas contienen compuestos que mejoran la inmunidad y la salud de los camarones, también pueden tener propiedades toxicológicas, mutagénicas o genotóxicas (Kumar *et al.*, 2021).

2.3.4 Tecnología biofloc

Los sistemas biofloc emplean microorganismos que reciclan los nutrientes de los residuos de alimentos no consumidos y de las heces convirtiéndolos en biomasa microbiana que puede ser consumida por los organismos del cultivo o ser recolectada para usarse como ingrediente en alimentos. Estos sistemas mantienen los niveles de amonio/amoniaco en una concentración baja y no toxica, por lo que, el ambiente del cultivo se mantiene saludable y reduce los recambios de agua. Adicionalmente, se ha reportado la presencia de aminoácidos en los sistemas biofloc que aumentan la atractabilidad alimenticia en los organismos. Estos sistemas mejoran las condiciones del agua y la salud de los organismos, aumentan el rendimiento de crecimiento y la resistencia contra infecciones, incluyendo AHPND (Kumar *et al.*, 2021).

2.3.5 Fagoterapia

La fagoterapia es el tratamiento que emplea la actividad bactericida de los bacteriófagos (fagos) para controlar la presencia de bacterias patógenas (Prada-Peñaranda *et al.*, 2015). Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias con una alta especificidad, cuando un fago

reconoce la célula bacteriana susceptible inyecta su material genético que dirige la maquinaria biosintética de su hospedero hacia la producción de fagos que se ensamblan hasta romper la célula y liberar la progenie que infectará nuevas células bacterianas (Campbell, 2003). El tipo de bacteriófagos que se emplean en la fagoterapia son los de tipo lítico, que implica que la liberación de la progenie se da mediante la ruptura de la envoltura celular lo que involucra la muerte de la bacteria (Mathur *et al.*, 2003; Campbell, 2003).

Entre las ventajas que presentan es la alta especificidad a sus huéspedes, por lo que, no dañan ni desbalancean la flora bacteriana normal, se replican en el sitio de infección donde se concentran por la presencia de la bacteria huésped, se consideran amigables con el ambiente y hasta la fecha, no se han reportado efectos adversos durante o después del tratamiento (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Weber-Dabrowska *et al.*, 2001). El efecto de resistencia también puede aparecer con la aplicación de fagos, pero esto no implica una situación de riesgo, esto es porque los fagos de igual forma que las bacterias pueden mutar para poder infectar a la cepa resistente, además, pueden emplearse múltiples fagos en forma de coctel lo que reduce la posibilidad de que la bacteria diana desarrolle resistencia (Golkar *et al.*, 2014).

En el cultivo de camarón el uso de la fagoterapia se ha documentado e identificado como un método potencial para controlar infecciones bacterianas y se sigue desarrollando para llegar a un nivel comercial. Los fagos que se emplean para controlar enfermedades causadas por infecciones de bacterias del género *Vibrio* se conocen como vibriófagos y se ha demostrado en diversos estudios que tienen la capacidad de aumentar la supervivencia de los camarones cuando se infectan con Vp AHPND (Jun *et al.*, 2018; Makarov *et al.*, 2019).

2.4 Encapsulamiento de bacteriófagos líticos

Aunque el uso de los fagos tiene múltiples ventajas y se han hecho numerosos estudios, aún presenta retos en cuanto a su administración debido a que se requiere conocer el mejor tiempo de inoculación de las dosis y la desactivación por factores ambientales o por anticuerpos del hospedero (Loh *et al.*, 2021). Para evitar esto, los fagos pueden ser encapsulados o inmovilizados, aumentando así la eficiencia del tratamiento, la llegada de los fagos al sitio de

infección y la liberación controlada dentro del organismo hospedero. Este método consiste en un proceso en el que una sustancia o agente activo permanece en el núcleo que se cubre con un material que sirve como matriz o cápsula (Nedovic *et al.*, 2011). Las cápsulas se generan por emulsificación donde se busca, normalmente, que estas tengan una forma ideal esférica y un tamaño muy pequeño. Los nombres que se le dan a las partículas dependen de su tamaño, ordenados de menor a mayor se conocen como nanocápsulas o nanopartículas (entre 1 nm a 100 nm), microcápsulas o micropartículas (entre 3-800 μm) y macropartículas (mayor a 1000 μm) (Choińska-Pulit *et al.*, 2015). Las ventajas del uso de encapsulamiento de los bacteriófagos son la protección, estabilidad, disponibilidad y, llegada y adhesión al sitio activo. Aunque la encapsulación puede ser empleada en diversos campos y existe una amplia gama de materiales disponibles para realizar encapsulaciones, aún no se han comparado extensamente, por lo que aún, el conocimiento en cuanto a sus ventajas, restricciones y desventajas es limitado (Prüsse *et al.*, 2008).

Uno de los métodos físicos usados comúnmente en la encapsulación es la extrusión, el cual se caracteriza por la dispersión de un agente activo en un líquido que pasa por presión a través de una sección transversal que permite un goteo constante dejándolas caer sobre una solución que induce a la gelatinización. Este método tiene una alta eficiencia y con el uso de biopolímeros se consigue que estos sean biodegradables, biocompatibles, funcionales, económicos e inoctrinos (Silva *et al.*, 2021; Loh *et al.*, 2021). Los encapsulamientos tienen gran cantidad de aplicaciones tanto en la industria, agricultura, medicina, farmacología y biotecnología (Lin *et al.*, 2016).

2.4.1 Liposomas

Uno de los tipos de encapsulados es la formación de una bicapa lipídica que contiene en su interior una solución acuosa, lo que los vuelve altamente biocompatibles y muy fáciles de producir, seleccionando un tamaño deseado mediante sonicación, extrusión a través de membranas o microfluidos, sin embargo, pueden llegar a adherir y fusionar entre ellas bajo ciertas condiciones. Se ha comprobado que los liposomas pueden penetrar los biofilms bacterianos donde se encuentra el foco de infección y puede mejorar e incluso mantener a los fagos en el sitio (Loh *et al.*, 2021). Para su producción se puede emplear la lecitina de soya, uno

de los ingredientes que se añaden a los alimentos de camarón por su alto contenido de lípidos de entre 15 a 20% donde se encuentran fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Además, contienen vitamina E que protege a los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación y la producción de radicales libres volviéndolo un ingrediente con potencial para la producción de encapsulados en el alimento de camarón (Tamargo-Santos *et al.*, 2011).

2.4.2 Hidrogeles

Otras de las formas más comunes de encapsular partículas son por inmovilización de los fagos en soportes sólidos compuestos de polímeros de origen natural como alginato, agarosa, pectina, quitosano o carboximetilcelulosa (CMC) (Li *et al.*, 1996; Loh *et al.*, 2021). Entre los beneficios que tienen, es la mejora de la actividad antibacterial, permiten mantener la actividad lítica luego del almacenamiento a temperatura ambiente, la liberación prolongada en el organismo y no activan reacciones inflamatorias o producción de anticuerpos. Este tipo de encapsulamiento se puede emplear para el tratamiento o como método profiláctico (Loh *et al.*, 2021).

La encapsulación en hidrogel donde se involucran biopolímeros se prepara fácilmente como una suspensión con el compuesto activo y se emplea en forma de emulsión o se extruyen hacia otra solución que contenga los iones como Ca^{+2} , Zn^{+2} , $\text{Fe}^{+2/+3}$, Co^{+2} , Ba^{+2} o Al^{+3} necesarios para la gelificación. Los hidrogeles además son versátiles, pueden encapsular prácticamente cualquier compuesto y generan altos rendimientos (López-Córdoba *et al.*, 2012).

La aplicación de encapsulados de vibriófagos dentro del alimento para camarón puede resultar beneficioso como un método preventivo y terapéutico contra la infección por Vp AHPND. Esta estrategia permite mantener a los vibriófagos estables y activos por más tiempo en condiciones adversas del medio ambiente, previo a su paso a través del organismo al alimentarse y a la posterior liberación de estas partículas en el agua de los estanques, disminuyendo la población de bacterias patógenas y, por consecuencia mitigan la enfermedad.

3. JUSTIFICACIÓN

La camaronicultura es una industria con un rápido crecimiento y con una alta importancia económica en México. Sin embargo, en los últimos años se ha presentado una enfermedad emergente altamente infecciosa conocida como Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) provocada por *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) que ha generado grandes pérdidas en la producción debido a la producción de toxinas PirAB y la nula respuesta a los métodos comúnmente empleados de desinfección y aplicación de antibióticos, por lo que, requiere nuevas estrategias para su control. Una de las alternativas es el uso de vibriófagos que presentan las ventajas de encontrarse en la naturaleza, relativamente económicos y no generan serios o irreversibles efectos secundarios reportados hasta la fecha, no obstante, se requiere mejorar el método de administración y evitar la desactivación de los fagos por las condiciones ambientales para obtener un tratamiento efectivo. De este modo, la importancia del presente trabajo radica en que es el primer estudio sobre la encapsulación de vibriófagos específicos a AHPND administrados por alimento para camarón con lo que se puede mejorar la supervivencia de los camarones (*Penaeus vannamei*) durante una prueba de reto.

4. HIPOTESIS

La administración de encapsulados de bacteriófagos en el alimento atenuará la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda causada por *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco *Penaeus vannamei*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el uso de bacteriófagos encapsulados en alimento de camarón para el control de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Estandarizar un método de encapsulamiento de vibriófagos para la inclusión en el alimento de camarón.
- 2) Evaluar la actividad y estabilidad de los vibriófagos encapsulados en el alimento.
- 3) Evaluar la eficiencia de control de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND con los alimentos experimentales en un reto in vivo con camarón *Penaeus vannamei*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas

Se empleó la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (CIBGEN003) perteneciente a la colección del laboratorio de Genómica y Bioinformática del CIBNOR, para la producción masiva de los bacteriófagos y como cepa diana durante las pruebas de encapsulación. Para la realización de los bioensayos de infección experimental con terapia activa se empleó la cepa CAIM M605 (CAIM, por sus siglas en inglés) y para la terapia pasiva se empleó la cepa CAIM M904, ambas pertenecientes a la colección del laboratorio de bacteriología y a la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A. C. (CIAD, unidad Mazatlán). Estas se ajustaron en solución salina al 2.5% de NaCl a una densidad óptica de 1.5 a 600 nm ($DO_{600} = 1.5$) usando un biofotómetro (Eppendorf, Merck Darmstadt, Germany), y el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (9.66×10^7 UFC/mL en M0605 y 3.2×10^9 UFC/mL en M0904) se determinó mediante diluciones seriadas en tubos con 2.5% de NaCl en placas de agar soya triptocaseína suplementado con 2.5% de cloruro de sodio (TSA+).

6.2 Bacteriófagos

Los bacteriófagos empleados en el presente estudio se obtuvieron de la colección de bacteriófagos del CIBNOR unidad La Paz, empleando como hospedero de producción a la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN-003 (Tabla 1). Los vibriófagos se encuentran en medio de cultivo caldo soya tripticaseína suplementado con 2.5% de cloruro de sodio (TSB+).

Tabla 1. Colección de bacteriófagos empleados en este trabajo.

Cepa hospedera	Bacteriófagos	Origen	Fuente
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CIBGEN-003	vB_Vp_PvVp05	<i>Penaeus vannamei</i>	Agua de tanque, cultivo de camarón con AHPND
	vB_Vp_PvVp07	<i>Penaeus vannamei</i>	Agua de tanque de cultivo
	vB_Vp_PvVp11	<i>Penaeus vannamei</i>	Sedimento, cultivo de camarón con AHPND

6.3 Encapsulación en alginato

Para la evaluación del uso de alginato de sodio para el encapsulamiento de los fagos, se utilizaron 2 tipos, uno comercial (Deiman, REF. 8060-40g), y uno de mediana viscosidad (Sigma, 201502). Se evaluaron diferentes variables para determinar la estabilidad de encapsulación y posterior liberación de los fagos (Tabla 2). Globalmente, se mezcló 1 mL de un coctel de los vibriófagos vB_Vp_PvVp05 (2.7×10^7 UFP/mL); vB_Vp_PvVp07 (1.9×10^7 UFP/mL); vB_Vp_PvVp11 (2.6×10^7 UFP/mL) (1:1:1) con una densidad de 2.23×10^7 UFP /mL y 9 mL de solución buffer Tris-HCl 50 mM a pH 8, con alginato de sodio comercial o de mediana viscosidad (Mv) al 1%, y con diferentes concentraciones de Tween 20 (0, 1 y 2%) y cloruro de sodio (NaCl) (0 y 2.5%). Posteriormente, se gelificó por goteo mediante una jeringa hipodérmica a través de una aguja 32G en 50 mL de cloruro de calcio (CaCl_2) 50 mM con agitación constante a 150 rpm. Se dejaron endurecer durante 30 min, se filtraron y lavaron con agua destilada. Para algunos casos, los encapsulados se sumergieron en una solución de quitosano-acetato 0.4% durante 20 y 30 min, transcurrido este tiempo se filtraron y se lavaron con agua destilada. Una vez generado los encapsulados se almacenaron a 10°C en tubos Eppendorf limpios.

Tabla 2. Producción de encapsulados con alginato de sodio comercial y de mediana viscosidad.

No. de encapsulado	Tipo de alginato al 1%	pH del buffer	Tween 20 (%)	Recubierta de quitosano (min)	Adición de NaCl	UFP/mL añadido de coctel
1	Mediana viscosidad	8	-	20	-	2.23 x10 ⁷
2	Mediana viscosidad	8	-	30	-	2.23 x10 ⁷
3	Comercial	8	-	20	-	2.23 x10 ⁷
4	Comercial	8	-	30	-	2.23 x10 ⁷
5	Mediana viscosidad	8	1	-	-	2.23 x10 ⁷
6	Mediana viscosidad	8	1	30	-	2.23 x10 ⁷
7	Comercial	8	1	-	-	2.23 x10 ⁷
8	Comercial	8	1	30	-	2.23 x10 ⁷
9	Mediana viscosidad	8	2	-	-	2.23 x10 ⁷
10	Mediana viscosidad	8	2	30	-	2.23 x10 ⁷
11	Comercial	8	2	-	-	2.23 x10 ⁷
12	Comercial	8	2	30	-	2.23 x10 ⁷
13	Mediana viscosidad	8	-	-	2.5	2.23 x10 ⁷
14	Comercial	8	-	-	2.5	2.23 x10 ⁷
15	Mediana viscosidad	8	-	30	2.5	2.23 x10 ⁷
16	Comercial	8	-	30	2.5	2.23 x10 ⁷
17	Mediana viscosidad	8	-	-	-	2.23 x10 ⁷

6.4 Encapsulación en pectina

En el método de encapsulación con pectina (Sigma, 93854) se empleó 1 mL de coctel de vibriófagos a una densidad de 2.23 x10⁷ UFP/mL con diferentes concentraciones de alginato de sodio Mv (1% y 2%), de Tween 20 (0, 1 y 2%), aceite de pescado (0.5 y 5%) y, en 9 mL con buffer Tris-HCl 50 mM a niveles de pH de 6.5, 7 y 8 (Tabla 3). La gelificación de las capsulas de pectina, se empleó la misma metodología descrita en la sección 6.3.

Tabla 3. Producción de encapsulados con pectina y alginato de sodio de mediana viscosidad.

No. de encapsulado	Pectina (%)	Alginato de mediana viscosidad (%)	Tris-HCl pH	Tween 20	Aceite de pescado (%)	UFP/mL añadido
18	1	1	6.5	0.5	5	2.23×10^7
19	1	1	8	0.5	5	2.23×10^7
20	2	0.5	6.5	0.5	0.5	2.23×10^7
21	2	0.5	8	0.5	0.5	2.23×10^7

6.5 Encapsulación en carboximetilcelulosa (CMC)

En la encapsulación con CMC se empleó 1 mL de coctel de vibriófagos a una densidad de 2.23×10^7 PFU/mL con diferentes concentraciones de CMC (1% y 2%) en buffer Tris-HCl 50 mM a pH 8.0 (Tabla 4). La gelificación se realizó como se describe en la sección 6.3 con sustitución de la solución de CaCl_2 por FeCl_3 (1 y 2%).

Tabla 4. Producción de encapsulados con carboximetilcelulosa.

No. de encapsulado	CMC (%)	pH buffer	FeCl_3 (%)	UFP/mL añadido
22	1	8	1	2.23×10^7
23	1	8	2	2.23×10^7
24	2	8	1	2.23×10^7

6.6 Encapsulación en liposoma

Para la preparación de los liposomas catiónicos, se empleó una relación de volumen (1 mL/1 mL) de lecitina de soya: vibriófagos a una densidad de 2.23×10^7 PFU/mL. La mezcla se calentó a 40°C siendo el coctel de bacteriófago el medio de hidratación (Singla *et al.*, 2016). La lecitina de soya se estabilizó en etanol absoluto (1:1 v/v) y se sónico durante 10 min a temperatura ambiente. El solvente orgánico se removió con calor a 40°C y se rehidrato con los vibriófagos en suspensión, la mezcla de lecitina-fago se dejó caer por goteo a través de una jeringa hipodérmica con aguja 32G en agua destilada formando los encapsulados. Los encapsulados se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

6.7 Encapsulación en liofilizados

Se prepararon las soluciones fago-polímero previo a la gelificación empleando un coctel de vibriófagos con densidad de 2.23×10^7 UFP/mL siguiendo las proporciones de los encapsulados No. 9 (1 mL de coctel de vibriófagos, 1% de alginato de sodio Mv, 2% de Tween 20 y 9 mL de buffer Tris HCl pH 8), 20 (1 mL de coctel de vibriófagos a una densidad de 2.23×10^7 UFP/mL, 2% pectina, 0.5% de alginato de sodio de mediana viscosidad, 0.5% de Tween 20, 0.5% de aceite de pescado y 9 mL de Tris HCl pH 6.5) y 22 (1 mL de coctel de vibriófagos a una concentración de 2.23×10^7 UFP/mL, 1% de CMC en 9 mL de buffer Tris HCl pH 8), las soluciones se almacenaron a -10°C durante 24 h y se liofilizaron hasta obtener una muestra libre de humedad. Adicionalmente, se liofilizó una muestra de 1 mL del coctel de vibriófagos (encapsulado No. 29) (Tabla 5).

