

BOLETÍN

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

ISSN 0458-7766

VOLUMEN 34, Número 1



Enero - Junio 2019
Callao, Perú



PERÚ

Ministerio
de la Producción

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS DE AMBIENTE MARINO Y SU EFECTO EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

ISOLATION AND ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM MARINE ENVIRONMENT AND THEIR EFFECT IN THE CONTROL OF BACTERIAL GROWTH

Violeta Flores¹

Carla Fernandez

Marco Medina

RESUMEN

FLORES V, FERNANDEZ C, MEDINA M. 2019. Aislamiento y evaluación de la efectividad de bacteriófagos aislados de ambiente marino y su efecto en el control del crecimiento bacteriano. *Bol Inst Mar Perú*. 34(1): 151-164.- El uso indiscriminado de antibióticos ha propiciado la aparición de bacterias resistentes a los mismos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos tratamientos para controlar poblaciones bacterianas patógenas y mejorar la supervivencia y el crecimiento en organismos acuáticos está tomando importancia en los últimos años. En este marco el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos aparece como una alternativa para el control de enfermedades en acuicultura. En este estudio, los ensayos realizados utilizando nauplios de *Artemia* sp., infectados con *Vibrio fluvialis* Cepa 1, pudo evidenciar una tasa de supervivencia del 90% en comparación al control en el que solo se obtuvo 52%; el empleo del fago al inicio de la infección demostró mayor supervivencia de estos microcrustáceos. En conclusión, el tratamiento con fagos demostró ser eficaz para el control de mortalidades causadas por la bacteria *V. fluvialis* utilizando a *Artemia* sp.

PALABRAS CLAVE: fagoterapia, bacteriófagos, *Vibrio fluvialis*, *Artemia* sp.

ABSTRACT

FLORES V, FERNANDEZ C, MEDINA M. 2019. Isolation and assessment of the effectiveness of bacteriophages isolated from marine environment and their effect in the control of bacterial growth. *Bol Inst Mar Peru*. 34(1): 151-164.- The indiscriminate use of antibiotics has led to the emergence of antibiotic-resistant bacteria. Therefore, the search for new treatments to control pathogenic bacterial populations and improve the survival and growth of aquatic organisms is gaining importance in recent years. Under these circumstances, the use of bacteriophages as therapeutic agents appears as an alternative for the control of diseases in aquaculture. In this survey, tests carried out using *Artemia* sp. nauplii, which were infected with *Vibrio fluvialis* Strain 1, showed a 90% survival rate compared to the control in which only 52% was obtained; the use of phage at the beginning of the infection showed a greater survival among these microcrustaceans. Finally, the treatment with phage proved to be effective for the control of mortalities caused by the bacterium *V. fluvialis* using *Artemia* sp.

KEYWORDS: phagotherapy, bacteriophage, *Vibrio fluvialis*, *Artemia* sp.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos en cultivo sufren la amenaza constante de las infecciones bacterianas, siendo frecuente el uso generalizado y sin restricciones de antimicrobianos para la curación o prevención de las mismas (DOPAZO et al. 1988, CABELLO 2006). El empleo indiscriminado de antibióticos ha conllevado al incremento de las bacterias resistentes a estos quimioterápicos, por lo que su empleo en la acuicultura ha sido restringido (FAO/OIE/WHO 2006) por los daños ecológicos y su impacto en la salud humana. En consecuencia, urge la necesidad de buscar otras estrategias para el control de enfermedades en acuicultura.

1. INTRODUCTION

Aquatic organisms in culture suffer the constant threat of bacterial infections and it is frequent the widespread and unrestricted use of antimicrobials to cure or prevent them (DOPAZO et al. 1988, CABELLO 2006). The indiscriminate use of antibiotics has led to an increase in bacteria resistant to these chemotherapeutics, so their use in aquaculture has been restricted (FAO/OIE/WHO 2006) due to ecological damage and its impact on human health. Consequently, there is an urgent need to seek other strategies for disease control in aquaculture.

1 IMARPE, Área funcional de Investigaciones en Acuicultura, vflores@imarpe.gob.pe

Durante los últimos años, la terapia con bacteriófagos o fagoterapia, se está explorando como una vía alterna para el control de bacterias patógenas en organismos marinos (ALMEIDA *et al.* 2009, RONDA *et al.* 2003). Estos bacteriófagos son virus naturales que infectan y lisan bacterias de manera especie-específica sin afectar la microflora normal (SEGUNDO *et al.* 2010). Esta especificidad entre bacteriófagos y sus huéspedes bacterianos, ha sido utilizada para el tratamiento de enfermedades infecciosas en acuicultura, tal es el caso de PATERSON *et al.* (1969) quienes aplicaron bacteriófagos contra *Aeromonas salmonicida* causante de la furunculosis, cuya publicación constituye el inicio de la investigación sobre la aplicación de estos virus en acuicultura. La literatura reporta además otros casos exitosos de fagoterapia contra *A. hydrophila* (WU *et al.* 1981), *Pseudomonas plecoglossicida* (PARK *et al.* 2000), *Edwardsiella tarda* (HSU *et al.* 2000), *Flavobacterium psychrophilum* (STENHOLM *et al.* 2008) y *E. ictaluri* (WALAKIRA 2008).

En el Instituto del Mar del Perú (IMARPE), se vienen realizando investigaciones sobre el uso de métodos alternativos a los antibióticos para el control y prevención de enfermedades en organismos acuáticos priorizados para la investigación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue separar y evaluar la efectividad de bacteriófagos aislados del ambiente marino en el control del crecimiento bacteriano en infecciones experimentales con nauplios de *Artemia* sp. bajo condiciones de laboratorio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de cepas bacterianas

Para el aislamiento de bacterias se utilizó, como medio de cultivo selectivo e indicador, el Agar GSP (Agar selectivo para *Pseudomonas-Aeromonas* seg. Kielwein, Merck) y TCBS (Tiosulfato citrato bilis sacarosa, Merck). Se aislaron cepas bacterianas en base a su morfología colonial, color, prueba de oxidasa y coloración Gram, a partir de muestras de agua de mar. La cepa aislada se denominó Cepa 1. La identificación se realizó por pruebas bioquímicas convencionales, el empleo del sistema de identificación bioquímica rápida API 20 NE y pruebas moleculares realizadas por el Laboratorio de Genética del IMARPE.

In recent years, bacteriophage therapy, or phagotherapy, is being explored as an alternative pathway for the control of pathogenic bacteria in marine organisms (ALMEIDA *et al.* 2009, RONDA *et al.* 2003). These bacteriophages are natural viruses that infect and lyse bacteria in a species-specific manner without affecting the normal microflora (SEGUNDO *et al.* 2010). This specificity between bacteriophages and their bacterial hosts has been used for the treatment of infectious diseases in aquaculture, such is the case of PATERSON *et al.* (1969) who applied bacteriophages against *Aeromonas salmonicida* causative of furunculosis, whose publication constitutes the beginning of the research on the application of these viruses in aquaculture. Several other successful cases of phagotherapy against *A. hydrophila* (WU *et al.* 1981), *Pseudomonas plecoglossicida* (PARK *et al.* 2000), *Edwardsiella tarda* (HSU *et al.* 2000), *Flavobacterium psychrophilum* (STENHOLM *et al.* 2008), and *E. ictaluri* (WALAKIRA 2008) are reported in the literature.

