



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DETECCIÓN DE *Vibrio* spp. POR EL MÉTODO DE
PCR EN *Litopenaeus vannamei*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGO.

PRESENTA:

ALEJANDRA GUADALUPE MECALCO MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BERTHA PEÑA MENDOZA



Ciudad de México

Mayo 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO por permitirme ser parte de esta gran casa, así como a la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA por formar mi desarrollo académico, que hoy en día es parte fundamental de mi vida, de la misma manera agradezco a los grandes maestros que impartieron su conocimiento de la mejor forma.

Gracias a mi madre Elvia Martínez Licad, que con su cariño, apoyo y ejemplo me ha dado todo y mucho más de lo que necesito y merezco ¡Te amo madre!

A mis Hermanos Arturo, José Luis y Ramón Omar por su cariño, y pláticas constructivas los quiero mucho.

A mi esposo Daniel del Ángel Canales por tu apoyo y comprensión. ¡Te amo!

A mi hermosa hija Alike del Ángel Mecalco espero ser un gran ejemplo para ti.

A mi mejor amiga Sandra Edith Aldana Pérez por tus consejos y apoyo constante, te quiero mucho amiwis.

A mi Directora de Tesis Doctora Bertha Peña Mendoza por su apoyo, enseñanza y paciencia.

Al Doctor José Luis Gómez Márquez, Doctor Isaías Hazarmabeth Salgado Ugarte, a la Bióloga Angélica Elaine González Schaff y al Biólogo José Luis Guzmán Santiago por su conocimiento brindado así como su tiempo.

INDICE.

| | |
|--|----|
| AGRADECIMIENTOS..... | 1 |
| INDICE..... | 2 |
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| Microorganismos | 8 |
| <i>Vibrio</i> | 9 |
| Características generales. | 9 |
| <i>Vibrio</i> patógenos en organismos acuáticos..... | 11 |
| <i>Vibrio</i> en camarón. | 13 |
| <i>Vibrio</i> patógenos en humanos..... | 13 |
| La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 14 |
| ANTECEDENTES | 15 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 18 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 18 |
| OBJETIVO GENERAL. | 19 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS. | 19 |
| DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO..... | 20 |
| MATERIAL Y MÉTODO..... | 22 |
| Análisis de campo..... | 22 |
| Obtención de organismos | 22 |
| Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de dos estanques del estado de Tabasco | 23 |
| Análisis de laboratorio..... | 24 |
| Análisis de PCR para identificar la presencia de <i>Vibrio</i> spp., en camarón <i>L. vannamei</i> cultivados en UPC del Edo., de Tabasco..... | 24 |
| Preparación de muestras de <i>L. vannamei</i> para el análisis de PCR..... | 24 |
| Visualización de ADN del tejido de <i>Litopenaeus. vannamei</i> | 25 |
| Reacción de PCR para la identificación de <i>Vibrio</i> spp., en tejido de <i>L. vannamei</i> | 26 |
| Visualización de PCR en tejido de <i>L. vannamei</i> | 27 |
| RESULTADOS | 28 |
| Análisis clínico de <i>L. vannamei</i> de ambas UPC..... | 28 |

| | |
|--|----|
| Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de las UPC del estado de Tabasco | 29 |
| Identificación de <i>Vibrio</i> spp., presente en cultivos de camarón <i>L. vannamei</i> | 31 |
| Patógenos identificados en camarón durante el ciclo de cultivo | 35 |
| DISCUSIÓN | 35 |
| CONCLUSIÓN | 40 |
| BIBLIOGRAFÍA | 41 |
| ANEXOS | 46 |
| Anexo 1: Método para la extracción de ADN de tejido animal. | 46 |
| Anexo 2. PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA | 47 |
| Anexo 3: PREPARACIÓN DE BUFFER TAE 1X..... | 48 |
| Anexo 4. VISUALIZACIÓN DE ADN | 50 |