Tabla 5. Liofilizados de fago-polímeros

No.	Solución fago-polímero liofilizado	UFP/mL añadido
26	No. 9	2.23×10^7
27	No. 20	2.23×10^7
28	No. 22	2.23×10^7
29	Vibriófagos en TSB+	2.23×10^7

6.8 Evaluación de presencia de vibriófagos en las microesferas

La estabilidad y liberación de los vibriófagos en los encapsulados se realizó tomando 0.02 g de encapsulados y se maceraron con 100 μL de: a) solución salina (SD), b) extracto de hepatopáncreas (DE) y c) solución de ruptura de microesferas (citrato de sodio 50 mM, bicarbonato de sodio 0.2 M y Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) (BF). En el caso de la primera prueba de liberación de vibriófagos encapsulados en alginato de sodio comercial y Mv al 1 y 2%, se homogenizó con la ayuda de vortex y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. El homogenizado se centrifugó a 12500 rpm, a 4°C por 15 min y se recuperó el sobrenadante. Se empleó el método de prueba de punto descrito por Adams en 1959, agregando 13 μL del sobrenadante sobre placas de TSA+ sembradas de forma masiva con la cepa CIBGEN 003 y se incubó durante 24 h a 30°C . Las zonas de transparencia indican la presencia de los vibriófagos activos.

6.9 Producción de alimentos a diferentes temperaturas

Con la finalidad de evaluar la termolabilidad de los fagos encapsulados en los alimentos, se seleccionaron los mejores métodos de encapsulamiento observados a partir de la evaluación previa de presencia de los fagos en los encapsulados. Los encapsulados de alginato de sodio Mv al 1% (encapsulado No.9), pectina al 2% con alginato de sodio Mv al 0.5% (encapsulado No. 20), CMC al 1% (encapsulado No. 22), liposomas y los liofilizados de encapsulado de pectina preparados con el coctel de vibriófagos a una densidad de 2.27×10^7 UFP/mL se mezclaron con 15 g de una mezcla de alimento balanceado de camarón (35% proteína, 8% lípidos). Adicionalmente, se prepararon alimentos con 1 mL del coctel de vibriófagos sin encapsular y con 1 mL de vibriófagos liofilizado para mantener la misma concentración de vibriófagos añadidos inicialmente. La mezcla de los alimentos con los diferentes encapsulados (Tabla 6) se hidrato con aproximadamente 4 ml de agua. Los alimentos húmedos con encapsulados y con cocteles de vibriófagos sin encapsular se pasaron a través de un molino de carne para darle la forma de pellets y se secaron en horno a 80, 90, 100 y 110°C durante 8 min. Posteriormente se dejaron secar a 40°C durante 4 h y 30 min. Los alimentos se almacenaron a temperatura ambiente, en oscuridad y se analizó el UFP durante 2 meses y medio (75 días).

Tabla 6. Alimentos experimentales con diferentes tipos de encapsulados de vibriófagos en alimentos de camarón horneados a 80, 90, 100 y 110°C.

Tratamiento	Encapsulado	UFP/mL añadidos de coctel	Descripción
1	-	0	Control sin vibriófago
2	-	2.27×10^7	Control con vibriófago, 1 mL de vibriófagos en TSB+
3	9	2.27×10^7	Encapsulado en alginato
4	20	2.27×10^7	Encapsulado en pectina
5	22	2.27×10^7	Encapsulado en carboximetilcelulosa
6	25	2.27×10^7	Liposoma
7	27	2.27×10^7	Liofilizado en pectina según el encapsulado 20
8	29	2.27×10^7	Liofilizado de vibriófago en TSB+

6.10 Preparación de los alimentos para camarón para el desafío experimental

A partir de la prueba de elaboración de alimento a diferentes temperaturas, se seleccionó una estrategia para la realización de los bioensayos. Se elaboraron 800 g de un alimento referencial de acuerdo a la Tabla 7 y un alimento experimental al que se le adicionó 83.9 g de encapsulados de alginato de sodio preparados en la misma proporción que el encapsulado No. 9 (1% de alginato de sodio Mv, 87.2% de Tris HCl pH 8 y 2% Tween 20) empleando 36 mL del coctel de un coctel de vibriófagos a una densidad de 9.73×10^8 UFP/mL obtenido a partir de la mezcla de los vibriófagos vB_Vp_PvVp05 (7.06×10^8 UFP/mL); vB_Vp_PvVp07 (7.73×10^8 UFP/mL); vB_Vp_PvVp11 (9.53×10^8 UFP/mL) (1:1:1). Las mezclas de ingredientes para el alimento se hidrataron con 340 mL de agua, se homogenizaron y se pasaron a través de un molino de carne dándole la forma de pellet, se secaron en horno a 80°C durante 8 min y se terminaron de secar a 40°C durante 4 h y 30 min. El alimento se almaceno a 4°C, en oscuridad y se analizó el UFP durante 3 meses (100 días).

Tabla 7. Ingredientes y formulación de alimento balanceado para camarón (para 1000 g).

Ingredientes	Gramos
Harina de pescado (69%- sardina)	200
Harina de soya	305
Harina de trigo	413
Lecitina de soya	40
Aceite de pescado	25
Vitamina C	1
Premezcla de vitaminas y minerales	5
Cloruro de colina	1
Aglutinante inerte (alginato)	10
Total	1000

6.11 Evaluación de la actividad de los vibriófagos encapsulados en el alimento

Los alimentos se analizaron tomando muestras de 100 mg que se maceraron en 1 mL de solución salina 2.5% de NaCl, la mezcla se centrifugo a 12500 rpm a 4°C por 15 min y se recuperó el sobrenadante. Para determinar la densidad de vibriófagos se empleó el método de superposición de agar suave (TSA+ con 12 g/L de bactoagar BD Difco REF. 214010-454 g) de

acuerdo con el procedimiento estandarizado descrito por Kropinski *et al.*, (2009) con modificaciones. Se utilizó la cepa CIBGEN 003 suspendida en solución salina al 2.5% NaCl ($DO_{600} = 1.5$ que corresponde a 2.21×10^8 UFC/mL), 100 μ L de esta suspensión bacteriana y 100 μ L del sobrenadante de los alimentos se mezclaron en 8 mL de TSA+ suave diluido y a temperatura de 48°C. Una vez homogenizado se vertió sobre una placa de TSA+ delgado y se dejó secar. Cada muestra de sobrenadante de alimento se analizó en dilución seriada por triplicado y se incubaron por 24 h a 30°C; las calvas o puntos claros indicaron la cantidad de vibriófagos activos en el alimento.

6.12 Liberación de los fagos en el tracto digestivo del camarón

Para verificar la liberación y el paso de los vibriófagos encapsulados e incorporados en los alimentos a través del sistema digestivo del camarón, se distribuyeron 5 camarones con un peso promedio de 1 g en tanques de 50 L por tratamiento, los organismos se alimentaron con los alimentos experimentales mencionados en la Tabla 6 horneados a 80°C. Se dejó a los camarones alimentarse durante 1 h y 30 min, concluido el tiempo se recolectaron sus heces, se diseccionaron los estómagos e intestinos y se almacenaron en tubos Eppendorf con 1 mL de solución salina 2.5% NaCl. Cada muestra se macero y se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm a 4°C para recuperar el sobrenadante. Una vez recuperado el sobrenadante se empleó la técnica de superposición de agar suave como se describe en la sección 6.11 y se verifico la formación de calvas a las 24 h.

6.13 Evaluación *in vivo* de la fagoterapia en camarón

Se realizaron 2 bioensayos para evaluar la fagoterapia de forma pasiva y de forma activa. Se evaluaron 4 tratamientos en total para cada bioensayo (Figs. 1 y 2); 2 con el alimento experimental con el coctel de vibriófagos (control de fagos y terapia de fagos) y 2 con el alimento referencia sin fagos (control negativo y control positivo) elaborados en la sección 6.10. Durante la prueba de fagoterapia pasiva con la cepa M0904, se les suministro a los organismos el alimento referencial sin fagos y experimental de vibriófagos con una densidad de 3.2×10^8 UFP/g con 2 semanas de haber sido elaborado. Para la prueba de fagoterapia activa con la cepa

M0605 se realizó con el alimento referencial sin vibriófagos y experimental con una densidad de 1.30×10^5 UFP/g a las 15 semanas de haber sido elaborados.

Una vez elaborados los alimentos experimental y referencial se evaluó su composición química proximal de acuerdo con la siguiente metodología: proteína cruda (método de combustión Dumas, Ebeling, 1968), lípidos (método 2003.05; AOAC, 2005), cenizas (método 942.05; AOAC, 2005) y fibra cruda (método 978.10; AOAC, 2005). También se estimó el extracto libre de nitrógeno (ELN) restando del 100% en base seca, el porcentaje de proteína, lípidos, ceniza y fibra cruda.

6.13.1 Condiciones de aclimatación

a) Terapia pasiva

Un total de 280 juveniles tempranos *Penaeus vannamei* con un peso promedio de 0.19 g (\pm 0.1 g) se dividieron en dos grupos de 140 camarones y se aclimataron por 3 días en tanques de 400 L con agua marina (33-34 g L⁻¹ salinidad) filtrada (10 y 5 μ m) y desinfectada con radiación UV. Cada tanque contaba con aireación individual, temperatura constante (30°C \pm 1°C), y un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad. Uno de los grupos de camarones fue alimentado con un alimento referencia y el otro grupo con el alimento experimental con bacteriófagos encapsulados a una densidad de 3.2×10^8 UFP/g, ambos se administraron en una proporción de 15% de biomasa total. Los camarones fueron alimentados 3 veces al día.

b) Terapia activa

Un total de 120 juveniles tempranos de *Penaeus vannamei* con un peso promedio de 0.12 g (\pm 0.05 g) se mantuvieron por 7 días en un tanque de 400 L con agua marina (33-34 g/L salinidad) filtrada (10 μ m y 5 μ m). El tanque contaba con aireación, temperatura constante de 27°C \pm 1°C, además de un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad y con recambios de agua al 70% diarios. Los organismos se alimentaron con alimento referencial (sin vibriófagos) en una proporción de 15% de biomasa total con dos raciones diarias. Posteriormente se hizo una selección de organismos de 0.07 a 0.17 g para distribuirlos en los acuarios correspondientes que contendrían los tratamientos para el desafío experimental de la sección 6.13.3.

6.13.2 Preparación del inóculo

a) Terapia pasiva

Para elaborar el inóculo para la terapia pasiva se cultivó la cepa Vp M0904 siguiendo la metodología de Aguilar-Rendón *et al.*, (2020). Se inoculó 100 μ L de bacteria en 60 mL de caldo TSB+ y después se incubó en horno de incubación (NB-205L, N-Biotek) a 30°C durante 18 h con agitación constante (100 rpm). Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 2521 g a 20°C por 15 min para retirar el medio de cultivo y se realizó una suspensión bacteriana en solución salina 2.5% NaCl ajustada a $DO_{600} = 1.5$ (1.57×10^9 CFU/mL). La infección fue realizada por el método de inmersión inoculando 3.5 mL de la suspensión bacteriana a cada acuario de los tratamientos de control positivo y terapia de fagos. La densidad real mencionada se estimó realizando diluciones seriales y conteo de colonias en TCBS.

b) Terapia activa

Para elaborar el inóculo para la terapia activa se tomó la cepa Vp M0605 criopreservada en un ultracongelador a -80°C de la colección CAIM, posteriormente se reactivó en 10 mL de caldo TSB+, después se incubó a 30°C durante 24 h con agitación constante (100 rpm) de acuerdo con la metodología de Aguilar-Rendón *et al.*, (2020). Posteriormente, se sembró en TSA+ durante 18 h y se realizó una suspensión bacteriana en solución salina al 2.5% NaCl ajustada a una densidad óptica de $DO_{600} = 1.502$ (2.21×10^8 UFC/mL). La infección fue realizada por el método de inmersión inoculando 21 mL de la suspensión a cada acuario de los tratamientos de control positivo y terapia de fagos. La densidad real mencionada se estimó realizando diluciones seriales y conteo de colonias en TCBS.

6.13.3 Desafío experimental con camarones

a) Terapia pasiva

Para la terapia pasiva se colocaron 14 camarones por acuario, con un peso promedio de 0.19 g (± 0.05 g) con 5 réplicas por tratamiento. Cada acuario contenía 30 L de agua marina (33-34 g/L salinidad) filtrada (10 μ m y 5 μ m). Los tratamientos fueron establecidos como se indica en la terapia pasiva con tres controles: control negativo, control positivo, control de fagos y, una

terapia de fagos. Los organismos fueron alimentados de acuerdo al tratamiento, con alimento referencial o experimental, 24 h previos a la infección y se eliminaron los restos de alimento y heces 1 h previo a la infección (Fig. 1). La densidad bacteriana se cuantifico en medio TCBS a las 0, 8, 12, 24 y 48 horas post infección (hpi).



Figura 1. Esquema de los tratamientos del desafío experimental en terapia pasiva con la cepa M0904 y el alimento experimental con encapsulados de vibriófagos. Control negativo sin infección, control de fagos con alimento experimental sin infección, control positivo con infección y terapia de fagos con alimento experimental e infección.

b) Terapia activa

En la terapia activa se colocaron 10 camarones por acuario con un peso promedio de 0.12 g (\pm 0.05 g) con 3 réplicas por tratamiento. Cada acuario contenía 4 L de agua marina (33-34 g/L salinidad) filtrada (10 μ m y 5 μ m). Se colocaron tres tratamientos control: el control negativo que contenía solo los organismos sin infectar con alimento referencial, un control de fagos con alimento experimental con vibriófagos encapsulados preparado en la sección 6.10 (3 meses después de su producción y que contiene 1.30×10^5 UFP/g) y un control positivo infectado con la cepa M0605 y, finalmente, un tratamiento de terapia de fagos con el alimento experimental que contiene vibriófagos encapsulados e infectado con la cepa M0605 (Fig. 2). Los organismos de todos los tratamientos fueron alimentados en una proporción de 11% de biomasa total con dos raciones diarias durante 24 h antes y durante toda la infección. Durante la infección se observó mortalidad, cambio de mudas, actividad y coloración del hepatopáncreas. La concentración bacteriana se cuantifico en medio TCBS a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas post infección (hpi).



Figura 2. Esquema de los tratamientos del desafío experimental en terapia activa con la cepa M0605 y el alimento experimental con encapsulados de vibriofagos. Control negativo sin infección, control de fagos con alimento experimental sin infección, control positivo con infección y terapia de fagos con alimento experimental e infección.

6.14 Análisis estadísticos

Los datos se analizaron por una ANOVA de dos vías para identificar los efectos de la infección y del alimento con encapsulados de vibriofagos y, se realizó un análisis post hoc de Tukey para determinar si existen diferencias entre tratamientos. Se realizarán adicionalmente un análisis de supervivencia Kaplan-Meier para generar una curva de supervivencia. Los análisis se realizaron mediante el lenguaje de programación estadístico R versión 4.1.2.

7. RESULTADOS

7.1 Encapsulación en alginato

Las primeras soluciones vibriófagos-polímero sin encapsular mantuvieron la actividad de los vibriófagos con alginato de sodio comercial y de mediana viscosidad al 1 y 2% con Tween 20 al 0, 1 y 2%, siendo el mejor resultado la solución que contiene alginato de mediana viscosidad al 1 y 2% sin adición de Tween 20. El efecto lítico de los vibriófagos no fue detectable añadir NaCl al 2.5% (Tabla 8). En el caso de los primeros encapsulados con ambos alginatos presentaron calvas principalmente en la digestión con extracto de hepatopáncreas (DE) para el alginato de mediana densidad al 2% y para el alginato comercial al 1 y 2%. La digestión con buffer (DF) tuvo efecto con el alginato a mediana viscosidad al 1 y 2% y, en el alginato comercial al 1%. La digestión con solución salina (SD) solo tuvo efecto sobre las capsulas de alginato comercial al 1% (Tabla 9). Finalmente, en los capsulados con alginato al 1% continuaron viables, presentaron calvas con bajo efecto, cuando se digirieron con DE los encapsulados presentaron la mejor liberación, el mayor efecto lítico fueron el No. 5 (1% alginato Mv, 1% Tween 20), 7 (1% alginato comercial), 9 (1% alginato Mv, 2% Tween 20), 13 (1% alginato Mv, 2.5% Tween 20) y 17 (1% alginato Mv, sin Tween 20). Todos los encapsulados que presentaron calva no se endurecieron en quitosano (Tabla 10).

Tabla 8. Efecto de una prueba de superposición de agar suave de las soluciones polímero-vibriófagos. Alginato de mediana viscosidad (Mv) y alginato comercial (C) al 1 y 2% en buffer sin adiciones y adicionados con NaCl al 2.5% o Tween 20 al 1% y 2%.

Tipo de alginato de sodio	Buffer sin adiciones	Buffer al 2.5% NaCl	Adición de Tween 1%	Adición de Tween 2%
1% Mv	A	B	A	A
2% Mv	A	B	A	A
1% C	M	B	A	A
2% C	M	B	A	A

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio y (A) alto

Tabla 9. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en alginato de sodio. Alginato de mediana viscosidad (Mv) y alginato comercial (C) al 1 y 2%. Los encapsulados están digeridos en solución salina 2.5% NaCl, en extracto de hepatopáncreas de camarón y en solución de ruptura de microesferas.

Tipo de alginato de sodio	Digestión en solución salina 2.5%		Digestión en extracto de hepatopáncreas		Digestión en solución de ruptura de microesferas	
	No molido	Molido con pistilo	No molido	Molido con pistilo	No molido	Molido con pistilo
Mv 1%	-	B	B	B	-	B
Mv 2%	-	B	B	B	-	B
C 1%	-	B	B	B	-	B
C 2%	-	B	M	B	-	B

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio

Tabla 10. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en alginato de sodio elaborados en la sección 6.3, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.

No. de encapsulado	Digerido en solución salina 2.5% NaCl	Digerido en extracto de hepatopáncreas
1	B	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	B	M
6	-	-
7	B	M
8	-	-
9	B	M
10	-	-
11	B	B
12	-	-
13	B	M
14	B	B
15	-	-
16	-	-
17	B	B

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio

7.2 Encapsulación en pectina

Los encapsulados con pectina y alginato de sodio Mv se probaron en digestión con sol. Salina 2.5% NaCl y extracto de hepatopáncreas, donde el mayor efecto lítico liberado fue el encapsulado No. 20 (2% pectina, 0.5% alginato Mv, 0.5% Tween 20, 0.5% aceite de pescado con pH 6.5) al ser digerido con SD y DE. El encapsulado No. 19 (1% pectina, 1% Mv, 0.5% Tween 20, 5% aceite de pescado con pH 8) presentó un efecto lítico intermedio en la digestión con SD y DE y, el encapsulado 18 (1% pectina, 0.5% Mv, 0.5% Tween 20, 0.5% aceite de pescado con pH 6.5) presentó un efecto lítico bajo al ser digerido con DE y nulo al digerirlo con SD. El encapsulado 21 (2% pectina, 0.5% alginato Mv, 0.5% Tween 20, 0.5% aceite de pescado con pH 8) presentó un efecto lítico nulo en la liberación de vibriófagos con digestión con SD y DE (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en pectina con alginato de sodio elaborados en la sección 6.4, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.