Research on the use of alternative methods to antibiotics for disease control and prevention in aquatic organisms prioritized for research is being carried out at the Instituto del Mar del Perú - IMARPE (Alternative: Peruvian Marine Research Institute). Therefore, the objective of this study was to separate and assess the effectiveness of bacteriophages isolated from the marine environment in controlling bacterial growth in experimental infections with *Artemia* sp. nauplii under laboratory conditions.

2. MATERIAL AND METHODS

Isolation of bacterial strains

GSP Agar (Selective Agar for *Pseudomonas-Aeromonas* seg. Kielwein, Merck) and TCBS (Thiosulphate citrate bile sucrose, Merck) were used as selective and indicator culture medium for the isolation of bacteria. Bacterial strains were isolated based on colonial morphology, color, oxidase test, and Gram staining from seawater samples. The isolated strain was called Strain 1. The identification was carried out by conventional biochemical tests, the use of the API 20E/NE fast identification system and molecular tests carried out by the IMARPE's Genetics Laboratory.

Aislamiento y purificación de bacteriófagos

Una vez identificadas las cepas bacterianas, se procedió a realizar el aislamiento de los bacteriófagos siguiendo la metodología utilizada por PHUMKHACHORN & RATTANACHAIKUNSOPON (2010) con modificaciones. Muestras de agua de mar filtrada (0,22 μm PES Syringe Filter MS®) fueron mezcladas con 50 mL de caldo Tripticasa de Soya (TSB, Merck), 1% de NaCl y CaCl_2 (20 mM) e inoculado con 1 mL de la Cepa 1 de 18 horas de incubación. Esta mezcla fue incubada por 24 horas a 25 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla fue centrifugada a 3300 g por 20 minutos (Centrifuge Eppendorf 5702R®) y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,22 μm de porosidad (Merck Millipore®, Alemania).

La presencia de fagos en el sobrenadante filtrado fue verificado por la técnica del *spot test* (HYMAN & ABEDON 2010). En placas de petri conteniendo agar Tripticasa de soya (TSA, Merck) suplementado con 1% de NaCl y CaCl_2 (20 mM), se sembraron por diseminación 500 μL de la Cepa 1. Posteriormente, se adicionó 100 μL del sobrenadante filtrado y las placas se incubaron a 25 °C durante 24 horas.

Una vez corroborada la presencia de bacteriófagos por medio de la técnica del *spot test*, se realizó la purificación de los bacteriófagos mediante la técnica de doble capa (BRADLEY 1965) modificada. Se realizaron diluciones seriadas de los bacteriófagos en tubos de ensayo previamente inoculados con 1 mL de la cepa susceptible. A cada tubo, se le adicionó 3 mL de agar semisólido (TSA) al 70% y a 45 °C. Esta mezcla se vertió sobre placas petri conteniendo una capa de TSA (100%) y se incubó a 25 °C por 24 horas. Posteriormente las placas de lisis fueron cuantificadas para hallar el número de UFP/mL.

Las placas de lisis producidas por el enfrentamiento de los fagos y su bacteria huésped fueron recortadas con ayuda de un asa de siembra con aro de nicrom en ángulo recto, trasladadas y depositadas en un microtubo de 2 mL conteniendo PBS estéril. Luego se agregaron 2 a 3 gotas de cloroformo y se agitó en un Vortex por 1 minuto para provocar la muerte bacteriana. Los microtubos fueron centrifugados a 3300 x g por 15 minutos para precipitar los

Isolation and purification of bacteriophages

Once the bacterial strains had been identified, the bacteriophages were isolated following the methodology used by PHUMKHACHORN & RATTANACHAIKUNSOPON (2010) with modifications. Filtered seawater samples (0.22 μm PES Syringe Filter MS®) were mixed with 50 mL of Trypticase Soy Broth (TSB, Merck), 1% of NaCl, and CaCl_2 (20 mM) and they were inoculated with 1 mL of strain 1 of 18 hours of incubation. This mixture was incubated for 24 hours at 25 °C. After the incubation time, the mixture was centrifuged at 3300 g for 20 minutes (Centrifuge Eppendorf 5702R®) and the supernatant was filtered through a filter of 0.22 μm porosity (Merck Millipore®, Germany).

The presence of phage in the filtered supernatant was verified through the spot test technique (HYMAN & ABEDON 2010). In Petri dishes containing Trypticase Soy Agar (TSA, Merck) supplemented with 1% NaCl and CaCl_2 (20 mM), 500 μL of strain 1 were seeded by dissemination. Subsequently, 100 μL of the filtered supernatant were added and the Petri dishes were incubated at 25 °C for 24 hours.

After the presence of bacteriophages was corroborated through the spot test technique, the bacteriophages were purified using the modified double layer technique (BRADLEY 1965). Serial dilutions of the bacteriophages were made in test tubes which were previously inoculated with 1 mL of the susceptible strain. In each test tube, 3 mL of semi-solid agar (TSA) was added at 70% and 45 °C. This mixture was poured on Petri dishes containing a layer of TSA (100%) and incubated at 25 °C for 24 hours. Subsequently, the lysis dishes were quantified to find the number of UFP/mL.

The lysis dishes, produced by the confrontation of the phages and their host bacteria, were cut with the help of an inoculation loop with a right-angled nichrome ring, transferred and deposited in a 2 mL microtube containing sterile PBS solution. Then, 2 to 3 drops of chloroform were added and they were agitated in a Vortex for 1 minute to cause bacterial death. The microtubes were centrifuged at 3300 x g for 15 minutes to precipitate the

restos bacterianos y recuperar el sobrenadante (conteniendo los bacteriófagos), el cual pasó a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm de porosidad para ser vertidos en un microtubo estéril. Este procedimiento se repitió tres veces para garantizar la pureza de los bacteriófagos específicos a la Cepa 1.

Determinación de rangos de hospederos de los bacteriófagos aislados

Siguiendo la metodología utilizada por PHUMKHACHORN & RATTANACHAIKUNSOPON (2010) con modificaciones y con la finalidad de determinar la especificidad de infección del fago 1 frente a otras bacterias tipo ATCC®, se realizó la determinación del rango de hospederos mediante el método del *spot test*. Cien microlitros del filtrado fágico se gotearon sobre placas Petri conteniendo 3 mL de agar TSA semisólido al 70% con 0,2 mL del cultivo bacteriano en fase exponencial (este procedimiento se repitió para cada cepa reto) posteriormente se incubó a 25 °C por 24 horas.

Aplicación de bacteriófagos como agentes terapéuticos contra la Cepa 1 utilizando *Artemia* sp.

Descapsulación y obtención de *Artemia* sp. libre de contaminación bacteriana

Siguiendo la metodología utilizada por MARTÍNEZ & HIPOLITO (2013) con modificaciones, 1 g de quistes de *Artemia* sp. (INVE Aquaculture, EUA) fue hidratado en agua destilada estéril por una hora con aireación continua. Cumplido el tiempo, los quistes hidratados fueron colocados en una solución de Hipoclorito de sodio comercial con agua de mar estéril en proporción de 2: 1 y con ayuda de una varilla de vidrio estéril, se agitó por 30 segundos hasta que se observó un cambio en la tonalidad de los quistes de café a anaranjado (indicativo de la eliminación del corion). A continuación, los quistes fueron tamizados y sumergidos en una solución de Tiosulfato de Sodio 0,5% en agua de mar estéril para eliminar el cloro y posteriormente fueron desinfectados en agua de mar con Cloruro de benzalconio 1% por 15 segundos. Este procedimiento fue repetido 3 veces. Una vez realizada la descapsulación, los quistes fueron transferidos a un matraz de 500 mL de capacidad conteniendo 400 mL de agua de mar estéril y mantenidos a 28 °C bajo iluminación continua y aireación filtrada (0,22 μm) por 19 horas.

bacterial remains and recover the supernatant (containing the bacteriophages), which passed through a syringe filter with a 0.22 μm pore size to be poured into a sterile microtube. This procedure was repeated three times to guarantee the purity of the bacteriophages that were specific to strain 1.