RESUMEN

El presente estudio se realizó en dos Unidades de Producción de Camarón (UPC) destinadas al cultivo semi-intensivo de *Litopenaeus vannamei* en el municipio de Cárdenas, Tabasco, en los meses de Febrero y Mayo en el año 2014. Ambos estanques cuentan con 2.5 hectáreas, de donde se colectaron 30 organismos al azar por estanque, para realizar análisis clínico mediante la técnica de PCR de las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Con la finalidad de identificar la presencia de *Vibrio* spp. los registros de temperatura fueron de 22°C – 26°C, de salinidad de 5 – 31 ups, oxígeno disuelto de 4.5 – 5.6 mg/L y pH de 7 para la UPC I; para la UPC II se registró una temperatura de 24°C - 28°C, salinidad de 9 – 38 ups, oxígeno disuelto 5.2 – 7 mg/L y pH de 7 – 8 de forma tal que están dentro de los márgenes ideales, para el crecimiento óptimo de *Litopenaeus vannamei* puesto que los intervalos son variados por los recambios de agua, a demás que de manera general *Vibrio* spp. es una bacteria sumamente versátil para lograr su supervivencia, ya que estas mismas condiciones son ideales para su presencia por ésta razón se detectó la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* mediante la técnica molecular de PCR se encontró en el sistema digestivo de los camarones que se utilizaron para el presente estudio con un 66% en la UPC 1 y 58 % en la UPC 2, esto es peligroso ya que para la proliferación de esta bacteria está dada por factores bióticos y abióticos así como en este caso el declive la salud por parte del hospedero también es crítica para que invada al organismo de manera llegando a ser una epizootia en poco tiempo. Con la técnica de PCR es rápido y muy sensible detectar la presencia de *Vibrio* spp, lo que la hace confiable, siendo ésta una buena opción en comparación con otras técnicas de detección, sin embargo es importante implementar la revisión constante de las unidades camaronícolas y de esta manera evitar pérdidas económicas cuantiosas.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una biotecnia que se apoya en técnicas y procesos sobre los cuales se cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas (Guerrero-Olzarán *et al.*, 2004). Actualmente es la actividad agroindustrial de mayor desarrollo a nivel mundial, que de acuerdo con las últimas estadísticas disponibles recopiladas por la FAO, alcanzó el máximo histórico de 90,4 millones de toneladas (equivalente en peso vivo) en 2012 que reflejó una ganancia de 144 400 millones de dólares (FAO, 2014), Figura 1.

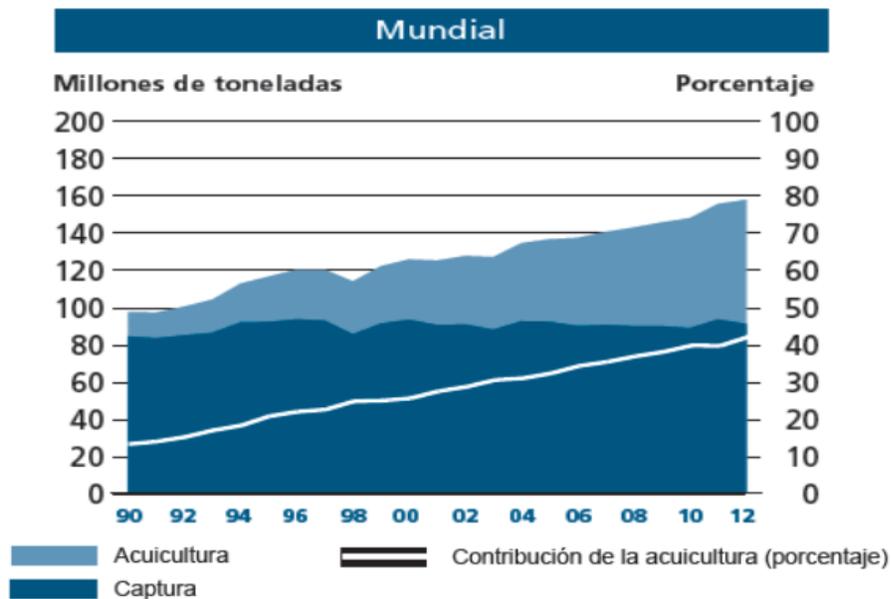


Figura 1. Proporción de la acuicultura en la producción pesquera total (FAO, 2014).