No. de encapsulado	Digerido en solución salina 2.5% NaCl	Digerido en extracto de hepatopáncreas
18	B	B
19	M	M
20	A	A
21	-	-

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio y (A) alto.

7.3 Encapsulación con carboximetilcelulosa

Los encapsulados con carboximetilcelulosa (CMC) No. 22 (1% CMC gelificado en 1% FeCl₃), 23 (1% CMC en 2% FeCl₃) y 24 (2% CMC en 1% FeCl₃) se probaron con digestión con SD y DE (Tabla 12). El mejor efecto de la liberación de los vibriófagos fue el encapsulado No. 22 elaborado con 1% CMC gelificado en 1% FeCl₃ y digeridos con DE al mostrar un área de lisis más amplia pero no se mostró efecto lítico al digerir con SD. La digestión con SD y DE en el resto de encapsulados no mostró un efecto positivo de lisis por los vibriófagos.

Tabla 12. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en carboximetilcelulosa elaborados en la sección 6.5, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.

No. encapsulado	Digerido en solución salina 2.5% NaCl	Digerido en extracto de hepatopáncreas
22	B	M
23	B	B
24	B	B

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio y (A) alto.

7.4 Encapsulación de liofilizados y liposoma

El liposoma (No. 25) y el liofilizado de alginato de sodio de Mv (1% Mv, 2% Tween 20, sin cubierta de quitosano) y de pectina (2% pectina, 0.5% Mv, pH 6.5, 0.5% Tween 20, 0.5% aceite de pescado) no presentaron efecto lítico al ser digeridos con SD y DE. Por otro lado, el liofilizado 28 (1% CMC, pH 8) y 29 (vibriófagos en medio de cultivo TSB) presentaron efecto lítico con el mejor efecto en el de vibriófagos liofilizados sin polímero de encapsulamiento (encapsulado No. 29) (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de encapsulados en carboximetilcelulosa elaborados en la sección 6.6 y 6.7, digeridos en solución salina 2.5% NaCl y en extracto de hepatopáncreas.

No. encapsulado	Digerido en solución salina 2.5% NaCl	Digerido en extracto de hepatopáncreas
25	B	B
26	B	B
27	B	B
28	M	B
29	A	A

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio y (A) alto.

7.5 Producción de alimentos a diferentes temperaturas

Los alimentos con vibriófagos a temperatura de 80°C presentó la mayor actividad lítica con los tratamientos 2 (vibriófagos sin encapsular en TSB+) y 3 (1% Mv, 2% Tween 20, sin recubierta de quitosano), seguido de los tratamientos 6 (liposomas) y 8 (liofilizado de vibriófagos sin polímero en TSB+) que presentaron una menor lisis. Los alimentos horneados a 90°C mantuvieron un

mismo nivel de actividad lítica en los tratamientos 2, 3, 6 y 8. Cuando se horneó a 100°C se mantuvo la actividad lítica igual en los tratamientos 2 y 3 y, cuando se horneó a 110°C se perdió la mayor actividad siendo los tratamientos 2 y 3 los únicos que conservaron una baja actividad lítica (Tabla 14).

Tabla 14. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de los alimentos que contienen encapsulados de acuerdo con la sección 6.9 y horneados a temperaturas de 80 – 110°C.

No.	Descripción	Temperaturas			
		80	90	100	110
1	Control sin vibriófagos	-	-	-	-
2	Control con vibriófago, 1 mL de vibriófagos en TSB+	A	M	M	B
3	Encapsulado en alginato	A	M	M	B
4	Encapsulado en pectina	-	-	-	-
5	Encapsulado en carboximetilcelulosa	-	-	-	-
6	Liposoma	B	M	B	-
7	Liofilizado en pectina	-	-	-	-
8	Liofilizado de vibriófago en TSB+	M	M	B	-

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio y (A) alto.

7.6 Evaluación de la estabilidad de los vibriófagos encapsulados en el alimento

Los alimentos horneados a 80, 90, 100 y 110°C se analizaron y cuantificó el UFP durante 2 meses y medio. Determinado que la mayor actividad lítica se presentó en los alimentos con encapsulados en alginato de sodio Mv y con fagos sin encapsular, en menor medida se presentó actividad en los alimentos con liposomas y con liofilizados de los fagos en TSB.

Los alimentos horneados a 80°C presentaron la mayor actividad lítica, en el alimento con encapsulados en alginato se presentó una cantidad inicial de 1.49×10^7 UFP/g y final de 4.20×10^6 UFP/g, en los fagos sin encapsular la cantidad inicial fue de 9.07×10^6 UFP/g y final de 2.43×10^6 UFP/g, en los alimentos con liposomas la cantidad inicial fue de 2.95×10^5 UFP/g y una final de 9.43×10^4 UFP/g y, con liofilizados de los fagos en TSB se obtuvo una cantidad inicial de 1.75×10^5 UFP/g y final de 3.87×10^4 UFP/g (Fig. 3).

A la temperatura de 90 (Fig. 4) y 100°C (Fig. 5) presentaron una disminución de la actividad con respecto a la temperatura de horneado de 80°C mientras que la menor cantidad de actividad encontrada fue a la temperatura de 110°C (Fig. 6) donde la cantidad inicial en el alimento con fago sin encapsular fue de 3.38×10^6 UFP/g y final de 5.13×10^4 UFP/g, en el alimento con encapsulados en alginato de sodio la cantidad registrada fue de 8.87×10^4 UFP/g y final de 4.97×10^6 UFP/g, en el alimento con liofilizados de los fagos en TSB no se detectó actividad lítica a esta temperatura.

Al analizar el alimento experimental con encapsulados de alginato de sodio Mv horneado a 80°C elaborado para el desafío experimental como se describe en la sección 6.10, se identificó una concentración inicial de 3.20×10^8 UFP/g después de terminado el proceso de elaboración y, una concentración final de 1.3×10^5 UFP/g luego de 14 semanas de almacenamiento, lo que indica una caída de la actividad lítica de 10^3 UFP/g (Fig. 7). En la composición química proximal de los alimentos (Tabla 15), se obtuvo una concentración de 34.5% proteína, 8.6% lípidos, 7.2% ceniza y 49% de ELN.

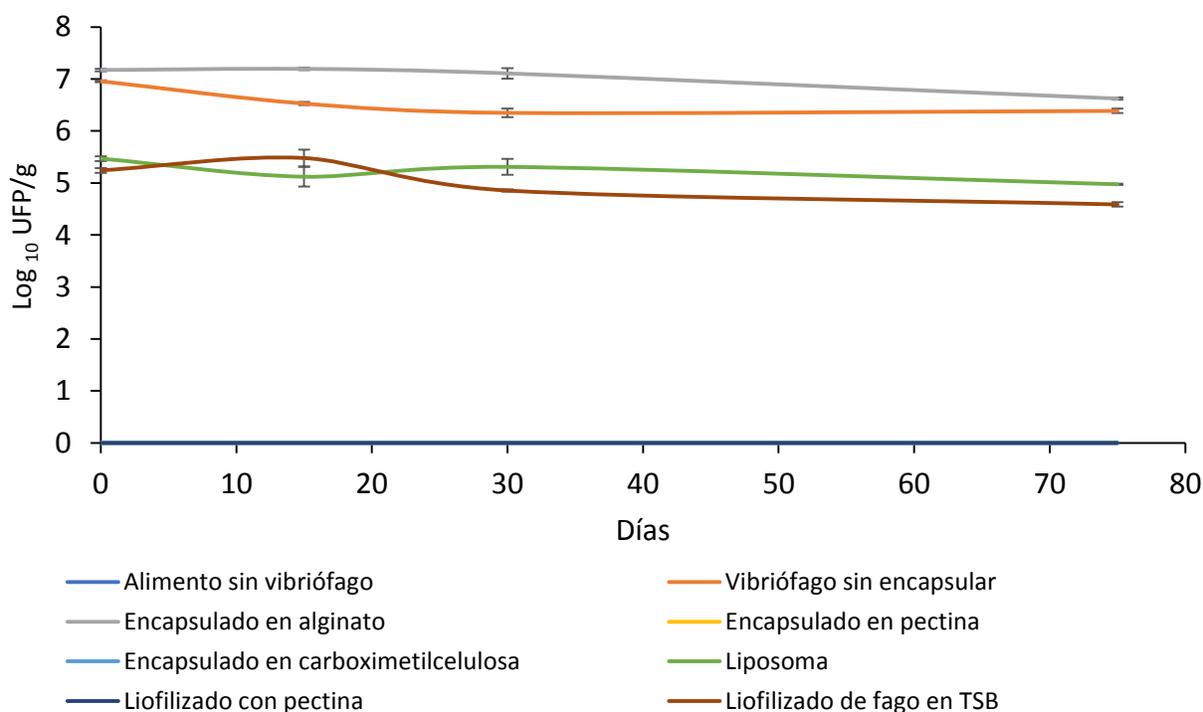


Figura 3. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 80°C durante 2 meses y medio.

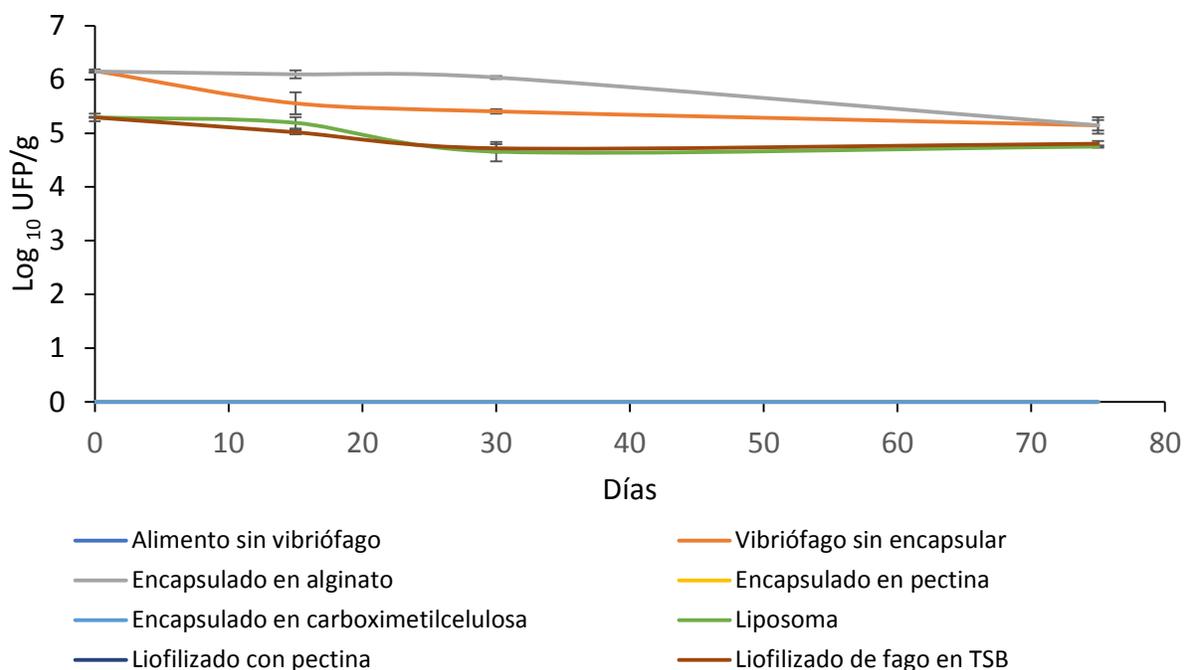


Figura 4. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 90°C durante 2 meses y medio.

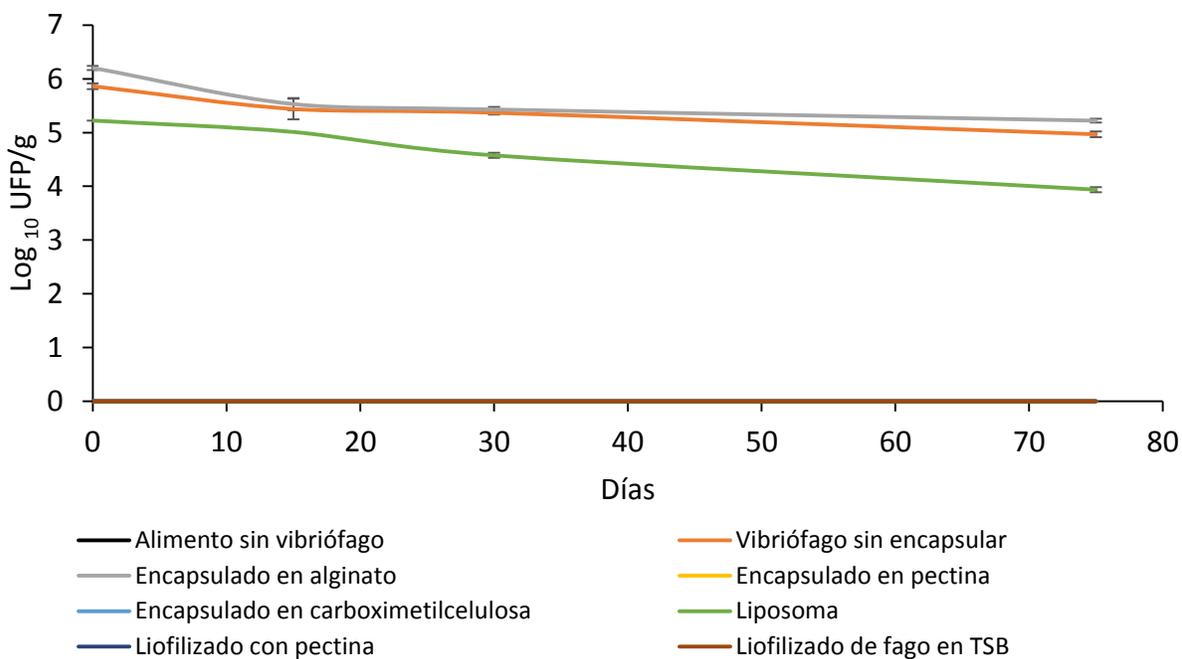


Figura 5. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 100°C durante 2 meses y medio.

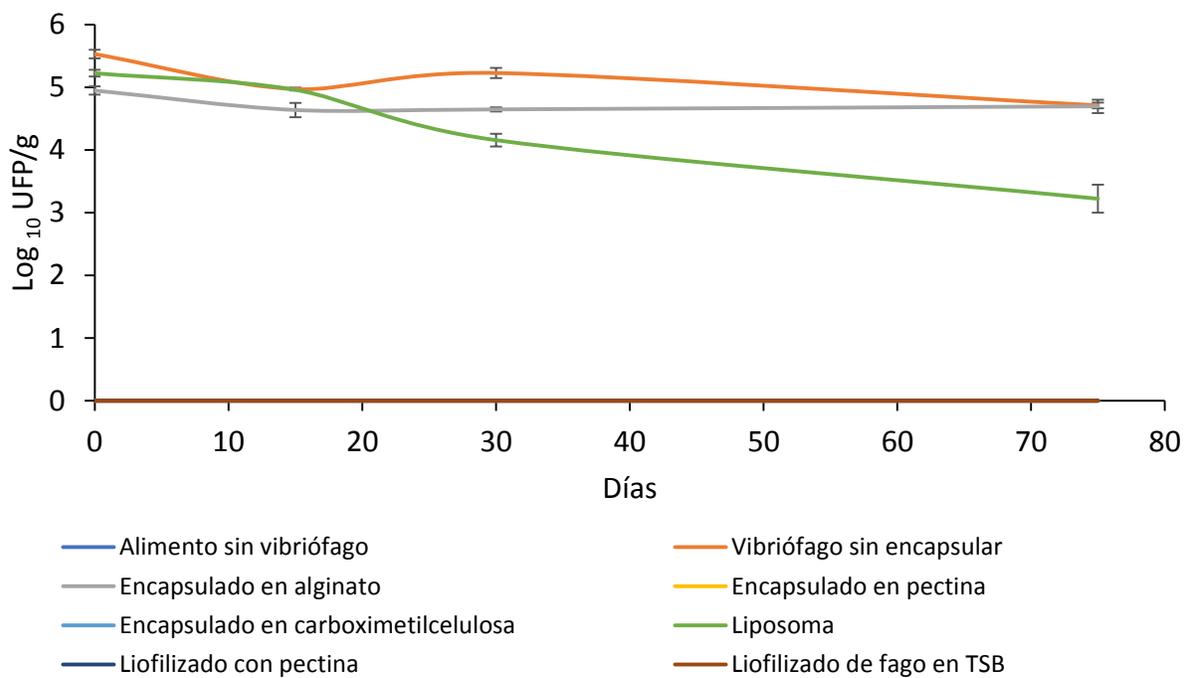


Figura 6. Análisis de UFP/g de los alimentos experimentales horneados a 110°C y, cuantificados durante 2 meses y medio.

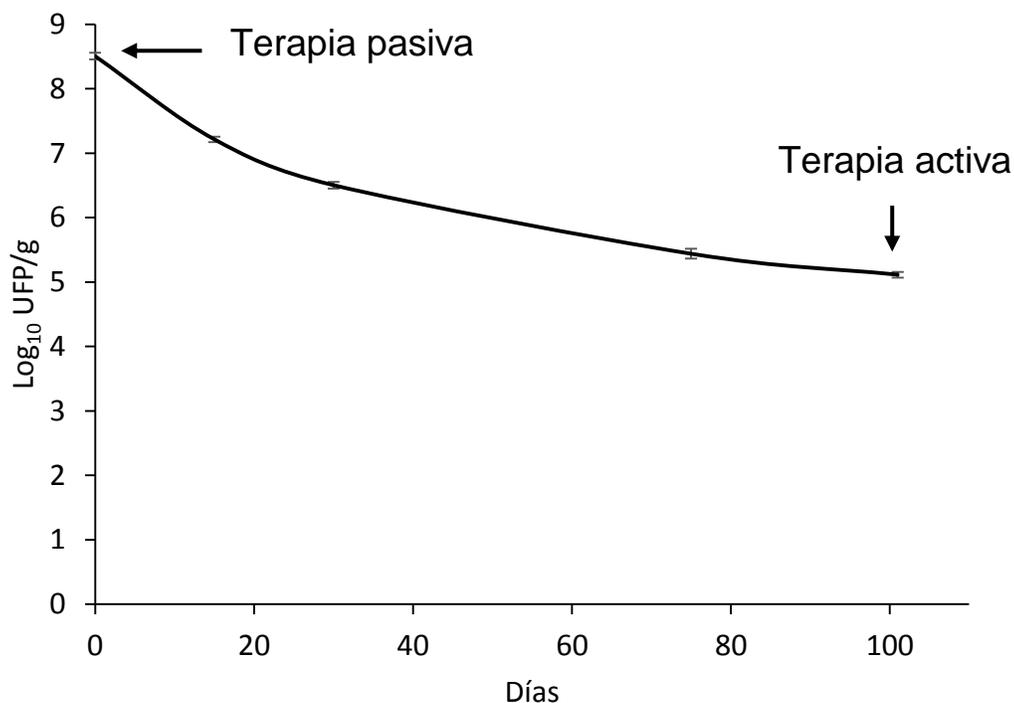


Figura 7. Análisis de UFP/g del alimento experimental con encapsulados en alginato de sodio horneado a 80°C elaborado para el desafío experimental y cuantificados durante 14 semanas (101 días) posterior a su elaboración.