Determination of host ranges of isolated bacteriophages

Based on the methodology used by PHUMKHACHORN & RATTANACHAIKUNSOPON (2010) with modifications and in order to determine the specificity of phage 1 infection against other ATCC® type bacteria, the host range was determined using the spot test method. One hundred microliters of phage filtrate were dripped on Petri dishes containing 3 mL of semi-solid agar TSA at 70% with 0.2 mL of the bacterial culture in exponential phase (this procedure was repeated for each challenge strain) then they were incubated at 25 °C for 24 hours.

Use of bacteriophages as therapeutic agents against strain 1 by using *Artemia* sp.

Decapsulation and obtaining of *Artemia* sp. free of bacterial contamination

By applying the methodology used by MARTÍNEZ & HIPOLITO (2013) with modifications, 1 g of *Artemia* sp. cysts (INVE Aquaculture, USA) was hydrated in sterile distilled water for one hour with continuous aeration. After that time, the hydrated cysts were placed in a commercial sodium hypochlorite solution with sterile seawater in a ratio of 2:1 and with the help of a sterile glass rod, it was agitated for 30 seconds until a change in the tonality of the cysts was observed from coffee to orange (which indicates the removal of chorion). The cysts were then sieved and immersed in a solution of 0.5% Sodium Thiosulphate in sterile seawater to remove chlorine and they were subsequently disinfected in seawater with 1% Benzalkonium chloride for 15 seconds. This procedure was repeated 3 times. After decapsulation, the cysts were transferred to a 500 mL capacity flask containing 400 mL of sterile seawater and kept at 28 °C under continuous illumination and filtered aeration (0.22 μm) for 19 hours.

Después de la eclosión, los nauplios de *Artemia* sp. fueron cosechados en condiciones asépticas y se transfirieron a vasos de precipitación de 200 mL de capacidad, conteniendo 100 mL de agua de mar estéril a una densidad de 100 nauplios por vaso de precipitación (cada vaso de precipitación con 100 nauplios será referido en adelante, como Unidad Experimental). Para confirmar si el cultivo de nauplios se encontraba libre de bacterias, se realizaron siembras en placas petri conteniendo agar marino.

Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀)

Para determinar la DL₅₀, los nauplios tratados, fueron infectados con diferentes dosis de un cultivo de 18 horas de la Cepa 1, ajustado a una DO₆₀₀=1 (MARTÍNEZ 2013, con modificaciones). Unidades experimentales por duplicado fueron inoculadas con 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 µL de suspensión bacteriana y dos unidades experimentales no inoculadas fueron tomadas como control. Las unidades experimentales fueron incubadas a 28 °C por 24 horas. La supervivencia de *Artemia* sp. fue cuantificada a las 48 horas post infección. Este experimento, fue realizado con tres replicas para evaluar con precisión la dosis que causa el 50% de mortalidad de nauplios de *Artemia* sp. La DL₅₀ fue estimada utilizando análisis probit.

Una vez determinada la dosis letal, se determinó la cinética de muerte durante la infección con la Cepa 1, por lo que cada unidad experimental de nauplios fue inoculada con una sola dosis bacteriana (DL₅₀) y la tasa de mortalidad fue registrada a las 0, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas.

Ensayos de fagoterapia

Siguiendo la metodología empleada por LOMELI (2011) con modificaciones, se realizaron dos ensayos: el primero para evaluar el efecto de la dosis del bacteriófago a emplear y, el segundo para evaluar el efecto del tiempo de aplicación post infección en la supervivencia de nauplios de *Artemia* sp. tal como se detalla a continuación:

Ensayo 1: efecto de la dosis del bacteriófago en el crecimiento de la Cepa 1 y supervivencia de nauplios de *Artemia* sp. Dos dosis de bacteriófagos fueron evaluadas: dosis de 100 µL y de 10 µL; para esto, nauplios de *Artemia* sp. fueron

After bloom, the *Artemia* sp. nauplii were harvested under aseptic conditions and transferred to precipitation vessels of 200 mL capacity, containing 100 mL of sterile seawater at a density of 100 nauplii per precipitation vessel (each precipitation vessel with 100 nauplii will henceforth be referred to as an Experimental Unit). To confirm if the nauplii culture was free of bacteria, inoculations were made in Petri dishes containing marine agar.

Determination of Lethal Dose 50 (LD₅₀)

To determine LD₅₀, the sterilized nauplii were infected with different doses from an 18-hour culture of Strain 1, adjusted to an OD₆₀₀=1 (MARTÍNEZ 2013, with modifications). Experimental units in duplicate were inoculated with 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 µL of bacterial suspension and two non-inoculated experimental units were taken as control. The experimental units were incubated at 28 °C for 24 hours. The survival of *Artemia* sp. was quantified 48 hours after infection. This experiment was performed with three replicates to accurately assess the dose causing 50% mortality of *Artemia* sp. The LD₅₀ was estimated using probit analysis.

Once the lethal dose was determined, the kinetics of death during infection with Strain 1 were determined, so that each experimental unit of nauplii was inoculated with a single bacterial dose (DL₅₀) and the mortality rate was recorded at 0, 8, 16, 24, 32, 40, and 48 hours.

Phagotherapy tests

Two tests were carried out following the methodology used by LOMELI (2011) with modifications: the first to assess the effect of the dose of the bacteriophage to be used and the second to assess the effect of the post-infection application time on the survival of *Artemia* sp. nauplii as detailed below:

Test 1: effect of the bacteriophage dose on the growth of Strain 1 and survival of *Artemia* sp. nauplii. Two doses of bacteriophages were assessed: doses of 100 µL and 10 µL; thus, *Artemia* sp. nauplii were infected with the

infectados con la DL_{50} bacteriana (Cepa 1) a una densidad óptica ($DO_{600} = 1$) y se adicionaron los bacteriófagos al inicio de la infección.

Ensayo 2: efecto de la aplicación de bacteriófagos en diferentes tiempos de post infección. Nauplios de *Artemia* sp., fueron infectados con la DL_{50} bacteriana a una $DO_{600} = 1$ y se adicionó 100 μ L de bacteriófago a las 13 horas (Tratamiento 1) y a las 16 horas (Tratamiento 2) post infección bacteriana.

En ambos ensayos se consideró un grupo control solamente infectado con la DL_{50} bacteriana y todas las unidades experimentales se incubaron a 25 °C por quintuplicado. La mortalidad fue registrada a las 48 horas.

3. RESULTADOS

Aislamiento de cepas bacterianas

Las bacterias aisladas fueron identificadas presuntivamente por bioquímica convencional y el sistema de identificación bioquímica rápida API 20 NE como *Aeromonas* sp./*Vibrio* sp.; sin embargo, el análisis molecular confirmó a la Cepa 1 dentro del género *Vibrio* y especie *V. fluvialis* (en adelante Cepa 1 *Vibrio fluvialis*).

Aislamiento y purificación de bacteriófagos

Las placas presentaron zonas de aclaramiento para la Cepa 1 *V. fluvialis* confirmando la presencia de bacteriófagos líticos (Fig. 1). Además, los bacteriófagos propiciaron la aparición de placas de lisis confirmando la especificidad para infectar su bacteria huésped.