En la última década, el cultivo de camarón se ha desarrollado de manera exponencial en todo el mundo, expandiéndose más que cualquier otro sector productivo pecuario (Allsopp *et al.*, 2008). De acuerdo con el último reporte mundial de la FAO el camarón continúa como el principal producto acuático comercializado con 3,4 millones de toneladas, representando el 15 por ciento del valor total de los productos pesqueros comercializados a nivel internacional en el 2012 (FAO, 2014). Las especies de camarón de importancia comercial son algo menos de 300 en todo el mundo, y de éstas en solo 100 se concentra el mayor porcentaje de las capturas mundiales anuales. Seis grupos de especies representan el 83 por ciento de las capturas mundiales (Gillett, 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Las seis especies de cultivo principales de camarón a nivel mundial (Barba-Marcías et al., 2009)

| Nombre común | Nombre científico | Porcentaje |
|-----------------------------|--|------------|
| Camarón tigre | <i>Penaeus monodon</i> (Fabricius, 1798) | 56 |
| Camarón blanco asiático | <i>Fenneropenaeus merguensis</i> (de Man, 1888) | 17 |
| Camarón blanco del pacífico | <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) | 16 |
| Camarón blanco chino | <i>Fenneropenaeus chinensis</i> (Osbeck, 1765) | 6 |
| Camarón azul occidental | <i>Litopenaeus stylirostris</i> (Stimpson, 1874) | 4 |
| Camarón kuruma | <i>Marsupenaeus japonicas</i> (Bate, 1888) | 1 |

La industria acuícola en México comenzó a ser una actividad económicamente importante a finales de los años setenta y principios de los ochenta (De Walt *et al.*, 2002). En la Figura 2 se muestra las áreas de cultivo de especies dulceacuícolas y marinas en nuestro país, reportadas en el año 2009.

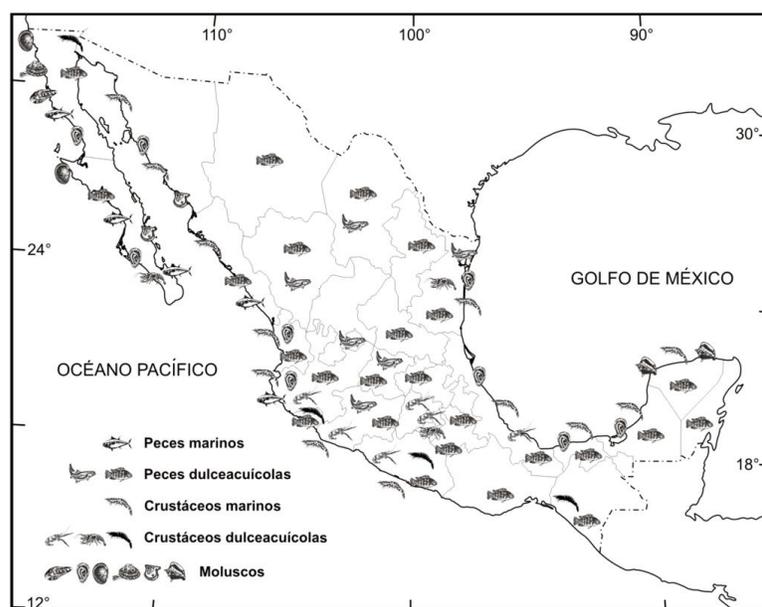


Figura 2. Distribución de áreas de cultivo de especies dulceacuícolas y marinas en México (Martínez-Córdova et al., 2009).