Tabla 15. Evaluación de la composición química proximal del alimento referencial y experimental.

Muestra	Proteína (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)
Alimento referencial	34.52	8.60	0.39	7.28	49.21
Alimento experimental	34.56	8.54	0.40	7.25	49.25

7.7 Liberación de fagos en el tracto digestivo del camarón

Los alimentos horneados a 80°C que se prepararon en la sección 7.5 se suministraron a los organismos para evaluar la digestibilidad. Los alimentos con vibriófagos que fueron capaces de liberar los vibriófagos y atravesar el sistema digestivo del camarón hasta su liberación en las heces fueron los que contienen vibriófagos sin encapsular, encapsulados de alginato, liposomas y el liofilizado de vibriófagos sin encapsular. De estos los mejores resultados fueron de los alimentos con vibriófagos sin encapsular y con encapsulados de alginato. Los alimentos con

encapsulados de pectina, de carboximetilcelulosa y el liofilizado en pectina solo se pudieron detectar en el estómago del camarón y no lograron tener una liberación o estabilidad hasta el intestino del organismo, de estos presentó el alimento con encapsulado de pectina presentó la mayor concentración de vibriófagos en el estómago (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto de la prueba de superposición de agar suave de la prueba de digestibilidad de los alimentos con encapsulados en camarón a partir de estómago, intestinos y heces de los organismos luego del consumo del alimento.

No.	Descripción	Estomago	Intestino	Heces
1	Control sin vibriófagos	-	-	-
2	Control con vibriófago, 1 mL de vibriófagos en TSB+	A	A	A
3	Encapsulado en alginato	A	A	A
4	Encapsulado en pectina	A	B	B
5	Encapsulado en carboximetilcelulosa	B	-	-
6	Liposoma	B	B	B
7	Liofilizado en pectina	B	-	-
8	Liofilizado de vibriófago en TSB+	M	B	B

Niveles de efecto: (B) bajo, (M) medio y (A) alto

7.8 Bioensayos de fagoterapia

7.8.1 Terapia pasiva

El análisis microbiológico del agua de los acuarios mostró que la mayor densidad de *Vibrio* spp. no fermentativos en TCBS (colonias verdes) se presentó en el control positivo y la terapia de fagos, sin encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos dos tratamientos durante el bioensayo excepto a las 12 hpi. La mayor densidad bacteriana se observó a las 0.25 hpi donde alcanzaron valores de 2.5×10^5 UFC/mL en el control negativo y 8.5×10^5 UFC/mL en la terapia de fagos. A partir de este tiempo, la densidad se mantuvo en descenso hasta alcanzar valores de 4×10^1 UFC/mL en el control negativo y 1×10^1 UFC/mL en la terapia de fagos. Por lo tanto, el coctel de vibriófagos administrado a través del alimento no tuvieron un efecto detectable en la inhibición de vibrios en la terapia de fagos. Entre los tratamientos de control negativo y de fagos, no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) durante el bioensayo. La mayor carga de *Vibrio* spp. de colonias verdes se detectó a las 8 hpi con 5×10^1 UFC/mL en el control negativo y

1×10^2 UFC/mL en el control de fagos; mientras que la densidad bacteriana se mantuvo en descenso hasta ser indetectables a las 48 hpi (Fig. 8).

En el caso del análisis de *Vibrio* spp. fermentativos en TCBS (colonias amarillas), no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los 4 tratamientos durante el bioensayo. Se identificó que la mayor densidad en el control positivo se alcanzó a las 0.25 hpi con 1.6×10^4 UFC/mL y a las 8 hpi en el control negativo con 2.62×10^4 UFC/mL; el control de fagos con 2.08×10^4 UFC/mL y la terapia de fagos con 4.85×10^4 UFC/mL. La densidad se redujo progresivamente hasta que a las 48 hpi, observando la menor densidad de 1.28×10^3 UFC/mL en el control negativo, 5.6×10^2 UFC/mL en el control de fagos, 5×10^2 UFC/mL en la terapia de fagos y 3.7×10^2 UFC/mL en el control positivo (Fig. 9).

La mortalidad en el bioensayo inició a las 6 hpi en los tratamientos de control positivo y terapia de fagos, y continuo hasta alcanzar mortalidades del 71.4% en el control positivo y 80.6% en la terapia de fagos a las 48 hpi. No hubo diferencias significativas entre estos dos tratamientos infectados, mientras que si hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) de estos dos tratamientos con respecto a los controles no infectados (control negativo y de fagos) ($p > 0.05$) (Fig.10).

Al terminar el bioensayo se diseccionaron los hepatopáncreas, donde se observó que los organismos infectados con la cepa presentaron una coloración muy pálida de este órgano, mientras que los hepatopáncreas del control negativo presentaron una coloración café claro normal y el control de fagos una coloración oscura normal (Anexo 4).

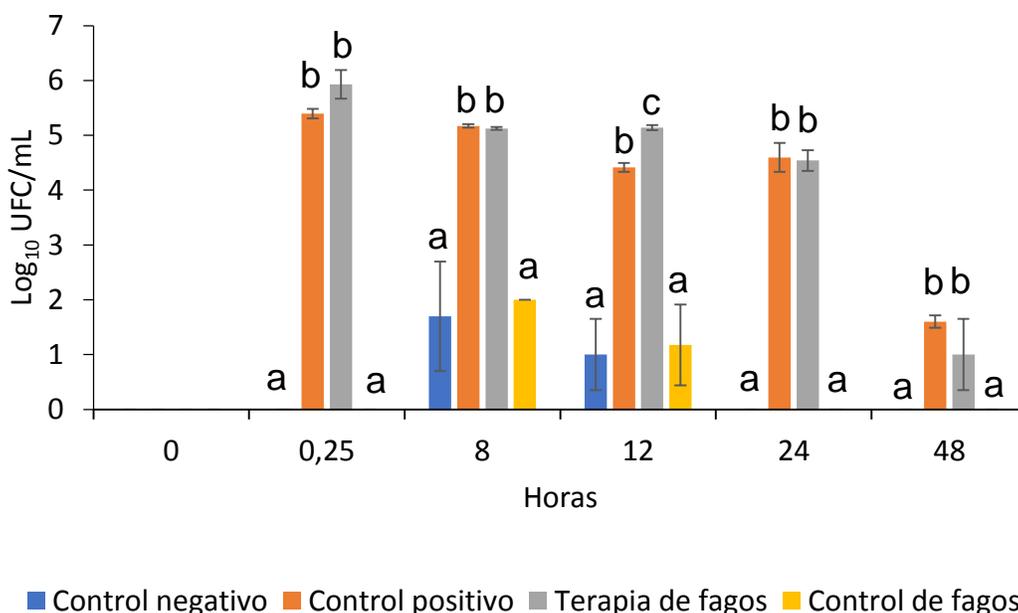


Figura 8. UFC/mL de las colonias verdes durante el bioensayo de terapia pasiva con M0904 y el alimento experimental elaborado para el desafío con vibriófagos encapsulados en alginato de sodio, utilizando ANOVA de una vía donde la variable dependiente fue la densidad bacteriana (UFC/mL) y la variable categórica el tratamiento (n=5).

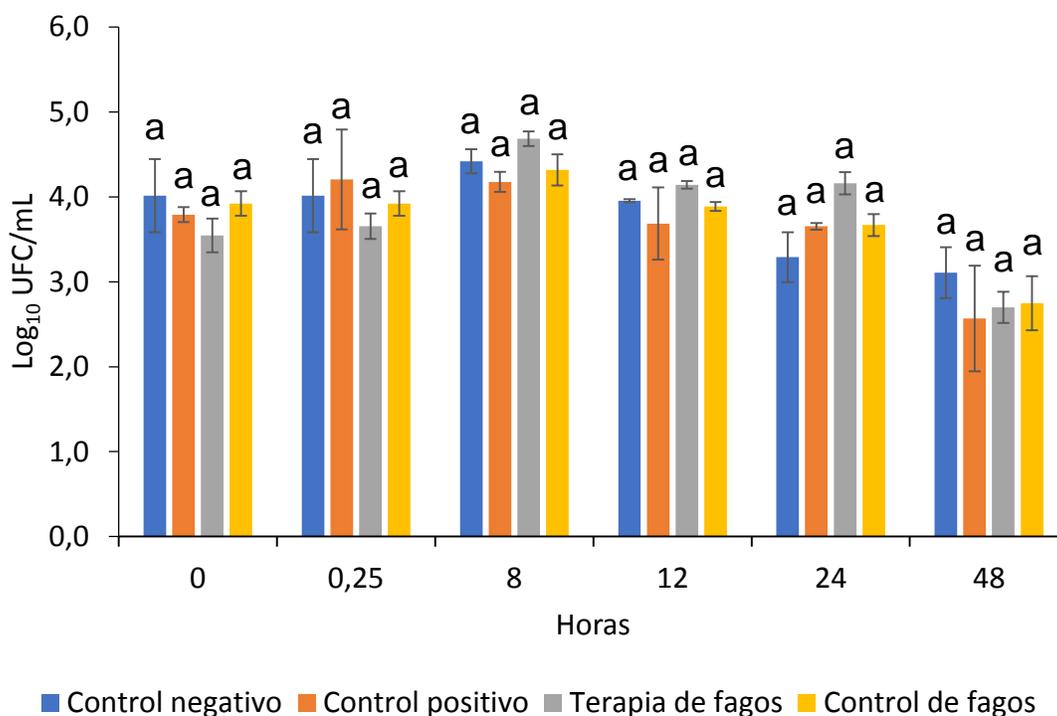


Figura 9. Análisis de UFC/mL de las colonias amarillas durante el bioensayo de terapia pasiva con M0904 y el alimento experimental elaborado para el desafío con vibriófagos encapsulados en alginato de sodio, utilizando ANOVA de una vía donde la variable dependiente fue la densidad bacteriana (UFC/mL) y la variable categórica el tratamiento (n=5).

Estimador Kaplan-Meier

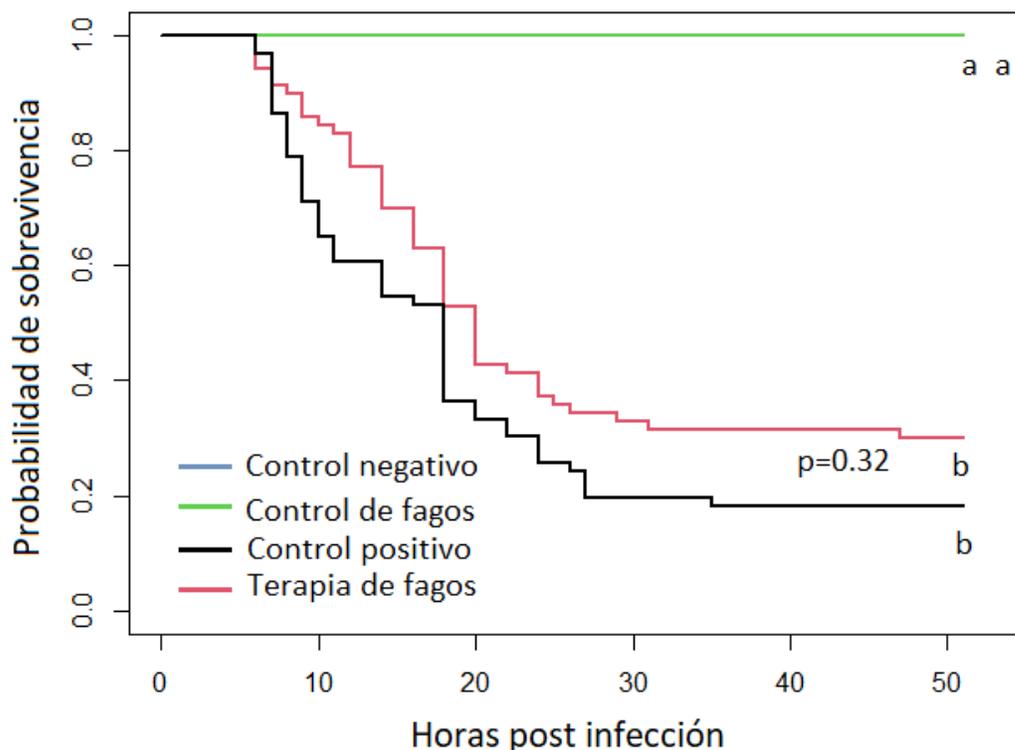


Figura 10. Análisis de supervivencia de los camarones durante el bioensayo de terapia pasiva con M0904 y el alimento experimental a 3.2×10^8 UFP/g ($n=5$).

7.8.2 Terapia activa

El análisis microbiológico de colonias verdes del agua en los acuarios indicó que la mayor densidad de *Vibrio* spp con coloración verde en medio TCBS en el control negativo y el control de fagos se presentó a las 0.25 hpi con 3.11×10^4 UFC/mL y 1.09×10^4 UFC/mL respectivamente. Esta densidad comenzó a descender a partir de las 6 hpi y a las 48 hpi, donde alcanzó una densidad de 1.11×10^2 UFP/mL en el control negativo y 1.22×10^2 UFP/mL en el control de fagos, sin presentar diferencias significativas ($p > 0.05$) entre estos dos tratamientos. En el caso de la terapia de fagos, la mayor densidad se alcanzó a las 6 hpi con 5.41×10^6 UFC/mL, mientras que en el control positivo se dio a las 12 hpi con 5.54×10^6 UFC/mL. La densidad más baja fue a las 48 hpi de 1.62×10^3 UFC/mL en el control positivo y 5.56×10^1 FC/mL en la terapia de fagos, sin presentar diferencias significativas entre estos tratamientos ($p > 0.05$) hasta las 6 hpi. A partir de las 12 hpi y hasta la finalización del bioensayo (48 hpi), se presentaron diferencias

significativas ($p < 0.05$) entre estos dos tratamientos con infección, mientras que no hubo diferencias significativas entre la terapia de fagos y los controles negativo y de fagos en ese rango de tiempo (Fig.11).

El análisis de UFC de colonias amarillas en el agua de los acuarios indicó que la mayor densidad de vibrios se alcanzó a las 6 h en todos los tratamientos con 1.2×10^6 UFC/mL en la terapia de fagos, 8.91×10^5 UFC/mL en el control negativo, 8.79×10^5 UFC/mL en el control positivo y 5.42×10^5 UFC/mL en el control de fagos. A partir de las 12 h, las UFC de colonias amarillas comenzaron a descender. La densidad más baja de las colonias amarillas se dio a las 48 hpi con 8.8×10^3 UFC/mL en el control negativo, 4.96×10^3 UFC/mL en el control de fagos, 1.5×10^3 UFC/mL en la terapia de fagos y 9.56×10^2 UFC/mL en el control positivo. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos durante el bioensayo (Fig. 12).

El UFP se obtuvo del análisis del agua de cada acuario de los controles negativo y positivo, donde no se obtuvo efecto lítico a partir de la prueba de superposición de agar suave, lo que indica que no contienen bacteriófagos. Por otra parte, el control de fagos y la terapia de fagos presentaron dosis iniciales muy bajas de fagos libres en el agua de 2.2×10^1 UFP/mL, aumentando conforme se continuó la alimentación de los organismos y con la lisis de la cepa diana en la terapia de fagos. Esto permitió al tratamiento de terapia de fagos aumentar su concentración con respecto al control de fagos, finalizando a una densidad de 6.7×10^1 UFP/mL en el tratamiento del control de fagos y en 1.4×10^2 UFP/mL en la terapia de fagos. Entre los tratamientos de control de fagos y terapia de fagos y, entre el control negativo y el control positivo no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$); mientras que entre los tratamientos de control de fagos y terapia de fagos si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Fig. 13).

Así mismo se observaron características de los organismos de cada tratamiento, donde se identificó una baja cantidad de mudas; únicamente a las 15 hpi en el control positivo y control de fagos. Además, en ese mismo tiempo se presentó en el control positivo la mayor hiperactividad de los organismos ($> 60\%$), se identificó más del 40% con coloración pálida del hepatopáncreas y un menor consumo de alimento. El control de fagos presentó la mayor

hiperactividad a las 20 hpi; se observaron algunos camarones (<10%) con coloración ligeramente pálida del hepatopáncreas y de igual forma, el menor consumo de alimento se dio a las 15 hpi al observarse mayor cantidad de restos de alimento no consumido. En los camarones con terapia de fagos, se observó la mayor hiperactividad (>50%) a las 20 hpi, el menor consumo de alimento se observó a las 15 hpi. El control negativo presentó la mayor hiperactividad a las 15 hpi (>60%), el 100% de los organismos mantuvo la coloración del hepatopáncreas normal y a las 15 hpi el consumo disminuyó hasta un 60%. El consumo de alimento aumentó a las 35 hpi (Anexo 2 y 3). No se presentó mortalidad.