El título del sobrenadante filtrado, se encontró en $8,2 \times 10^9$ UFP/mL para el fago específico a la Cepa 1 *V. fluvialis* (en adelante bacteriófago Vf1), los que fueron capaces de exterminar totalmente a la cepa susceptible.

Determinación de rangos de hospederos para el bacteriófago 1

Las cepas bacterianas no fueron susceptibles al bacteriófago Vf1, a excepción de la Cepa *V. alginolyticus* ATCC® 17749, en cuyas placas se observaron ligeras zonas de aclaramiento (Tabla 1, Fig. 2).

bacterial LD_{50} (Strain 1) at an optical density ($OD_{600} = 1$) and the bacteriophages were added at the beginning of the infection.

Test 2: Effect of the application of bacteriophages at different post-infection times. *Artemia* sp. nauplii were infected with the bacterial LD_{50} to an $OD_{600} = 1$ and 100 μ L of bacteriophage were added at 13 hours (Treatment 1) and at 16 hours (Treatment 2) post bacterial infection.

In both tests, only one control group infected with bacterial LD_{50} was considered and all experimental units were incubated at 25 °C per quintuplicate. Mortality was recorded at 48 hours.

3. RESULTS

Isolation of bacterial strains

The isolated bacteria were presumably identified by conventional biochemistry and the API 20E/NE fast identification system as *Aeromonas* sp./*Vibrio* sp.; however, molecular analysis confirmed Strain 1 within the genus *Vibrio* and species *V. fluvialis* (hereinafter *Vibrio fluvialis* Strain 1).

Isolation and purification of bacteriophages

There were clearing-zones for *V. fluvialis* Strain 1 in dishes, confirming the presence of lithic bacteriophages (Fig. 1). In addition, the bacteriophages propitiated the appearance of lysis dishes confirming the specificity to infect their host bacterium.

The titer of the filtered supernatant was found in 8.2×10^9 UFP/mL for the phage specific to *V. fluvialis* Strain 1 (hereinafter Vf1 bacteriophage), which were able to totally exterminate the susceptible strain.

Determination of host ranges for bacteriophage 1

The bacterial strains were not susceptible to the Vf1 bacteriophage, except for the *V. alginolyticus* Strain ATCC® 17749, in whose dishes light clearing zones were observed (Table 1, Fig. 2).

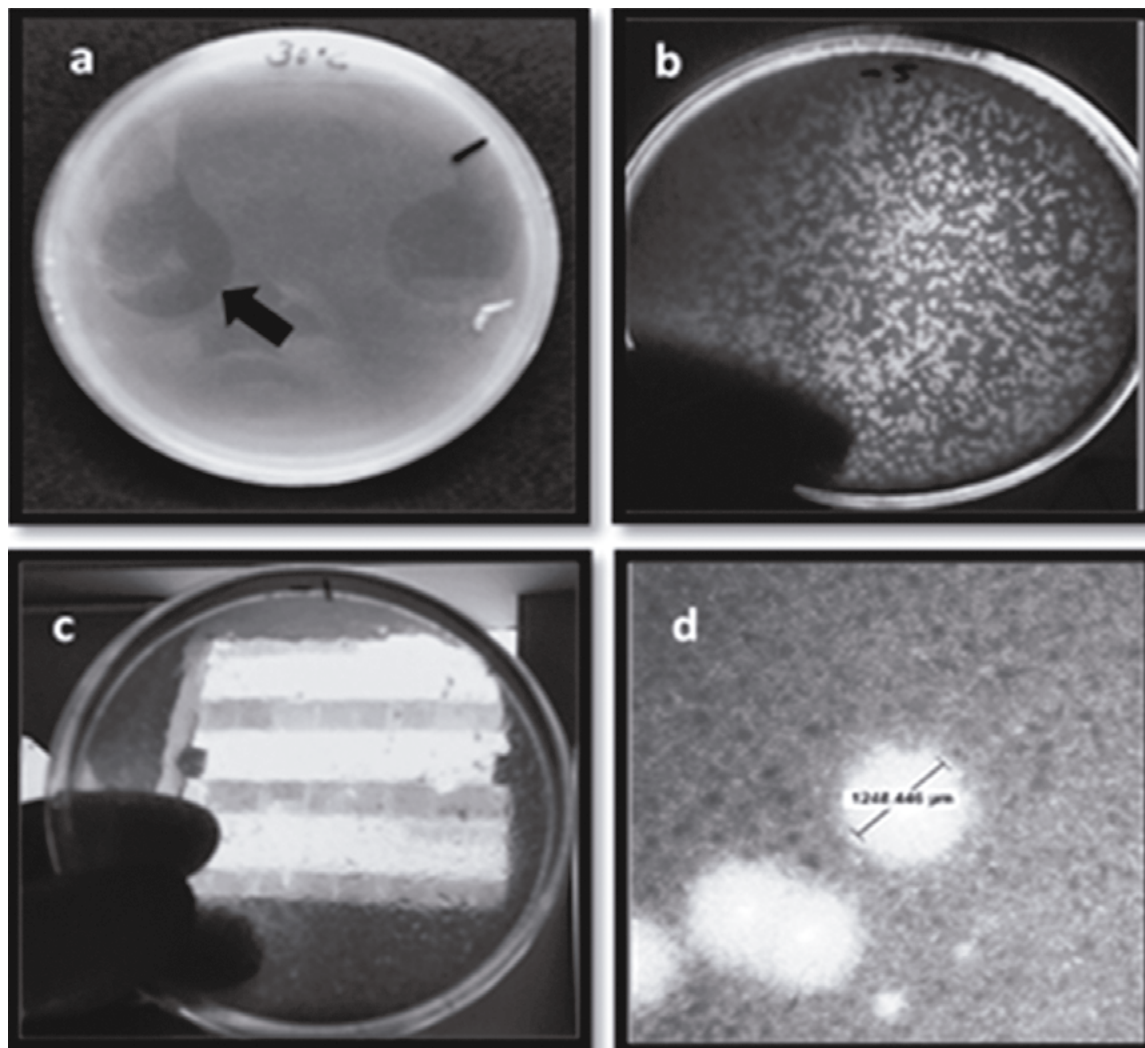


Figura 1.- a) *Spot test*, prueba preliminar confirmatoria de presencia de bacteriófagos específicos para la Cepa 1 *V. fluvialis*. Se observan zonas claras (flecha) las cuales son evidencia preliminar de la presencia de bacteriófagos. b) Placas de lisis indicadoras del título del bacteriófago 1. c) Placa Petri totalmente transparente como consecuencia de la lisis bacteriana causada por bacteriófagos específicos contra la cepa bacteriana en estudio. d) Placas de lisis formadas por el bacteriófago 1 sobre placas con agar inoculados con la Cepa 1 *V. fluvialis* observadas al estereoscopio 0,75X

Figure 1. a) *Spot test*, preliminary confirmatory test for the presence of bacteriophages specific to *V. fluvialis* Strain 1. Clear zones (arrow) are observed, which are a preliminary evidence of the presence of bacteriophages. b) Indicator lysis dishes for bacteriophage 1 titer. c) Completely transparent Petri dish as a consequence of bacterial lysis caused by specific bacteriophages against the bacterial strain under study. d) Lysis dishes formed by bacteriophage 1 on agar plates inoculated with *V. fluvialis* Strain 1 observed under stereoscope at 0.75X

Tabla 1.- Rango de hospederos de los Bacteriófagos 1 mediante spot test

Table 1. Host range of Bacteriophages 1 by means of spot test

| Bacterias / Bacteria | Bacteriófagos / Bacteriophages |
|-------------------------|--------------------------------|
| <i>A. hydrophila</i> | - |
| <i>A. salmonicida</i> | - |
| <i>V. alginolyticus</i> | +/- |
| <i>P. fluorescens</i> | - |
| <i>P. putida</i> | - |
| <i>E. tarda</i> | - |

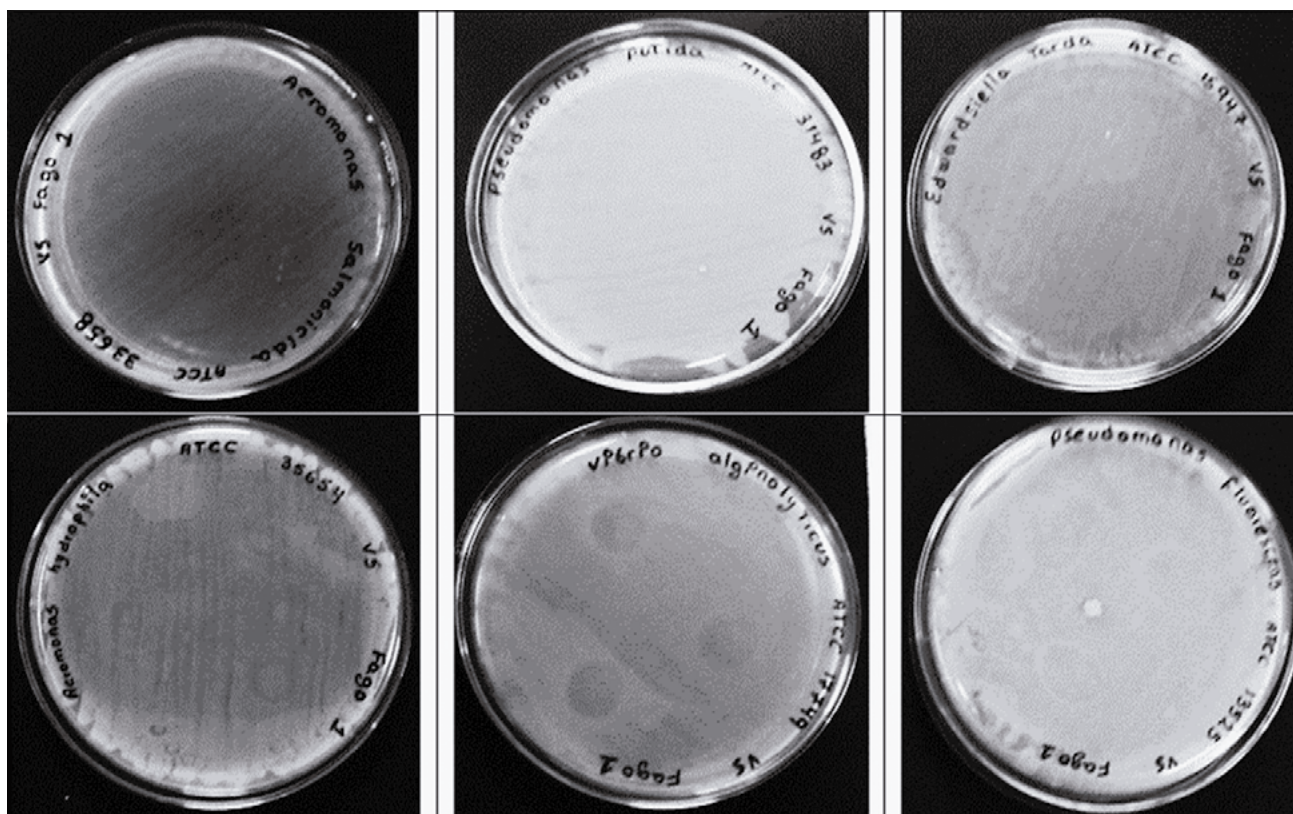


Figura 2.- Rango de hospederos: enfrentamiento bacteriófago 1 contra 6 especies bacterianas diferentes. Se aprecian las áreas claras indicando reacción positiva del bacteriófago1 con *V. alginolyticus* ATCC © 17749

Figure 2. Host range: bacteriophage 1 confrontation against 6 different bacterial species. Clear areas indicating positive reaction of bacteriophage1 with *V. alginolyticus* ATCC © 17749 can be seen

Descapsulación y obtención de *Artemia* sp. libre de contaminación bacteriana

Se evidenció la reducción de la carga bacteriana de nauplios tratados con Cloruro de benzalconio al 1% a diferencia de los nauplios que no fueron tratados con la solución desinfectante. Los nauplios tratados y diseminados en placas petri por duplicado conteniendo agar marino, evidenciaron el crecimiento promedio de 3 a 5 colonias en las placas petri sembradas; en comparación con los

Decapsulation and obtaining of *Artemia* sp. free of bacterial contamination

The bacterial load of nauplii treated with benzalkonium chloride was reduced to 1% as opposed to nauplii that were not treated with the disinfectant solution. The nauplii treated and disseminated in Petri dishes in duplicate containing marine agar, evidenced the average growth of 3 to 5 colonies in the inoculated Petri dishes; in comparison with those that were not

que no fueron desinfectados, los que evidenciaron crecimiento bacteriano abundante (incontables, >300 UFC.mL⁻¹) demostrando así la efectividad de la solución desinfectante y corroborando la disminución significativa de las UFC.mL⁻¹.

Aplicación de bacteriófagos como agentes terapéuticos utilizando *Artemia* sp.

Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀)

La dosis de la Cepa 1 *V. fluvialis* que indujo el 50% de mortalidad en nauplios de *Artemia* sp. (DL₅₀) fue estimada en 8×10^8 UFC.mL (800 µL de suspensión bacteriana DO600= 1) (Fig. 3).

Se observa que la cinética de mortalidad de los nauplios enfrentados con la DL₅₀, la cual aumenta a medida que el tiempo transcurre, alcanza la mortalidad esperada a las 48 horas post infección (Fig. 4). En el transcurso del tiempo se observaron organismos letárgicos con poco o nada de movimiento los cuales, posteriormente, morían.

Ensayos de fagoterapia

En el ensayo 1, la aplicación del bacteriófago Vf1 redujo la mortalidad de los nauplios de *Artemia* sp., infectados experimentalmente con la Cepa 1 *V. fluvialis*. La dosis de 100 µL de bacteriófagos

disinfectados, those that evidenced abundant bacterial growth (countless, >300 UFC.mL⁻¹) thus demonstrating the effectiveness of the disinfectant solution and corroborating the significant decrease of the UFC.mL⁻¹.

Use of bacteriophages as therapeutic agents by means of *Artemia* sp.

Determination of Lethal Dose 50 (DL₅₀)

The dose of *V. fluvialis* Strain 1 that induced 50% mortality in *Artemia* sp. nauplii (LD₅₀) was estimated at 8×10^8 UFC.mL (800 µL of bacterial suspension OD 600= 1) (Fig. 3).

It is observed that the nauplii mortality kinetics confronted with LD₅₀, which increases with time, reaches the expected mortality of 48 hours post-infection (Fig. 4). Over time, lethargic organisms with little or no movement were observed, which later died.