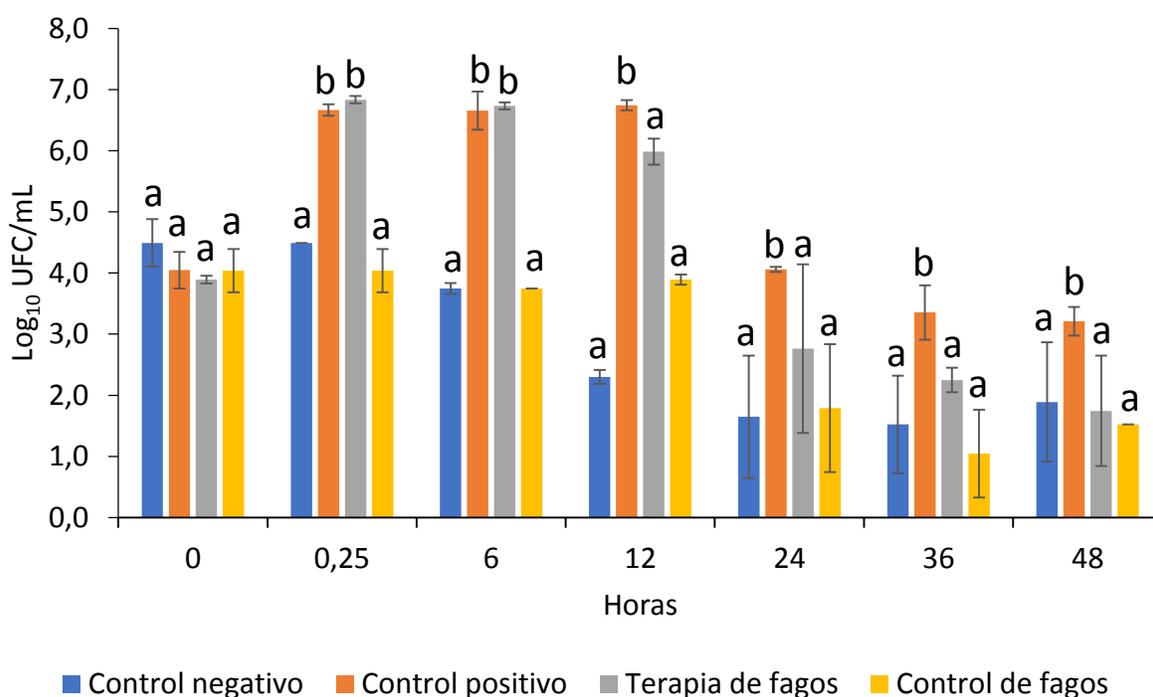


Figura 11. Análisis de UFC de las colonias verdes durante el bioensayo de terapia activa con M0605 y el alimento experimental con fagos encapsulados en alginato de sodio (n=3).

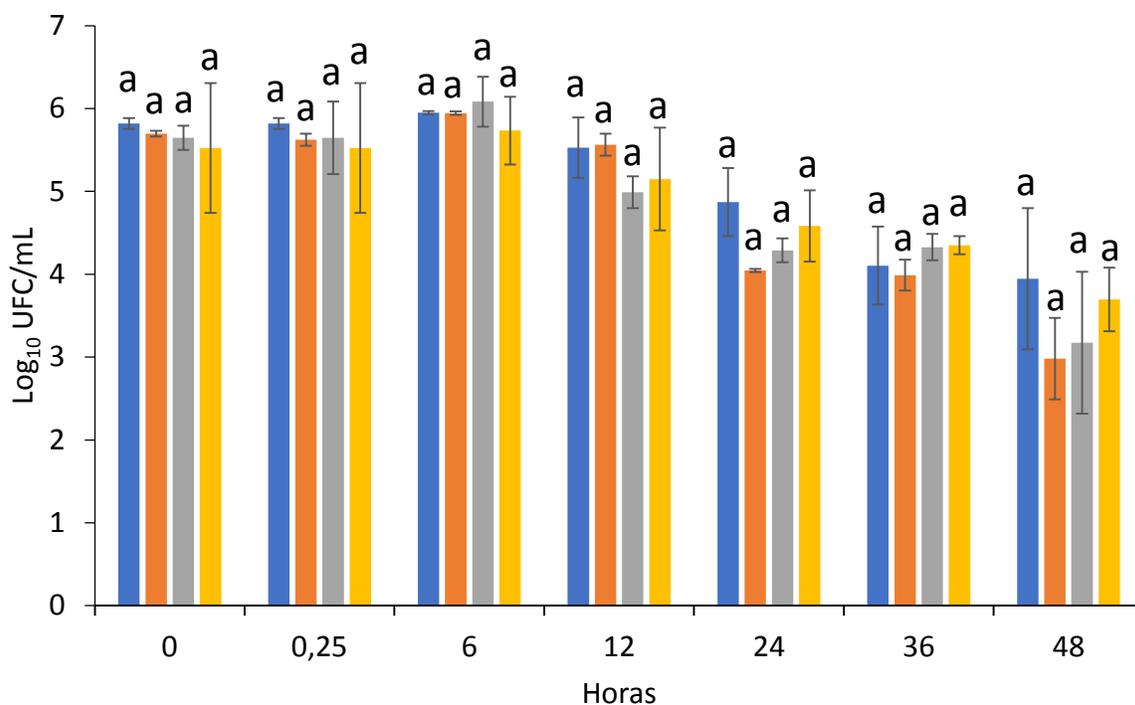


Figura 12. Análisis de UFC de las colonias amarillas durante el bioensayo de terapia activa con M0605 y el alimento experimental con fagos encapsulados en alginato de sodio, ND indica que no hubo diferencias significativas entre tratamientos (n=3).

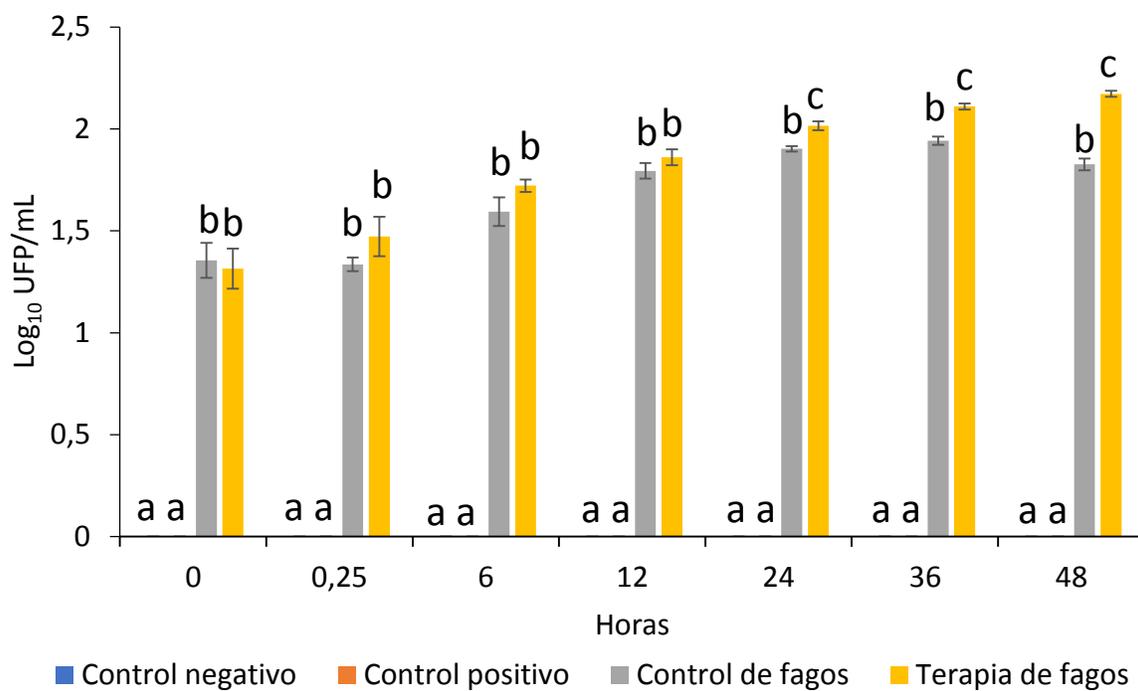


Figura 13. Análisis de UFP/mL de agua durante el bioensayo de terapia activa con M0605 y el alimento experimental con fagos encapsulados en alginato de sodio, n=3.

8. DISCUSIÓN

8.1 Encapsulación del coctel de fagos

En la acuicultura comercial, las condiciones que generan estrés en los organismos como la sobrealimentación, temperaturas altas, recambios frecuentes y las altas densidades, pueden propiciar condiciones idóneas para la aparición y propagación de enfermedades bacterianas (Richards, 2014). El uso regular de los antibióticos ha contribuido a la generación de bacterias multirresistentes como en el caso de *Vibrio parahaemolyticus* causante de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopáncreática Aguda (AHPND) (Han *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017). El AHPND afecta a múltiples especies de camarón y se caracteriza por la severa atrofia del hepatopáncreas con un desprendimiento masivo de las células epiteliales en la etapa aguda de la enfermedad (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015). Las infecciones por bacterias multirresistentes se consideran como una importante limitante para el desarrollo de la producción acuícola, por ello, se buscan alternativas para el control y prevención de infecciones como el uso de la terapia de fagos, implementando el uso de cocteles que evitan la aparición de bacterias resistentes a los fagos (Tran *et al.*, 2013; Mateus *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2015). Sin embargo, la aplicación de fagos en acuicultura presenta la limitante de ser inactivados por factores ambientales, una forma de evitar esto es la encapsulación o inmovilización que permiten mejorar la eficiencia del tratamiento. En este sentido, se debe tomar en cuenta el estrés químico y físico durante el proceso de encapsulamiento y durante el almacenamiento que podrían inactivar los fagos y reducir su eficacia como tratamiento (Malik, 2021).

Al respecto, en el presente trabajo la encapsulación con alginato de sodio adicionado con Tween 20 al 1 y 2%, permiten un adecuado encapsulamiento de los fagos, esto puede ser debido a que Tween 20 es un tensioactivo no iónico que reduce la aglomeración y una mejor dispersión de los fagos para su correcta encapsulación (Richards y Malik, 2021). En cambio, el efecto lítico de los vibriófagos no fue detectable al añadir los vibriófagos en el buffer al 2.5% de NaCl, posiblemente se deba a que la interacción de NaCl puede generar un comportamiento repulsivo entre algunos bacteriófagos (Mylon *et al.*, 2010). Por otra parte, la liberación de los fagos con extracto de hepatopáncreas aumentó al eliminar el recubrimiento en quitosano. Esto

difiere con lo reportado por Yongsheng *et al.*, (2008) y Kim *et al.*, (2015) quienes encapsularon el fago Felix O1 que infecta al género *Salmonella* y O157:H7 que infecta a *Escherichia coli*, respectivamente. En estos trabajos emplearon una cubierta de quitosano manteniendo la estabilidad de los fagos después de someterlos a una digestión ácida ($\text{pH} = 2$) y con enzimas digestivas y, que posteriormente fueron liberados del encapsulado. En este caso, al emplearse en una digestión con enzimas digestivas de camarón (con un pH óptimo de 7) (Fox *et al.*, 2006) no se logró la solubilización de la cubierta de quitosano y, por tanto, de la liberación adecuada de los vibriofagos encapsulados (Silva *et al.*, 2016). Por otra parte, aunque las bacterias en el tracto digestivo de los camarones pueden sintetizar quitinasa para la digestión de la quitina, no existe evidencia de que posean enzimas como la quitosanasa para la degradación del quitosano (Tzuc *et al.*, 2014). Por otro lado, el quitosano es soluble a $\text{pH} < 6.5$ (Cusihuamán-Noa *et al.*, 2018), condición que no se produce durante la digestión en los camarones que presentan una digestión a pH de 7.2 a 7.4 (Fox *et al.*, 2006), a diferencia de los animales con digestión ácida a la que están dirigidos los estudios de Kim *et al.*, (2015) y Yongsheng *et al.*, (2008) que manejaron rangos de pH de 2.0-2.5 y 2.8 – 4.4, por lo que, se optó por descartar la aplicación del quitosano en la encapsulación del presente trabajo.

En cuanto a la encapsulación con pectina combinado con alginato de sodio, la eficiencia de encapsulación y liberación de fagos fueron similares cualitativamente a los encapsulados solo con alginato de sodio. Esto puede ser debido a que el alginato produce un mejor acomodo de los fagos en la red de gel durante la gelificación mientras que la pectina tiene una gelificación más lenta propiciando a la difusión de los fagos fuera de la matriz. Este resultado es similar al descrito por Dini *et al.*, (2012), quienes encapsularon el fago CA933P en 3% de pectina con emulsificación y en alginato, de las cuales consiguieron una liberación de los fagos casi en la misma medida entre estas dos encapsulaciones de aproximadamente 6 log UFP/cápsula.

Para el caso de las capsulas de carboximetilcelulosa (CMC) con fagos, la encapsulación y liberación de los fagos fue poco eficiente, coincidiendo con el trabajo de Bogantes *et al.*, (2018) quienes encapsularon nematodos obteniendo un bajo rendimiento debido a la acidez de la solución de FeCl_3 que llega a ser de un pH muy ácido (<1) a diferencia de la solución de CaCl_2 ,

empleada en la gelificación del alginato y pectina, que tiene un pH cercano a 7 (Bogantes *et al.*, 2018). Esta acidez de la solución durante la encapsulación podría explicar por qué se detectó una disminución de los vibriófagos activos en los encapsulados con CMC.

Respecto a los liposomas formados a partir de los fosfolípidos presentes en la lecitina de soya, no mostraron un resultado eficiente en la prueba de encapsulación y liberación de los vibriófagos. A diferencia del trabajo de Colom *et al.*, (2015), quienes encapsularon en diferentes liposomas los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 de los que obtuvieron una liberación de 49, 48 y 47%, respectivamente. En estos liposomas, además de los fosfolípidos se empleó colesterol, con lo que se sugiere que la adición de colesterol mejora la estabilidad del liposoma.

8.2 Evaluación de la actividad lítica de los encapsulados en el alimento

A partir de la evaluación de los alimentos se obtuvo que la mejor encapsulación y liberación de los vibriófagos fue con los encapsulados de alginato de sodio, manteniendo cerca del 100% de actividad justo después del horneado temperaturas de 80, 90, y 100°C. Para este método de encapsulación, la actividad lítica se mantuvo cercana al 30% después de 75 días de almacenaje del alimento. Por otro lado, a 110°C en los diferentes métodos, incluyendo el método con alginato, presentaron baja afectividad (<3% de viabilidad de los fagos).

Esto último puede ser debido a que los geles de alginato son estables a temperaturas de 0-100°C pero sobre 100°C la estructura comienza a despolimerizarse, lo que puede provocar que los vibriófagos se vean expuestos a las altas temperaturas y se pierda la actividad lítica. Por otra parte, hornear los alimentos a temperaturas en las que los encapsulados se mantienen estables aseguran una conservación de la estructura y, por tanto, evitan la degradación de los vibriófagos que se encuentran recubiertos por el polímero (Bennacef *et al.*, 2021). La eficiencia reportada en la encapsulación en alginato de sodio puede, adicionalmente, ser producto de su alta solubilidad en agua (Hartmann *et al.*, 2006) permitiendo que una vez macerado o consumido por los camarones se liberen de forma efectiva los vibriófagos y puedan pasar a través del

sistema digestivo del organismo que representa la principal ruta de infección (Imaizumi *et al.*, 2021).

Por otra parte, Sampaio *et al.*, (2019) concluyeron que los encapsulados de pectina de un concentrado de licopeno, un pigmento carotenoide de color rojo, obtenido a partir de sandía que se sometió a una temperatura de 90°C mantuvo el 92% del contenido de licopeno encapsulado integro. Comparado con este trabajo, es probable que la encapsulación con pectina no fue eficiente, ya que la liberación de los vibriófagos en el alimento a las temperaturas de 80-110°C no fue detectable: Sin embargo, si se observó actividad de los fagos en el estómago de los organismos que consumieron el alimento (80°C), lo que también indica que el método de análisis para determinar la viabilidad directo del alimento no fue el óptimo. En un trabajo de Cajiao y Luna (2019) donde encapsularon antocianinas con pectina y alginato, obtuvieron un mayor porcentaje de liberación a pH < 4, por lo tanto, es posible que la cantidad liberada a pH 7.2-7.4 durante la digestión del camarón (Fox *et al.*, 2006) afecte la liberación de los fagos encapsulados.

El alimento con liposomas también presentó un resultado de liberación bajo comparado con los obtenidos por Colom *et al.*, (2015) quienes encapsularon un coctel de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87. Estos encapsulados fueron administrados a gallinas por lo que pasaron a través de la digestión ácida y con enzimas digestivas, al finalizar obtuvieron un rendimiento de 66.7% mientras que, en el presente trabajo, el rendimiento fue de 25%, el cual se mantuvo con poca variación entre 80 y 110°C. Es posible que los liposomas se vean degradados al ser expuestos a las altas temperaturas, por lo que, es más probable que se requiera un método diferente que permita la encapsulación de los vibriófagos en los liposomas ya que el alimento con los fagos sin encapsular presentó una mayor densidad de los mismos indicando que los vibriófagos soportan las temperaturas a las que fueron expuestos (Yin y Faustman, 1993).

Por último, el encapsulado en carboximetilcelulosa no presentó actividad lítica detectable a ninguna de las temperaturas estudiadas. Esto puede ser debido a que la acidez de la solución de FeCl₃ empleada en la gelificación como se mencionó anteriormente, redujera la densidad de

vibriófagos y, posteriormente, al calentarse a las altas temperaturas, se perdiera parte de esta actividad, de la misma manera que en el resto de encapsulados, hasta el punto de ser indetectables.

8.3 Fagoterapia *in vivo*

8.3.1 Terapia pasiva

Durante la terapia pasiva con la cepa M0904 se mantuvo una reducción similar de la densidad de vibrios no fermentativos en TCBS (colonias verdes) entre los tratamientos de la terapia de fagos y el control positivo durante todo el bioensayo, excepto a las 12 hpi, en la cual se observan diferencias significativas entre ambos tratamientos hasta la finalización del bioensayo donde la densidad no mostro diferencias entre ambos tratamientos, está alta reducción puede ser producto de que esta cepa prefiere un estilo de vida bentónico (Aguilar-Rendón *et al.*, 2020). Al igual que en el bioensayo de la terapia activa, no se presentaron diferencias entre el crecimiento de los vibrios fermentativos en TCBS (colonias amarillas), de la misma manera no se vieron afectados por la adición de los vibriófagos ya que estos son bastante específicos y, solo se ha identificado que presentan actividad lítica sobre cepas de *V. parahaemolyticus*. De acuerdo con Aguilar-Rendón *et al.*, (2020) la cepa M0904 se considera altamente virulenta y puede provocar mortalidades de hasta el 86.2% en 123 hpi, durante el bioensayo en el presente trabajo las mortalidad alcanzaron valores similares en los tratamientos de control positivo y terapia de fago a las 48 hpi y, al diseccionar los hepatopáncreas de los camarones supervivientes se observó que en el control positivo y terapia de fago fueron los más dañados con una coloración pálida, por todo lo anterior, se considera que la terapia con vibriófagos no fue efectiva para controlar el crecimiento bacteriano ni reducir los signos de infección cuando se infecta con la cepa M0904. Durante este bioensayo, la mortalidad de los tratamientos con infección (control positivo y terapia de fagos) no tuvieron diferencias significativas, posiblemente se pueda deber a que la enfermedad progreso tan rápidamente que el tratamiento de fagos perdió eficacia, como se observó en el trabajo de Jun *et al.*, (2018) donde en el bioensayo I con el bacteriófago pVp-1 en el alimento dado 1 hpi a una densidad de 1×10^8

UFP/camarón no modifico la mortalidad del 100% en el tratamiento de terapia contra la cepa Vp AHPND 13-028/A3.