Phagotherapy tests

In test 1, the application of Vf1 bacteriophage reduced the *Artemia* sp. nauplii's mortality, which were experimentally infected with *V. fluvialis* Strain 1. The dose of 100 µL of bacteriophages in solution significantly

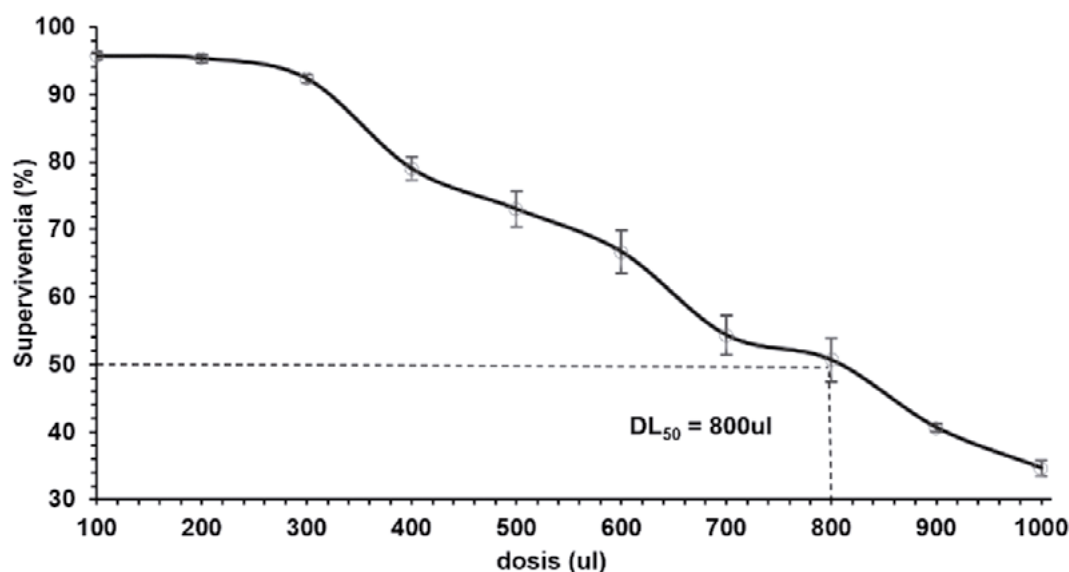


Figura 3.- Efecto de la dosis bacteriana durante la infección experimental de *Artemia* sp., infectadas con la Cepa 1 *V. fluvialis*

Figure 3. Effect of the bacterial dose during the experimental infection of *Artemia* sp., infected with *V. fluvialis* Strain 1

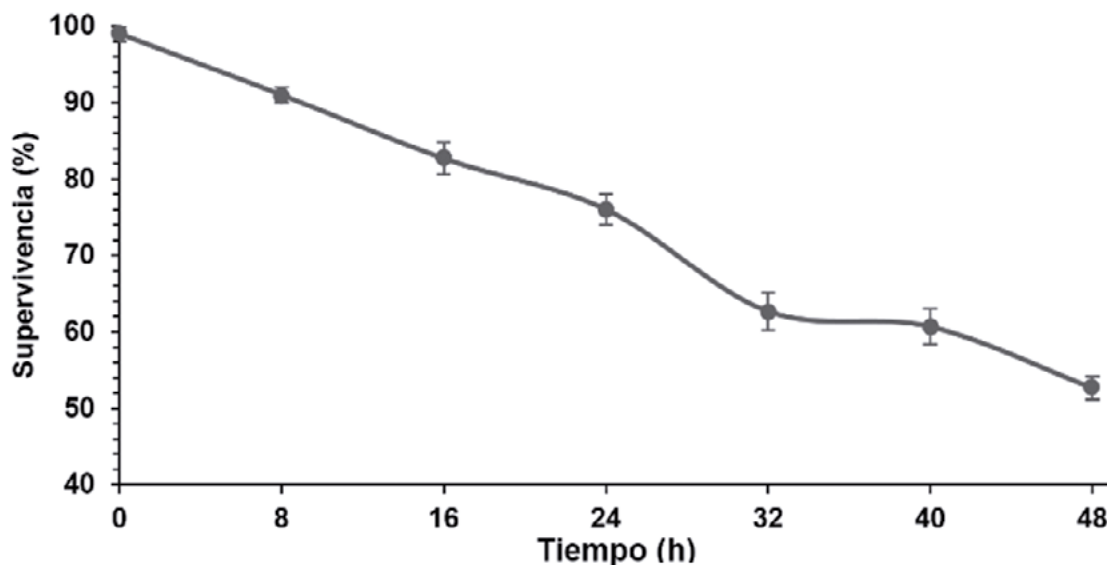


Figura 4.- Cinética de mortalidad de nauplios de *Artemia* sp., enfrentados con la LD_{50} bacteriana desde las 0 hasta las 48 horas

Figure 4. Nauplii mortality kinetics of *Artemia* sp., confronted with the bacterial LD_{50} from 0 to 48 hours

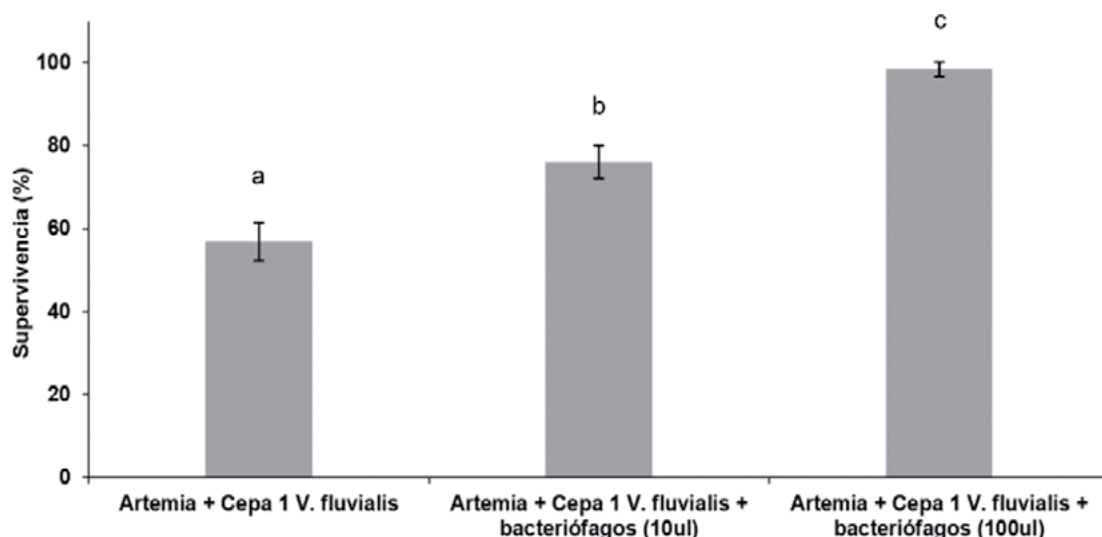


Figura 5.- Supervivencia de nauplios con la aplicación de diferentes dosis (10 y 100 µL) de bacteriófagos al inicio de la infección

Figure 5. Survival of nauplii with the application of different doses (10 and 100 µL) of bacteriophages at the onset of infection

en solución redujo significativamente ($p < 0,05$) la mortalidad respecto del grupo control, los cuales no recibieron tratamiento con bacteriófagos y del grupo que recibió una dosis de 10 µL. Los nauplios de *Artemia* sp., tratados con bacteriófagos alcanzaron una supervivencia promedio de 98,4% ± 1,81 y 76% ± 3,93 comparado con el grupo control, que alcanzó 56,8% ± 4,49 (Fig. 5).

reduced ($p < 0.05$) the mortality compared to the control group, which received no treatment with bacteriophages and the group that received a dose of 10 µL. The *Artemia* sp. nauplii treated with bacteriophages reached a mean survival of 98.4% ± 1.81 and 76% ± 3.93 compared to the control group, which reached 56.8% ± 4.49 (Fig. 5).

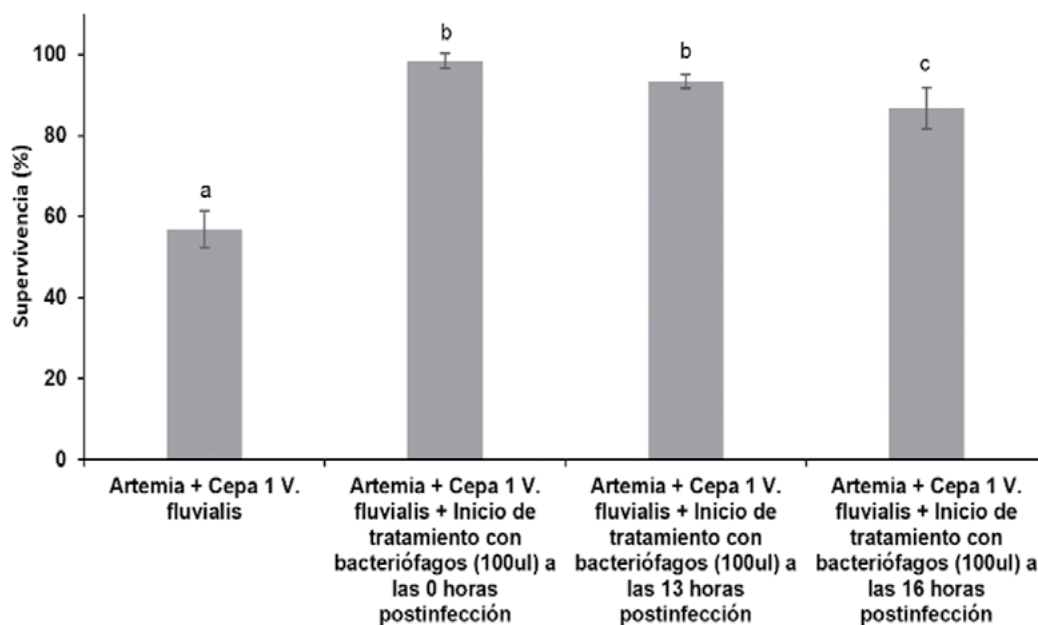


Figura 6.- Supervivencia de nauplios de *Artemia* sp., con la aplicación de dosis de bacteriófagos a las 13 y 16 horas de iniciada la infección

Figure 6. *Artemia* sp. nauplii survival, with the application of bacteriophage doses at 13 and 16 hours after the start of the infection

En el ensayo 2, se evidenció que la supervivencia promedio en nauplios de *Artemia* sp., en el tratamiento con bacteriófagos luego de 0, 13 y 16 horas de inducida la infección con la DL_{50} bacteriana fue de $98,4\% \pm 1,81$; $93,4\% \pm 1,82$ y $86,8\% \pm 5,07$, respectivamente (Fig. 6). Estos resultados son significativamente diferentes ($p < 0,05$) comparado con el control. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la supervivencia de nauplios de *Artemia* sp., tratados con bacteriófagos a las 0 y 13 horas.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron bacteriófagos para las bacterias aisladas a partir de pruebas positivas en placas, pero no se pudo realizar la caracterización del fago por no contar con las microfotografías electrónicas que permitan describir la morfología del virión (CHOW & ROUF 1983, JUN *et al.* 2013) las cuales podrían dar alcances taxonómicos. Además, los resultados del estudio de rangos de hospederos indican que los bacteriófagos Vf1 aislados, poseen alta especificidad, ya que su rango de hospederos es limitado a su bacteria huésped (YIN *et al.* 2012).

In test 2, it was evidenced that the mean survival in *Artemia* sp. nauplii, in treatment with bacteriophages after 0, 13, and 16 hours of induced infection with bacterial LD_{50} was $98.4\% \pm 1.81$; $93.4\% \pm 1.82$; and $86.8\% \pm 5.07$, respectively (Fig. 6). These results are significantly different ($p < 0.05$) compared to control. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the *Artemia* sp. nauplii survival, which were treated with bacteriophages at 0 and 13 hours.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this study, bacteriophages were isolated for bacteria, which were isolated from positive tests in dishes, but it was not possible to characterize the phage for not having the electronic microphotographs to describe the morphology of the virion (CHOW & ROUF 1983, JUN *et al.* 2013) which could give taxonomic scopes. In addition, the results of the host range study indicate that isolated Vf1 bacteriophages have high specificity since their host range is limited to their host bacterium (YIN *et al.* 2012).

En acuicultura, la fagoterapia es una alternativa que se está explorando como vía alterna para combatir a las bacterias patógenas debido a su alta especificidad para infectar y lisar su bacteria huésped (ALMEIDA *et al.* 2009, RONDA *et al.* 2003). En ese sentido, los resultados de la aplicación de fagos en nauplios de *Artemia* contra la Cepa 1 *V. fluvialis*, fueron efectivos al controlar las infecciones en este microcrustáceo con diferentes dosis y a diferentes tiempos de inducida la infección experimental.

Al parecer con dosis pequeñas de bacteriófagos Vf1 (10 y 100 μ L) se pudo controlar infecciones bacterianas producidas por la Cepa 1 *V. fluvialis* en nauplios de *Artemia* sp. Otras investigaciones han reportado como ventaja el hecho de utilizar dosis pequeñas de bacteriófagos para controlar infecciones bacterianas en acuicultura (MARTÍNEZ *et al.* 2013).

La efectividad de los bacteriófagos para controlar la mortalidad producida por la Cepa 1 *V. fluvialis* fue mejor al inicio de la infección (0 horas) que después de 16 horas. Aunque a las 16 horas post infección la supervivencia de nauplios de *Artemia* sp. con el tratamiento fágico fue significativamente mejor ($p < 0,05$) que el tratamiento control, se evidenció que la fagoterapia es más efectiva para controlar la mortalidad en nauplios de *Artemia* sp. cuando es aplicada a las 0 horas, inclusive hasta las 13 horas posterior a la infección, ya que no se evidenciaron diferencias significativas en la supervivencia ($p > 0,05$) entre estos tratamientos; sin embargo, existe la tendencia a obtener mejor supervivencia mientras más pronto se aplican bacteriófagos para controlar infecciones bacterianas. Estos resultados están en concordancia con otros autores, quienes han reportado la efectividad de los bacteriófagos para controlar poblaciones bacterianas en acuicultura como ALAGAPPAN *et al.* (2010) cuya investigación resultó en un efecto protector y correctivo de la aplicación de fagos en larvas de *Panaeus monodon* contra *Vibrio parahaemolyticus* en diferentes tiempos de iniciada la infección; además, NAKAI *et al.* (2002) y PARK *et al.* (2000) reportaron un efecto protector por parte de los fagos con un tiempo máximo de aplicación post infección de 24 h sobre los peces *Seriola quinqueradiata* y *Plecoglossus altivelis*, respectivamente. Estos hechos ponen en evidencia el potencial protector de estos virus para ser aplicados en acuicultura. Por eso, estos trabajos preliminares con nauplios de *Artemia* sp. servirán de

In aquaculture, phage therapy is an alternative that is being explored as an alternative way to combat pathogenic bacteria due to its high specificity to infect and lyse its host bacteria (ALMEIDA *et al.* 2009, RONDA *et al.* 2003). In this regard, the results of the use of phage in *Artemia* nauplii against *V. fluvialis* Strain 1, were effective in controlling infections in this microcrustacean with different doses and at different times of induced experimental infection.