8.3.2 Terapia activa

Durante el bioensayo de la terapia activa se analizó el UFC de *Vibrio* spp. no fermentativos en TCBS (colonias verdes) en el agua para identificar el crecimiento bacteriano con el que se identificó un descenso de la densidad bacteriana a partir de las 12 h en el tratamiento de terapia de fago con respecto al control positivo con una reducción significativa de la densidad bacteriana, hasta el punto en el que, al terminar el bioensayo, el UFC de la terapia de fagos alcanzó una concentración similar al del control negativo. Este resultado indica que los vibriófagos aportados a través del alimento han permitido la reducción de la densidad de especies que crecen como colonias de color verde en TCBS (*V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. campbelli* y *V. splendidus* (Thompson *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2009) en el agua, sin embargo, se considera que no fue tan efectivo comparado con otros trabajos como el de Veyrand (2021) donde el fago vB_Pd_PDCC-1 logró reducir la densidad bacteriana hasta ser indetectables en los huevos de jurel tratados.

Al evaluarse la liberación y replicación de vibriófagos en el agua de los tratamientos de terapia de fagos y control de fagos se observaron concentraciones de 10^1 , esta baja liberación de vibriófagos en el agua puede deberse a la retención de los fagos dentro del sistema digestivo del camarón, así como a la desactivación de los vibriófagos por condiciones del ambiente como el cambio de pH, temperatura, salinidad o la presencia de iones (Jończyk *et al.*, 2011). Sin embargo, la terapia de fagos logró reducir la densidad de colonias amarillas en TCBS entre las que se incluye la cepa de infección *V. parahaemolyticus* M0605, además se demostró que los vibriófagos pudieron replicarse a partir de su liberación de los encapsulados y en presencia de la bacteria blanco, ya que, se encontró una densidad mayor en los tratamientos de terapia de fago que en el control de fagos ($p > 0.05$).

Por otra parte, la concentración de *Vibrio* spp. que crecen de color amarillo en TCBS como son *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. furnissii*, *V. fluviales*, *V. owensii*, *V. harveyi*, , *V. orientalis*, *V.*

mediterranei y *V. logei* (Thompson *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005; Balta, 2016; Mahmoud *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2019; Muthukrishnan *et al.*, 2019; Yen *et al.*, 2022; Fan *et al.*, 2023) no se vio afectada a través del bioensayo, esto se debe a que la mayoría de los fagos son bastante específicos pudiendo infectar solo en un rango de bacterias en el nivel de cepas, lo que vuelve poco probable una infección de estos vibriófagos hacia otras cepas que forman parte del ambiente del organismo (Warriner y Namvar, 2011; Kumar *et al.*, 2016) demostrando así, que los vibriófagos pueden interactuar sin afectar de manera negativa a otras especies de bacterias que forman parte del ecosistema en el que se encuentran los organismos y a su vez que reducen la carga bacteriana de la cepa blanco.

Adicionalmente, se identificaron características como la coloración del hepatopáncreas al diseccionarlo, con ello se identificó que los organismos del control negativo, de fagos y la terapia de fagos mostraron una coloración café normal (Kumar *et al.*, 2020) mientras que los organismos en el control positivo presentaron una coloración muy ligeramente pálida, signo de la infección por AHPND (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015), sin embargo, no provoco mortalidades ni daños significativos sobre los organismos en los tratamientos de infección con la cepa M0605, posiblemente, debido a que la cepa fue sembrada en medio de cultivo solido que carece de suficiente espacio para la señalización célula-célula durante el crecimiento de las bacterias (Tran *et al.*, 2013). Este estudio demostró que los encapsulados permiten el mantenimiento de los vibriófagos dentro del alimento durante un tiempo prolongado (de hasta 14 semanas) y su posterior liberación dentro del sistema digestivo del camarón y, consecuentemente, en el agua de los acuarios. Respecto a la terapia pasiva, está no funciona a diferencia de la terapia activa que, aunque no presentó resultados concluyentes se ve un potencial uso para el biocontrol de vibrios, por lo que, es necesario continuar con estos estudios.

9. CONCLUSIONES

- Se realizaron 29 tipos de encapsulados con los biopolímeros de alginato de sodio, pectina, CMC, liposoma y un liofilizado de pectina; de estos se seleccionaron los que presentaron la mayor liberación de los vibriófagos obteniendo 5 encapsulados.
- Entre los alimentos elaborados con los encapsulados seleccionados, el mejor resultado se obtuvo a partir de los encapsulados de alginato de sodio ya que protegen y mantienen durante más tiempo la actividad lítica de los vibriófagos.
- El alimento con encapsulado de fagos disminuyó el crecimiento de la cepa Vp M0605 en el agua en los tratamientos con camarones, sin embargo, no fue posible evaluar la terapia activa contra AHPND.
- El alimento administrado en una terapia pasiva no mostró diferencias en la supervivencia y control de UFC/mL en agua con respecto al control positivo por lo que se concluye que esta estrategia no es efectiva para el biocontrol de la cepa M0904.

10. LITERATURA CITADA

- Adams, M.H. (1959). *Bacteriophages*. Inter-science Publishers, New York.
- Aguilar-Rendón, K.G., Lozano-Olvera, R., Yáñez-Rivera, B. y Soto-Rodríguez, S.A. (2020). Bacteriological and histopathological analysis of *Penaeus vannamei* experimentally infected with *Vibrio parahaemolyticus*-AHPND strains. *Diseases of Aquatic Organisms*, 140: 167-177. doi: 10.3354/dao03503.
- Angulo, C., Loera-Muro, A., Trujillo, E. y Luna-González, A. (2019). Control of AHPND by phages: a promising biotechnological approach. *Reviews in Aquaculture*, 11(4): 989-1004. doi: 10.1111/raq.12275.
- Anh, P.T., Kroeze, C., Bush, S.R. y Mol, A.P.J. (2010). Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control. *Agricultural Water Management*, 97(6): 872-882. doi: 10.1016/j.agwat.2010.01.018.
- Association Official Analytical Chemist [AOAC]. (2005). *Official methods of analysis*. 18th ed. AOAC International, Maryland: USA. ISBN: 0935584773.
- Astigarraga, M.J.T., Amarilla, S.P. y Nara, E.M. (2016). Ehrlichiosis, enfermedad transmitida por garrapatas y potencial zoonosis en Paraguay. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 17(9): 1-9.
- Austin, B. y Austin, D. (2007). *Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish*. 4th ed. Springer, Chichester, United Kingdom. ISBN: 978-1-4020-6068-7.
- Avendaño-Romero, G.C., López-Malo, A. y Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1): 87-96.
- Balta F. (2016). Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum*, isolated from cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the southeast Black Sea, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(10): 4393-4400.
- Bamel, K., Gulati, R., Khushbu, S., Paramveer, S. y Bamel, K. (2022). Vibriosis in shrimp. En: *Agriculture Science: Research and Review*, 1st ed. Bhumi Publishing, Haryana, India. pp. 158-164.
- Bennacef, C., Desobry-Banon, S., Probst, L. y Desobry, S. (2021). Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecules. *Food Hydrocolloids*, 118. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106782.
- Bogantes, D., Flores, L., Castellón, E. y Uribe, L. (2018). Encapsulamiento de nemátodos entomopatógenos en materiales basados en biopolímeros y su efecto sobre *Galleria mellonella*. *Agronomía Costarricense*, 42(2): 9-27. doi: 10.15517/rac.v42i2.33774.
- Brejnholt, S.M. (2010). Pectin. En: *Food stabilisers, thickeners, and gelling agents*. John Wiley & Sons, London. pp. 237-265.
- Broberg, C.A., Calder, T.J. y Orth, K. (2011). *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection*, 13(12-13): 992-1001. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.013.
- Cajiao Orellana, L.E. y Luna Guillén, M.J. (2019). Microencapsulación de Antocianinas de Mortiño (*Vaccinium floribundum*) utilizando una combinación de Alginato y Pectina. *Tesis de Licenciatura*. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Calviño Cala, L., Sánchez Hechavarria, M.E. y García Torres, D.S. (2017). Aspectos farmacológicos de la lecitina de soya y sus posibles aplicaciones médicas. *MediSan*, 21(1): 83-95.

- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews Genetics*, 4: 471-477. doi: 10.1038/nrg1089.
- Chandrakala, N. y Priya, S. (2017). Vibriosis in Shrimp Aquaculture A Review. *International Journal of Scientific Research in Science*, 3(2): 27-33.
- Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W. y Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2): 212-221. doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.001.
- Cisek, A.A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K.P. y Wyżewski, Z. (2017). Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Current Microbiology*, 74: 277-283. doi: 10.1007/s00284-016-1166-x.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., MasPOCH, D. y Llagostera, M. (2015). Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14): 4841-4849. doi: 10.1128/AEM.00812-15.
- Colquhoun, D.J. y Lillehaug, A. (2014). Vaccination against Vibriosis. En: *Fish vaccination*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd. Republic of China. pp 172-184.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). (2022). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca de la comisión nacional de acuicultura y pesca 2021*. México. Disponible en:
https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2021.pdf. [consulta:21 de enero de 2023]
- Cortés, A., Casillas-Hernández, R., Cambeses-Franco, C., Bórquez-López, R., Magallón-Barajas, F., Quadros-Seiffert, W., Feijoo, G. y Moreira, M.T. (2021). Eco-efficiency assessment of shrimp aquaculture production in Mexico. *Aquaculture*, 544. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737145
- Cusihuamán-Noa, S., Talavera-Núñez, M.E., Arenas-Chávez, C., Pacheco-Salazar, D.G. y Vera-Gonzales, C. (2018). Caracterización por técnicas espectroscópicas del O-Carboximetilquitosano obtenido por derivatización del quitosano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(2): 204-216
- De Schryver, P., Defoirdt, T. y Sorgeloos, P. (2014). Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLOS Pathogens*, 10(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1003919.
- de Souza-Valente, C. y Wan, A.H.L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181. doi: 10.1016/j.jip.2020.107527.
- 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 in Biotechnology*, 25(10): 472-479. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.08.001.
- Dini, C., Islan, G.A., de Urza, P.J. y Castro, G.R. (2012). Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: Enhanced protection against acidity and protease activity. *Macromolecular Bioscience*, 12(9): 1200-1208. doi: 10.1002/mabi.201200109.
- Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., Yang, Q., Zhu, Y., Chen, M., Guo, C., Liu, Z., Wang, W. y Huang, J. (2017). *pirAB^{VP}*-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the Same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01859.

- Dong, X., Chen, J., Song, J., Wang, H., Wang, W., Ren, Y., Guo, C., Wang, X., Tang, K.F.J. y Huang, J. (2019). Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*. *Aquaculture*, 503: 396-402. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.016.
- Ebeling M.E. (1968). The Dumas method for nitrogen in feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 51(4): 766-770.
- Fan, C., Liu, S., Dai, W., He, L., Xu, H., Zhang, H. y Xue, Q. (2023). Characterization of *Vibrio mediterranei* isolates as causative agents of vibriosis in marine bivalves. *Microbiology Spectrum*, 11(2). doi: 10.1128/spectrum.04923-22.
- FAO/WHO. (2006). *Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*. Rome. ISBN:92-5-105513-0. Disponible en: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2002). *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome. ISBN: 9251048428. Disponible en: <https://dlc.dlib.indiana.edu/dlc/bitstream/handle/10535/3776/fao02.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome. ISBN: 978-92-5-130562-1. Disponible en: https://www.was.org/aqua18pressconference/documents/FAO2018_TheStateOf_World_Fisheries_And_Aquaculture.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome. doi: 10.4060/ca9231en. Disponible en: <https://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. ISBN: 978-92-5-108276-8. Disponible en: <https://www.fao.org/family-farming/detail/en/c/286731/>
- Fox, J.M., Addison, L.L., Anthony, J.S., D. Allen, D., Denis, R.M., Elizabeth, C.D. y Tzachi, M.S. (2006). Phytase supplementation in aquaculture diets improves fish, shrimp growth performance. In: *Global Aquaculture Alliance*. Disponible en: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/phytase-supplementation-in-aquaculture-diets-improves-fish-shrimp-growth-performance/?headlessPrint=> [consulta: 2 septiembre 2023]
- Franco, A.P. y Mercê, A.L.R. (2006). Complexes of carboxymethylcellulose in water. 1: Cu²⁺, VO²⁺ and Mo⁶⁺. *Reactive and Functional Polymers*, 66(6): 667-681. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2005.10.018.
- Franco, A.P., Recio, M.A.L., Szpoganicz, B., Delgado, A.L., Felcman, J. y Mercê, A.L.R. (2007). Complexes of carboxymethylcellulose in water. Part 2. Co²⁺ and Al³⁺ remediation studies of wastewaters with Co²⁺, Al³⁺, Cu²⁺, VO²⁺ and Mo⁶⁺. *Hydrometallurgy*, 87(3-4): 178-189. doi: 10.1016/j.hydromet.2006.08.013.
- Ghosh, A.K., Panda, S.K. y Luyten, W. (2021). Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review. *Fish and Shellfish Immunology*, 117: 192-210. doi: 10.1016/j.fsi.2021.08.006.
- Golkar, Z., Bagasra, O. y Gene Pace, D. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2): 129-136. doi: 10.3855/jidc.3573.

- Han, J.E., Mohney, L.L., Tang, K.F.J., Pantoja, C.R. y Lightner, D.V. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*, 2: 17-21. doi: 10.1016/j.aqrep.2015.04.003.
- Hartmann, M., Dentini, M., Ingar-Draget, K. y Skjåk-Bræk, G. (2006). Enzymatic modification of alginates with the mannuronan C-5epimerase AlgE4 enhances their solubility at low pH. *Carbohydrate Polymers*, 63(2): 257-262. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.08.052.
- Hong, X., Lu, L. y Xu, D. (2016). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International*, 24: 577-593. doi: 10.1007/s10499-015-9948-x.
- Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H. y Hirono, I. (2021). Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding. *Scientific Reports*, 11. doi: 10.1038/s41598-021-89415-w.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R. y Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiologica*, 56(3): 191-200. doi: 10.1007/s12223-011-0039-8.
- Jun, J.W., Han, J.E., Giri, S.S., Tang, K.F.J., Zhou, X., Aranguren, L.F., Kim, H.J., Yun, S., Chi, C., Kim, S.G. y Park, S.C. (2018). Phage application for the protection from acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei*. *Indian Journal of Microbiology*, 58: 114-117. doi: 10.1007/s12088-017-0694-9.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2009). Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. *Journal of Fish Diseases*, 32(6): 499-507. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x.
- Kim, S., Jo, A. y Ahn, J. (2015). Application of chitosan-alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(4): 913-918. doi: 10.1111/ijfs.12736.
- Kropinski, A.M. (2006). Phage therapy-everything old is new again. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 17(5). doi: 10.1155/2006/329465.
- Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E. y Johnson, R.P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: Clokie M.R.J, Kropinski A.M (eds). *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Clifton: NJ. ISBN: 978-1-60327-164-6
- Kumar, P., Shankar, U. y Paul, P. (2016). Identification the presence of *Vibrio* species by TCBS media in different water samples collected from different locations. *International Journal of Science and Research*, 5(3): 812-816.
- Kumar, R., Ng, T.H. y Wang, H.C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 12(3): 1867-1880. doi: 10.1111/raq.12414.
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B.K., Bossier, P. y Das, B.K. (2021). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*, 13(8). doi: 10.3390/toxins13080524.
- Lai, H.C., Ng, T.H., Ando, M., Lee, C.T., Chen, I.T., Chuang, J.C., Mavichak, R., Chang, S.H., Yeh, M.D., Chiang, Y.A., Takeyama, H., Hamaguchi, H., Lo, C.F., Aoki, T. y Wang, H.C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2): 1006-1014. doi: 10.1016/j.fsi.2015.11.008.

- Laporte, J. (2017). Biocontrol of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). *Master's Theses*. University of Rhode Island. Paper 1134. Disponible en: <https://digitalcommons.uri.edu/theses/1134>.
- Lárez-Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2): 15-21[consulta:25 de septiemb de 2023]
- Lavine, M.D. y Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10): 1295-1309. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9.
- Li, E., Wang, X., Chen, K., Xu, C., Qin, J.G. y Chen, L. (2017). Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1): 57-75. doi: 10.1111/raq.12104.
- Li, R.H., Altreuter, D.H. y Gentile, F.T. (1996). Transport characterization of hydrogel matrices for cell encapsulation. *Biotechnology and bioengineering*, 50(4): 365-373. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960520)50:4<365::AID-BIT3>3.0.CO;2-J.
- Lightner, D.V. (1993). Diseases of cultured penaeid shrimp. En: McVey J.P. (ed). *CRC handbook of mariculture*, 2nd ed. CRC Press, USA. pp. 393-486.
- Lin, S.F., Chen, Y.C., Chen, R.N., Chen, L.C., Ho, H.O., Tsung, Y.H., Sheu, M.T. y Liu, D.Z. (2016). Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads. *PLOS ONE*, 11(4). doi: 10.1371/journal.pone.0153685.
- Liu, X.D., Yu, W.Y., Zhang, Y., Xue, W.M., Yu, W.T., Xiong, Y., Ma, X.J., Chen, Y. y Yuan, Q. (2002). Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. *Journal of Microencapsulation*, 19(6): 775-782. doi: 10.1080/0265204021000022743.
- Loh, B., Gondil, V.S., Manohar, P., Khan, F.M., Yang, H. y Leptihn, S. (2021). Encapsulation and delivery of therapeutic phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5). doi: 10.1128/AEM.01979-20.
- López-Córdoba, A.F., Deladino, L., Navarro, A.S. y Martino, M.N. (2012). Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos. *Limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 10(1): 18-27.
- Mahmoud, M.M., Sayed-Hassan, E., Nour-El-Deen, E.A., Haridy, M., El-Moghny-Salem, F.A. y Abdel-Rahman-Mohamed, M. (2017). Bacterial infections in some Red Sea fishes. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 63(155): 86-93. doi: 10.21608/avmj.2017.170963.
- Makarov, R., Lomelí-Ortega, C.O., Zermeño-Cervantes, L.A., García-Álvarez, E., Gutiérrez-Rivera, J.N., Cardona-Félix, C.S. y Martínez-Díaz, S.F. (2019). Evaluation of a cocktail of phages for the control of presumptive *Vibrio parahaemolyticus* strains associated to acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research*, 50(11): 3107-3116. doi: 10.1111/are.14258.
- Malik, D.J. (2021). Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy. *Current Issues in Molecular Biology*, 40: 303-316. doi: 10.21775/cimb.040.303.
- Mateus, L., Costa, L., Silva, Y.J., Pereira, C., Cunha, A. y Almeida, A. (2014). Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, 424-425: 167-173. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.001.
- Mathur, M.D., Vidhani S. y Mehndiratta, P.L. (2003). Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *Journal of Association of Physicians of India*, 51: 593-596.
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Ina-Salwany, M.Y., Yusoff, F.M., Shariff, M., Ismail, S.I. y Natrah, I. (2019). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic

- Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture*, 511. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734227.
- Mylon, S.E., Rinciog, C.I., Schmidt, N., Gutierrez, L., Wong, G.C.L. y Nguyen, T.H. (2010). Influence of salts and natural organic matter on the stability of bacteriophage MS2. *Langmuir*, 26(2): 1035-1042. doi: 10.1021/la902290t.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovi, V., Levic, S. y Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1: 1816-1820. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.266.
- Okada, N., Matsuda, S., Matsuyama, J., Park, K.S., De Los Reyes, C., Kogure, K., Honda, T. y Iida, T. (2010). Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. *BMC Microbiology*, 10(302). doi: 10.1186/1471-2180-10-302.
- Pillay, T.V.R. y Kutty, M V. (2005). *Aquaculture: principles and practices*, 2nd ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Prada-Peñaranda, C., Holguín-Moreno, A.V., González-Barrios, A.F. y Vives-Flórez, M.J. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(1): 43-59. doi: 10.11144/Javeriana.SC20-1.faci
- Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewińska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C., Nedovic, V., Poncelet, D., Siebenhaar, S., Tobler, L., Tosi, A., Vikartovská, A. y Vorlop, K.D. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62(4): 364-374. doi: 10.2478/s11696-008-0035-x
- Richards, G.P. (2014). Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology. *Bacteriophage*, 4(4). doi: 10.4161/21597081.2014.975540
- Richards, K. y Malik, D.J. (2021). Microencapsulation of bacteriophages using membrane emulsification in different pH-triggered controlled release formulations for oral administration. *Pharmaceuticals*, 14(5). doi: 10.3390/ph14050424.
- Rocha-Gracia, R. del C., Lozano-Zarain, P. y Martínez-Laguna, Y. (2004). *Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero*, 1st ed. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Rushton, J., Pinto Ferreira, J. y Stärk, K. (2014). Antimicrobial resistance: the use of antimicrobials in the livestock sector. *OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers*, 68. doi: 10.1787/5jxvl3dwwk3f0-en.
- Sampaio, G.L.A., Pacheco, S., Ribeiro, A.P.O., Galdeano, M.C., Gomes, F.S. y Tonon, R.V. (2019). Encapsulation of a lycopene-rich watermelon concentrate in alginate and pectin beads: Characterization and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 116. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108589.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2017). Avanza México como una potencia en producción acuícola. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/avanza-mexico-como-una-potencia-en-produccion-acuicola>. [consulta: 20 febrero 2022]
- Silva, B.C., Nolasco-Soria, H., Magallón-Barajas, F., Civera-Cerecedo, R., Casillas-Hernández, R. y Seiffert, W. (2016). Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. *Aquaculture Nutrition*, 22(5): 997-1005. doi: 10.1111/anu.12315.
- Silva-Batalha, L., Pardini-Gontijo, M.T., de Carvalho-Teixeira, A.V.N., Gouvêa-Boggione, D.M., Soto-López, M.E., Renon-Eller, M. y Santos-Mendonça, R.C. (2021). Encapsulation in alginate-polymers improves stability and allows controlled release of the UFV-AREG1 bacteriophage. *Food Research International*, 139. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109947.

- Singla, S., Harjai, K., Katare, O.P. y Chhibber, S. (2016). Encapsulation of bacteriophage in liposome accentuates its entry in to macrophage and shields it from neutralizing antibodies. *PLOS ONE*, 11(4). doi: 10.1371/journal.pone.0153777.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gómez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M. y 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5): 1689-1699. doi: 10.1128/AEM.03610-14.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gómez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Bolanmejia, C., Aguilar-Rendon, K.G. y Enciso-Ibarra, J. (2018). Pathological, genomic and phenotypical characterization of *Vibrio parahaemolyticus*, causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Asian Fisheries Science*, 31: 102-111. doi: 10.33997/j.afs.2018.31.s1.007.
- Su, Y.C., Duan, J. y Wu, W.H. (2005). Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 68(7): 1454-1456. doi: 10.4315/0362-028X-68.7.1454.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. y Morris, J.J. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3): 649-659. doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
- Tamargo-Santos, B., Herrera-Belén, L., Bello-Alarcón, A., Cuéllar, A., González-Rodríguez, H., Sierra-González, G., Morales-González, M. y Ortiz-Zamora, L. (2011). Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (*Glicine max* L), para usos biomédicos. *Revista Cubana de Química*, 23(3): 5-14
- Tang, K.F.J., Bondad-Reantaso, M.G., Arthur, J.R., MacKinnon, B., Hao, B., Alday-Sanz, V., Liang, Y. y Dong, X. (2020). *Shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Strategy Manual*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular no. 1190. FAO, Rome.
- Terroni. (1997). *Manual básico de liofilización*. Terroni Equipamentos LTDA, São Carlos, Brasil.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B. y Swings, J. (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5107-5115. doi: 10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005.
- Thornber, K., Verner-Jeffreys, D., Hinchliffe, S., Rahman, M.M., Bass, D. y Tyler, C.R. (2020). Evaluating antimicrobial resistance in the global shrimp industry. *Reviews in Aquaculture*, 12(2): 966-986. doi: 10.1111/raq.12367.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K. y Lightner, D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1): 45-55. doi: 10.3354/dao02621.
- Tzuc, J.T., Escalante, D.R., Rojas Herrera, R., Gaxiola Cortés, G. y Ortiz, M.L.A. (2014). Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus*, 3(1): 1-10. doi: 10.1186/2193-1801-3-280.
- Uribe-Mendoza, B.I. (2015). La invención de los animales: una historia de la veterinaria mexicana, siglo XIX. *Historia, Ciencias, Saude - Manguinhos*, 22(4): 1391-1409. doi: 10.1590/S0104-59702015000400010.
- Vaiyapuri, M., Pailla, S., Rao Badireddy, M., Pillai, D., Chandragiri Nagarajarao, R. y Prasad Mothadaka, M. (2021). Antimicrobial resistance in Vibrios of shrimp aquaculture: Incidence,

- identification schemes, drivers and mitigation measures. *Aquaculture Research*, 52(7): 2923-2941. doi: 10.1111/are.15142.
- Veyrand Quirós, B. (2021). 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. *Tesis Doctoral*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Disponible en: <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/2358>.
- Warriner, K. y Namvar, A. (2011). Biosensors for foodborne pathogen detection. In: *Comprehensive Biotechnology*. (3rd. ed.). Elsevier, Ontario: Canada. pp. 659-674. ISBN 978-0-444-64046-8
- Weber-Dąbrowska, B., Mulczyk, M. y Górski, A. (2001). Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. En: Górski A., Krotkiewski H., Zimecki M. (eds). *Inflammation*, 1st ed. Springer, Dordrecht, pp. 201-209.
- Yen, P.T.H., Tram, N.D.Q. y Linh, N.Q. (2022). Isolation and determination of *Vibrio* spp. pathogen from *Sciaenops ocellatus* suffering from hemorrhagic disease under cage culture in Vietnam. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10(2): 405-415. doi: 10.18006/2022.10(2).405.415.
- Yin, M.C. y Faustman, C. (1993). Influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: A liposome model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6): 853-857. doi: 10.1021/jf00030a002.
- Yongsheng, M., Pacan, J.C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. y Sabour, P.M. (2008). Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15): 4799-4805. doi: 10.1128/AEM.00246-08.
- Zeng, H., Ye, H., Li, S., Wang, G. y Huang, J. (2010). Hepatopancreas cell cultures from mud crab, *Scylla paramamosain*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 46: 431-437. doi: 10.1007/s11626-009-9259-5.
- Zuppi, M., Hendrickson, H.L., O'Sullivan, J.M. y Vatanen, T. (2022). Phages in the Gut Ecosystem. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.822562.

11. ANEXOS

Anexo 1. Fotos de las pruebas de superposición de agar suave de los encapsulados.

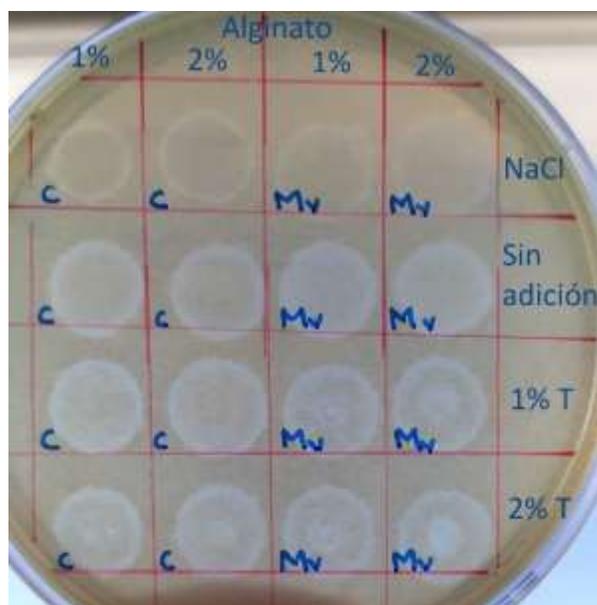


Figura 14. Prueba de superposición de agar suave de las soluciones polímero-vibriófagos. Alginato comercial (C) y alginato de mediana viscosidad (Mv) al 1 y 2% con adición de NaCl al 2.5% (NaCl), sin adiciones de NaCl ni Tween 20 (Sin adición), con 1% Tween 20 (1% T) y con 2% Tween 20 (2% T).

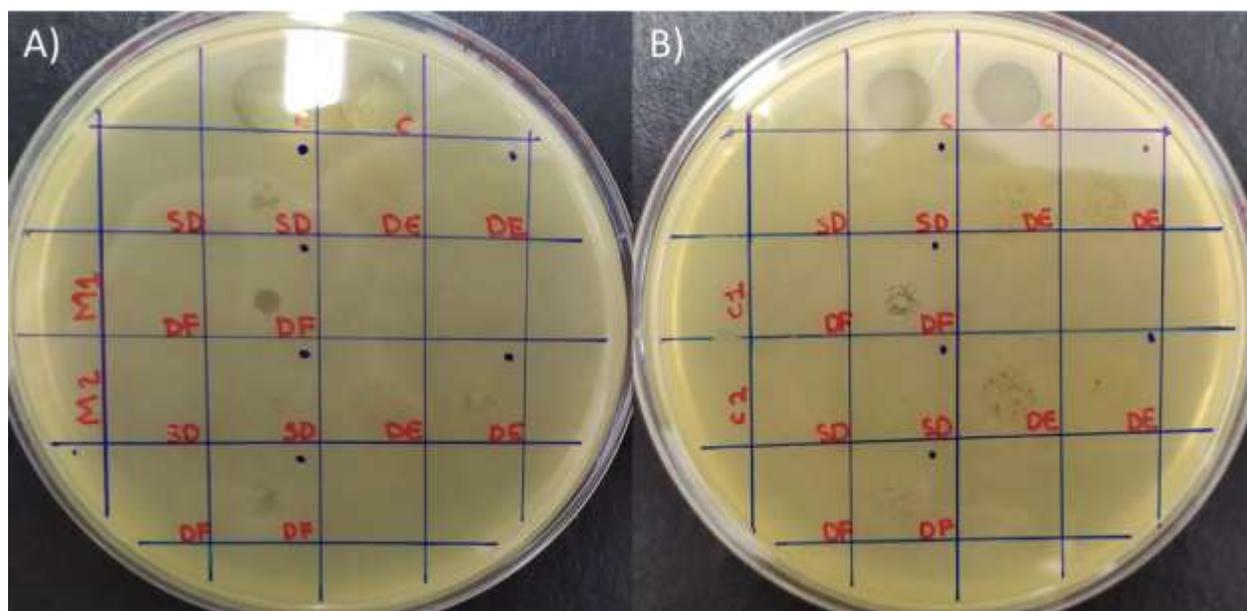


Figura 15. Prueba de superposición de agar suave de encapsulados en alginato de sodio. A) Encapsulados de alginato de sodio de mediana viscosidad al 1% (M1) y 2% (M2). B)

Encapsulados en alginato de sodio comercial. Los encapsulados están digeridos en solución salina 2.5% NaCl (SD), en extracto de hepatopáncreas de camarón (DE) y en solución de ruptura de microesferas (BF). El punto azul indica que los encapsulados se molieron con pistilo y "C" indica el control de fago.

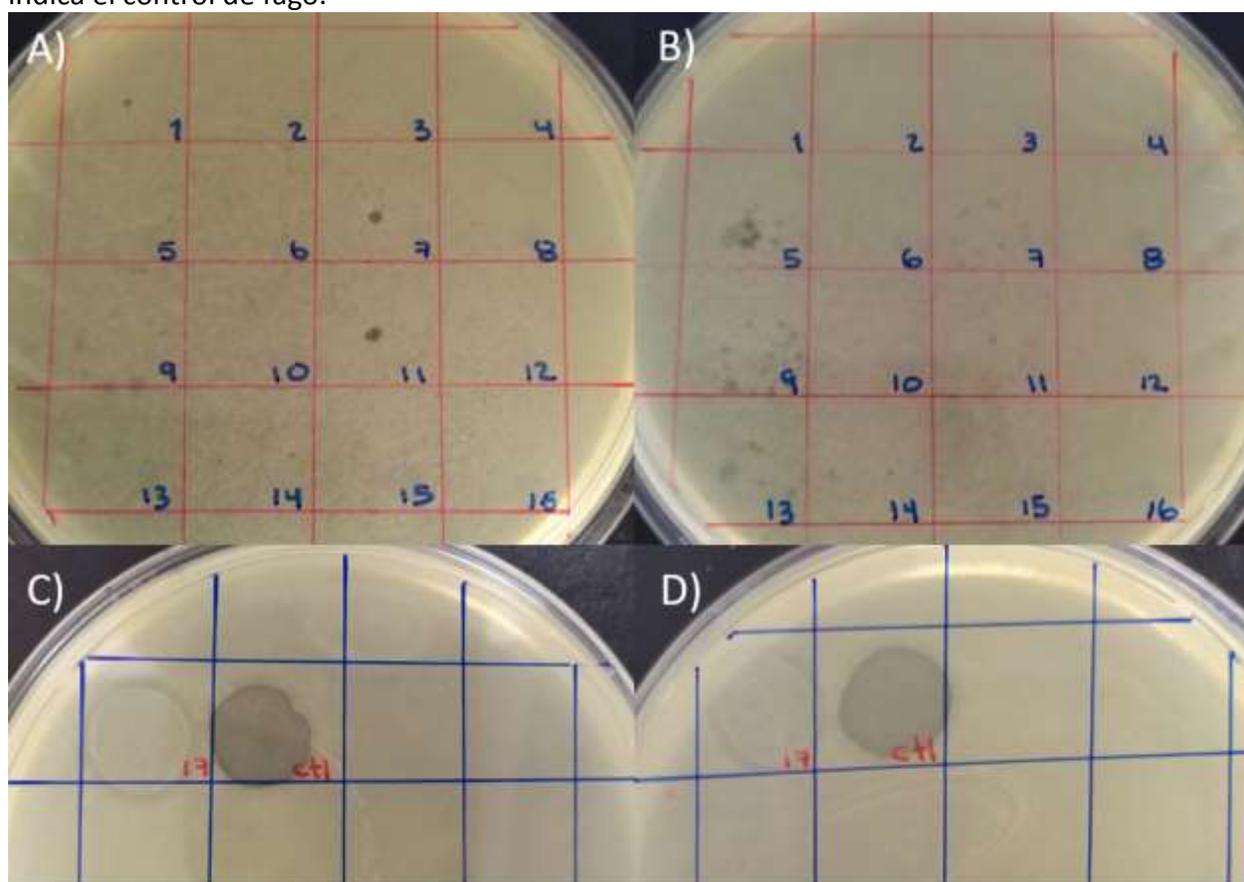


Figura 16. Prueba de superposición de agar suave con encapsulados de alginato de sodio de mediana viscosidad con vibriófago correspondientes a la Tabla 2. A) Encapsulados de 1-16 digeridos con solución salina al 2.5%. B) Encapsulados de 1-16 digeridos con extracto de hepatopáncreas de camarón. C) Encapsulado 17 digerido con solución salina al 2.5% y el control del fago. D) Encapsulado 17 digerido con extracto de hepatopáncreas de camarón y el control de vibriófagos.

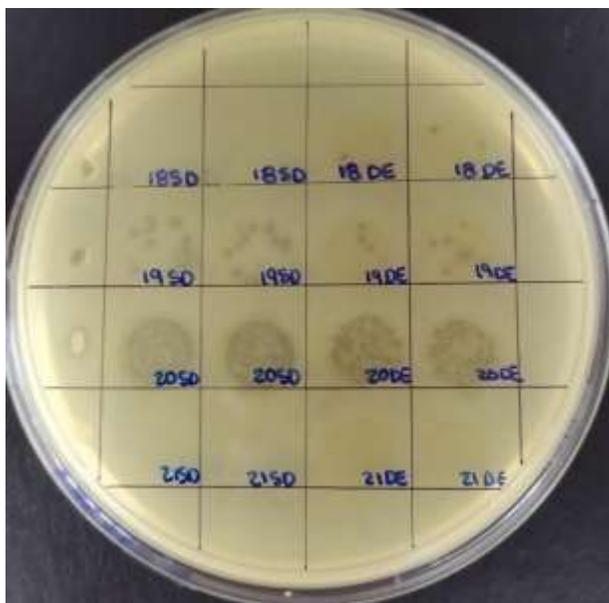


Figura 17. Prueba de superposición de agar suave con los encapsulados 18 a 21 digeridos con solución salina 2.5% NaCl (SD) y extracto de hepatopáncreas de camarón (DE). La primera columna corresponde a los encapsulados sin digestión.