Apparently, with small doses of Vf1 bacteriophages (10 and 100 μ L) it was possible to control bacterial infections produced by *V. fluvialis* Strain 1 in *Artemia* sp. nauplii. Other researches have reported the advantage of using small doses of bacteriophages to control bacterial infections in aquaculture (MARTÍNEZ *et al.* 2013).

The effectiveness of bacteriophages to control mortality produced by *V. fluvialis* Strain 1 was better at the onset of infection (0 hours) than after 16 hours. Although at 16 hours post-infection the *Artemia* sp. nauplii survival with phage treatment was significantly better ($p < 0.05$) than control treatment, it was evidenced that phage therapy is more effective in controlling mortality in *Artemia* sp. nauplii when it is applied at 0 hours, even until 13 hours post-infection, since there were no significant differences in survival ($p > 0.05$) between these treatments; however, there is a tendency to obtain better survival the sooner bacteriophages are applied to control bacterial infections. These results are in line with other authors, who have reported the effectiveness of bacteriophages to control bacterial populations in aquaculture as ALAGAPPAN *et al.* (2010) whose research resulted in a protective and corrective effect of the use of phages in *Panaeus monodon* larvae against *Vibrio parahaemolyticus* at different times of infection onset; in addition, NAKAI *et al.* (2002) and PARK *et al.* (2000) reported a protective effect by phage with a maximum post-infection application time of 24 h on *Seriola quinqueradiata* and *Plecoglossus altivelis* fish, respectively. These facts highlight the protective potential of these viruses to be applied in aquaculture. Therefore, these preliminary works with *Artemia* sp. nauplii will serve as a basis for phage therapy

base para los ensayos de fagoterapia en organismos acuáticos de importancia en acuicultura contra bacterias patógenas. Si bien *V. fluvialis* no se ha reportado como patógeno primario en organismos acuáticos, el ensayo demuestra *in vitro*, que el bacteriófago es eficaz al controlar el crecimiento de esta bacteria bajo condiciones de laboratorio y por lo tanto demuestra el potencial uso de estos agentes virales para el control de patógenos bacterianos de importancia para la acuicultura.

En conclusión, se aislaron e identificaron bacterias de ambiente marino de la especie *V. fluvialis*. Además, se aislaron bacteriófagos específicos para *V. fluvialis*. Los bacteriófagos aislados en laboratorio mostraron afinidad exclusiva a sus respectivos huéspedes bacterianos. En ese sentido, la fagoterapia aparece como una alternativa para el control de enfermedades en acuicultura ya que en los ensayos realizados aplicando bacteriófagos utilizando nauplios de *Artemia* sp. infectados con la Cepa 1 *V. fluvialis* evidenciaron protección y mejor supervivencia de aquellas no tratadas con bacteriófagos.

tests in aquatic organisms of importance in aquaculture against pathogenic bacteria. Although *V. fluvialis* has not been reported as a primary pathogen in aquatic organisms, the test demonstrates *in vitro*, that bacteriophage is effective in controlling the growth of this bacterium under laboratory conditions and thus demonstrates the potential use of these viral agents for the control of bacterial pathogens of importance to aquaculture.

To sum up, marine environment bacteria of the species *V. fluvialis* were isolated and identified. In addition, bacteriophages specific to *V. fluvialis* were isolated. The bacteriophages isolated in the laboratory showed exclusive affinity to their respective bacterial hosts. In this regard, phagotherapy appears as an alternative for the control of diseases in aquaculture since in the tests carried out by applying bacteriophages using *Artemia* sp. nauplii infected with *V. fluvialis* Strain 1 evidenced the protection and better survival of the ones that were not treated with bacteriophages.

5. REFERENCIAS / REFERENCES

- ALAGAPPAN K, DEIVASIGAMANI D, SOMASUNDARAM S, KUMARAN S. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. *Curr. Microbiol.* 61(4): 235 - 240.
- ALMEIDA A, CUNHA A, GOMES N, ALVENS E, COSTA L, FAUSTINO M. 2009. Phage therapy and photodynamics therapy: Low environmental impact approaches to inactivate microorganism in fish farming plants. *Mar Drugs.* 7: 268 - 313.
- BRADLEY D. 1965. The Isolation and morphology of Some New Bacteriophages Specific for *Bacillus* and *Acetobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* 41: 233 - 241.
- CABELLO F. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology.* 8 (7): 1137 - 1144.
- CHOW M, ROUF A. 1983. Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hydrophila* Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology.* 45(5): 1670 - 1676.
- DOPAZO C, LEMOS M, LODEIROS C, BOLINCHES J, BARJA J, TORANZO A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology.* 65: 97 - 101.
- FAO/OIE/WHO. 2006. Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland, Seoul, Republic of Korea (www.who.int/foodborne_disease/resistance/en/).
- Hsu C, Lo C, Liu J, Lin C. 2000. Control of the eel *Anguilla japonica* pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* by bacteriophages. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan.* 27: 21 - 31.
- HYMAN P, ABEDON S. 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology.* 70: 217 - 248.
- JUN J, KIM J, SHIN S, HAN J, CHAI J, PARK S. 2013. Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture.* 416-417: 289 - 295.
- LOMELI C O. 2011. La fagoterapia como estrategia para reducir la mortalidad por vibriosis en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Maestría en Manejo de Recursos Marinos Thesis, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas., La Paz, B.C.S., México. 98 pp.

- MARTÍNEZ S, HIPOLITO A. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the Vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*. 1(1): 120 - 124.
- NAKAI T, PARK S. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res Microbiol*. 153(1): 13 - 18.
- PARK S, SHIMAMURA I, FUKUNAGA M, MORI K, NAKAI T. 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen *Pseudomona plecoglossicida* as a candidate for disease control. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 1416 - 1422.
- PATERSON R, GRINER I, DERMOTT L. 1969. Isolation and preliminary characterization of some *Aeromonas salmonicida* bacteriophages. *J. Fish. Res. Board Can.* 26: 629 - 632.
- PHUMKHACHORN P, RATTANACHAIKUNSOPON P. 2010. Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *African Journal of Microbiology Research*. 4(16): 1794 - 1800.
- RONDA C, VÁSQUEZ M, LÓPEZ R. 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Revista AquaTIC*. 18: 3 - 10.
- SEGUNDO A, HERNÁNDEZ B, LÓPEZ V, TORRES O. 2010. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 4: 117 - 126.
- STENHOLM A, DALSGAARD I, MIDDELBOE M. 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(13): 4070 - 4078.
- WALAKIRA K. 2008. Discovery, isolation and characterization of bacteriophages specific for *Edwardsiella ictaluri*. Thesis of Master of Science. Auburn University. United States of America.
- WU J-L, HUI-MING LIN, LU JAN, YA-LI H, LU-HIS CHANG. 1981. Biological control of fish pathogen, *Aeromonas hydrophila* by bacteriophage, AH1. *Fish Pathology*. 15(3-4): 271 - 276.
- YIN R, CHI W, FEN Y, CHANG-SHIN L. 2012. Characterization of a new phage, termed ØA318, which is specific for *Vibrio alginolyticus*. *Arch. Virol*. 157: 917 - 926.