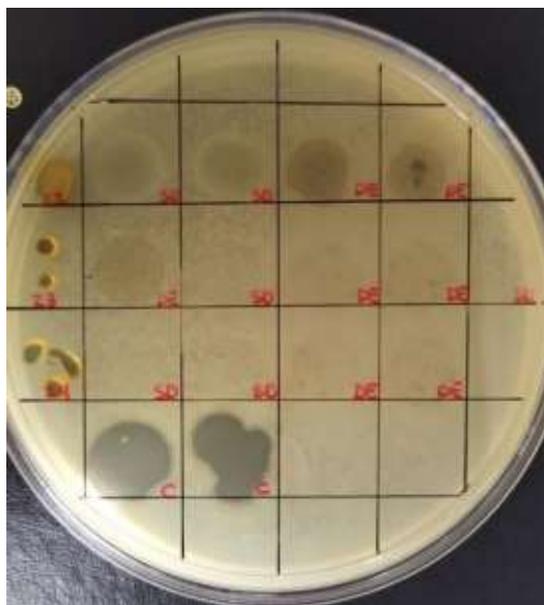


Figura 18. Prueba de superposición de agar suave con los encapsulados 22 a 24 digeridos con solución salina 2.5% NaCl (SD) y extracto de hepatopáncreas de camarón (DE). La primera columna corresponde a los encapsulados sin digestión y C es el control de vibriófagos.

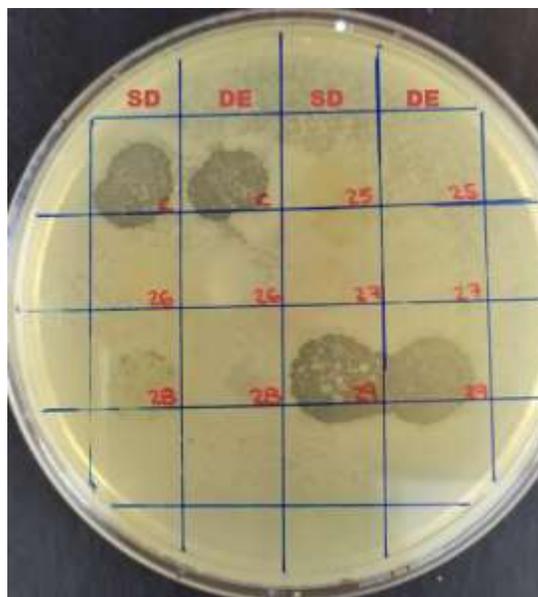


Figura 19. Prueba de superposición de agar suave con los encapsulados de liposomas (25) y liofilizados de alginato (26), pectina (27), carboximetilcelulosa (28) y fago sin polímero (29). "C" corresponde al control de vibriófagos y la digestión de los encapsulados se realizó con extracto de hepatopáncreas de camarón (DE) y solución salina 2.5% NaCl (SD).

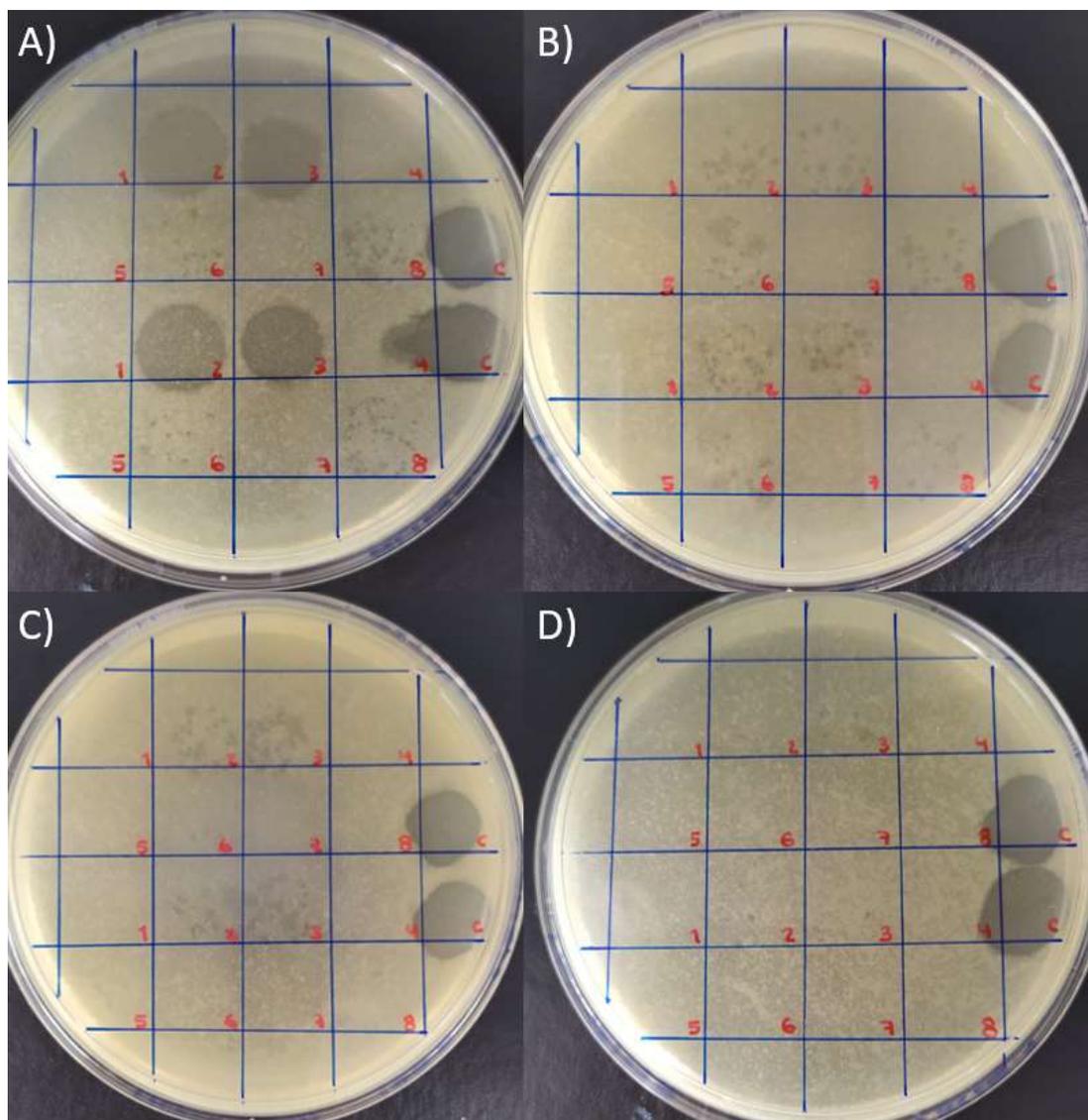


Figura 20. Prueba de superposición de agar suave de los alimentos preparados con vibriófagos encapsulados de acuerdo con la Tabla 6. Los alimentos se hornearon 8 min a A) 80, B) 90, C) 100 y D) 110°C. 1) Control sin fago, 2) Control de fago sin encapsular, 3) encapsulado en alginato, 4) pectina, 5) CMC, 6) liposoma, 7) liofilizado en pectina, 8) liofilizado sin encapsular.

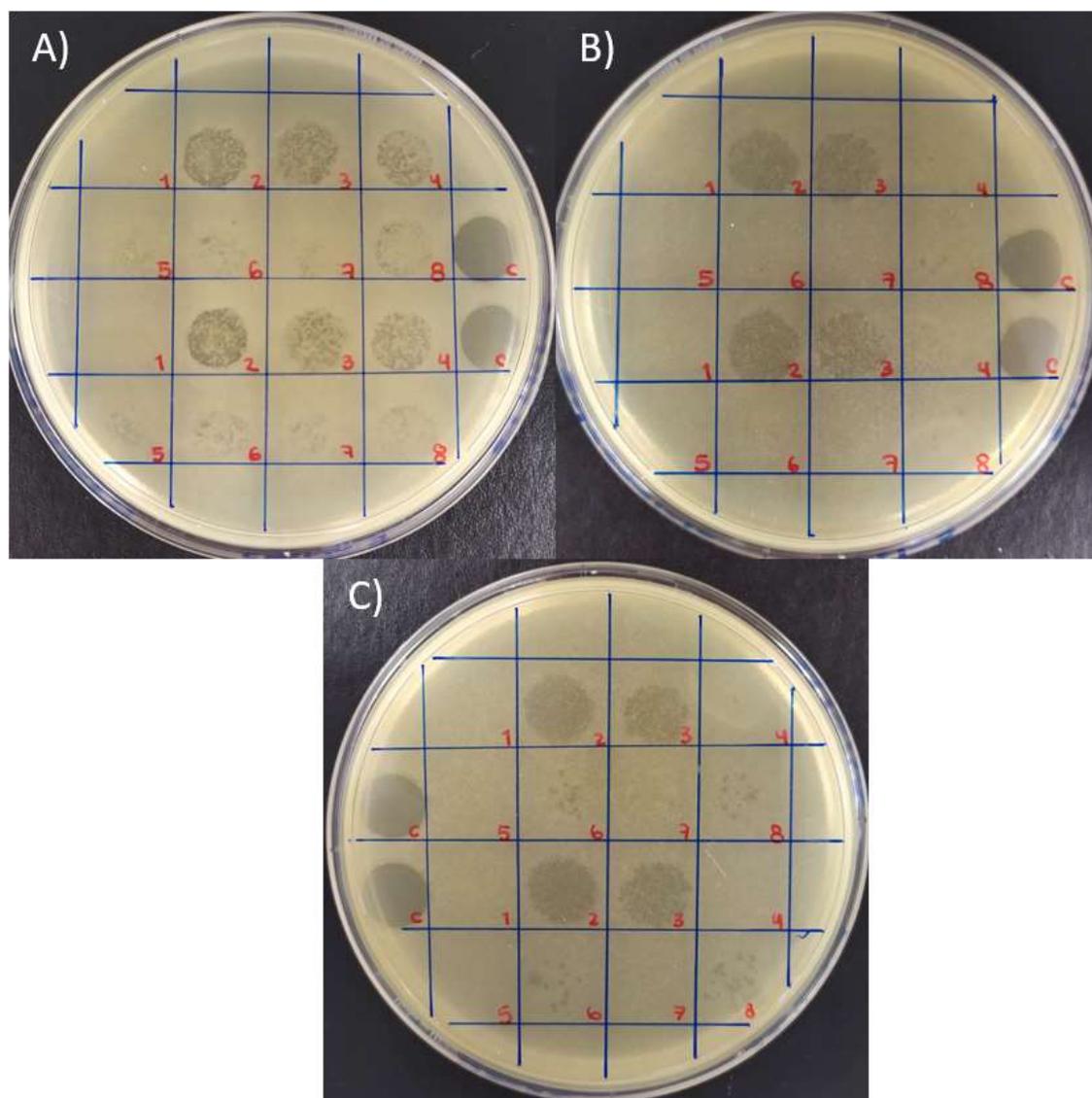


Figura 21. Prueba de superposición de agar suave de la prueba de digestibilidad de los alimentos con encapsulados en camarón. A) Estomago, B) intestinos y C) heces de los camarones en los tratamientos. Los tratamientos son 1) Control sin fago, 2) Control de fago sin encapsular, 3) encapsulado en alginato, 4) pectina, 5) CMC, 6) liposoma, 7) liofilizado en pectina, 8) liofilizado sin encapsular y un control del vibriófago (C).

Anexo 2. Hepatopáncreas diseccionados de los organismos a las 48 h post infección en la terapia pasiva.

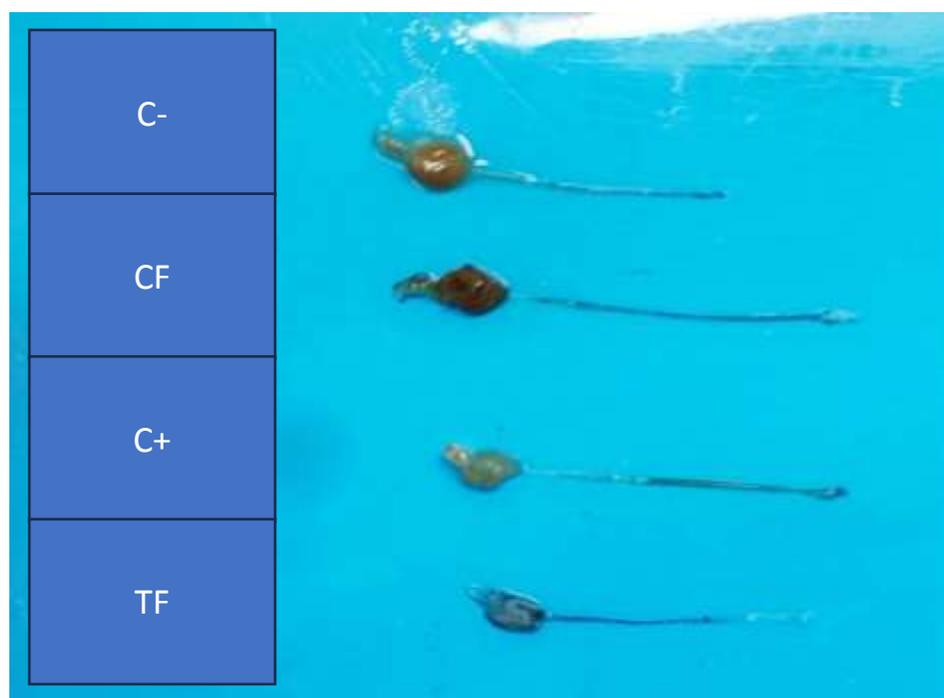


Figura 21. Hepatopáncreas diseccionados de los organismos a las 48 h post infección en la terapia pasiva. Control negativo (C-), control de fagos (CF), control positivo (C+) y terapia de fagos (TF).

Anexo 3. Análisis de supervivencia durante el bioensayo de infección con M0605 (terapia activa) y el alimento experimental.

Tabla 17. Análisis de supervivencia durante el bioensayo de infección con M0605 (terapia activa) y el alimento experimental.

Horas post infección	Mudas	Actividad	Coloración de hepatopáncreas	Alimento consumido
0	0	Todos presentaron actividad normal	Todos los organismos presentaron una coloración normal marrón	Todos los organismos de los tratamientos consumieron el 100% del alimento.
10	0	En el control negativo y control de fagos el 100% de los organismos presentó	En el control negativo y control de fagos el 100% de los organismos presentó una coloración	Todos los organismos en el control negativo consumieron todo

		<p>una actividad normal. En el control positivo se presentó hiperactividad en el 50% de los organismos. En la terapia de fagos se presentó hiperactividad en el 70% de los organismos</p>	<p>normal. En el control positivo aumento la coloración pálida en el 20% de los organismos. En la terapia de fagos <5% de los organismos presentó coloración pálida.</p>	<p>del alimento. En el control positivo se redujo el consumo de alimento (> 60% de los organismos consumió el 100% del alimento). En el control de fagos y la terapia de fagos se mantuvo el consumo de alimento (todos los organismos consumieron el 100% del alimento).</p>
15	<p>2 mudas en el control positivo. 3 mudas en el control de fagos.</p>	<p>En el control negativo aumento la actividad en > 80% de los organismos. En el control positivo aumento la actividad en > 90% de los organismos. En el control de fagos se presentó el aumento de actividad en > 40%. En la terapia de fagos presentó hiperactividad en el 60% de los organismos.</p>	<p>El 100% en el control negativo y el control de fagos presento coloración normal. En el control positivo aumento los organismos con coloración pálida (> 40%). En la terapia de fagos aumento los organismos con coloración pálida (< 5%).</p>	<p>En el control negativo el consumo del alimento se redujo (> 60% de los organismos consumieron el 20% del alimento). En el control positivo se redujo el consumo de alimento (> 30% de los organismos consumieron el 100% del alimento). En el control de fagos el consumo de alimento se redujo (> 80% de los organismos consumieron > 50% del alimento). En la terapia de fagos se redujo el consumo de alimento (> 70% de los organismos consumieron > 90% del alimento).</p>

20	0 mudas	<p>En el control negativo se redujo la actividad (> 70% de los organismos).</p> <p>En el control positivo se redujo la actividad (70% de los organismos).</p> <p>En el control de fagos aumento la actividad (> 90% de los organismos).</p> <p>En la terapia de fagos aumento la actividad (> 70% de los organismos).</p>	<p>El control negativo todos tenían coloración normal.</p> <p>En el control positivo se mantuvo la cantidad de organismos con coloración pálida (> 40%).</p> <p>En el control de fagos aumento los organismos con coloración pálida (< 5%).</p> <p>En la terapia de fagos se mantuvo la cantidad de organismos con coloración pálida (< 5%).</p>	<p>En el control negativo se mantuvo el consumo de alimento (> 60% de los organismos consumió un 20% del alimento).</p> <p>En el control positivo se mantuvo el consumo de alimento (> 30% de los organismos consumieron >90% del alimento).</p> <p>En el control de fagos se mantuvo el consumo de alimento (> 80% del control de fagos consumieron el 55% del alimento).</p> <p>En la terapia de fagos se mantuvo el consumo de alimento (> 70% de los organismos consumieron > 90% del alimento).</p>
35		<p>En el control negativo se redujo la actividad (< 5% de los organismos).</p> <p>En el control positivo se redujo la actividad (>30% de los organismos).</p> <p>En el control de fagos se redujo la actividad (50% de los organismos).</p> <p>En la terapia de fagos se redujo la actividad (>60% de los organismos).</p>	<p>En el control negativo todos los organismos tenían coloración normal.</p> <p>En el control positivo se mantuvo la cantidad de organismos con coloración pálida (> 40%).</p> <p>En el control de fagos aumento la cantidad de organismos con coloración pálida (> 10%).</p> <p>En la terapia de fagos se mantuvo la cantidad de</p>	<p>En el control negativo aumento el consumo de alimento (90% de los organismos consumieron un 80% del alimento).</p> <p>En el control positivo aumento el consumo de alimento (> 90% de los organismos consumieron el 100% del alimento).</p> <p>En el control de fagos aumento el</p>

organismos con coloración pálida (< 5%).

consumo de alimento (> 90% de los organismos consumieron > 70% del alimento). En la terapia de fagos aumento el consumo de alimento (el 100% de los organismos consumió > 90% del alimento).

Anexo 4. Hepatopáncreas diseccionados de los organismos a las 48 h post infección.



Figura 22. Hepatopáncreas diseccionados de los organismos a las 48 h post infección.