La captura y cultivo de camarón en México ha permanecido relativamente estable en los últimos catorce años, ganando importancia sobre otros organismos comerciales marinos en el área del Pacífico, ya que ésta se sostiene principalmente con cuatro especies de camarones: en la costa del Pacífico son el camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874), el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), el camarón patiamarillo *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900) y el langostino cristal *Farfantepenaeus brevisrostris* (Kingsley, 1878), mientras que en el Golfo de México y mar Caribe, las especies principales son el camarón café norteño *Farfantepenaeus aztecus* (Ives, 1891), el camarón rosado norteño *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939), el camarón blanco norteño *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767), el langostino rosado *Farfantepenaeus brasiliensis* (Burukovsky,

1997), el camarón de siete barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) y el langostino cristal *Sicyonia brevirostris* (Stimpson, 1871) (Gillett, 2010). De las especies anteriormente mencionadas el más prolifero es el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* que destaca en la acuicultura de muchos estados de la República Mexicana, en la figura 3 se observan los estados que producen el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Estos organismos son importantes por su morfología y fisiología, ya que cuentan con las mejores características de su especie para beneficio humano.

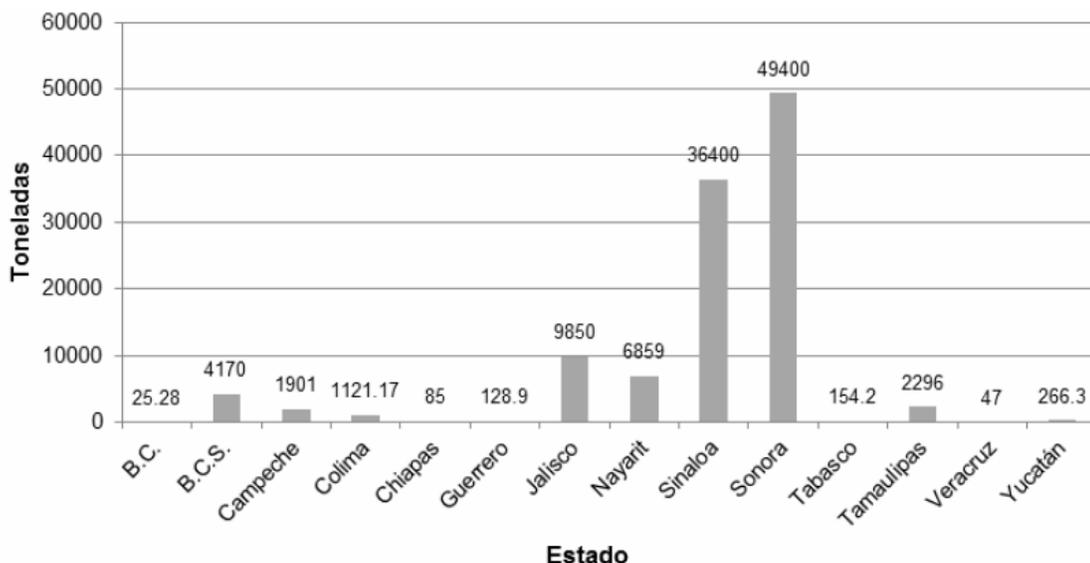


Figura 3. Producción Nacional Acuícola de camarón blanco del Pacífico por entidad federativa en 2010 (DOF. 2010)

El camarón *Litopenaeus vannamei* no se encuentra libre de enfermedades y lamentablemente a finales del 2012, y particularmente en el 2013, se vio afectado principalmente por el síndrome de mortalidad temprana, que aquejaron algunos países como Asia y América Latina (FAO, 2014). El síndrome de mortalidad temprana es una grave enfermedad que presenta el camarón de cultivo de reciente aparición. Es un agente patógeno, de la cepa *Vibrio parahaemolyticus*, siendo un microorganismo marino oriundo de aguas de estuario de todo el mundo. Afecta a tres especies de camarón de cultivo: *Penaeus monodon*, *P. vannamei* y *P. chinensis*. El síndrome acarrea pérdidas en la producción, pérdidas de ingresos y beneficios por parte de pequeños productores y empresas comerciales, un aumento de los precios del camarón a raíz de la escasez de la oferta y repercusiones en el comercio. En Viet Nam se vieron afectadas en 2011 unas 39 000 ha. Malasia estimó que las pérdidas de producción ascendieron a 100 millones de dólares en 2011, mientras que las estimaciones de la Alianza Mundial de Acuicultura situaban la cifra en 1.000 millones de dólares. En Tailandia, las empresas privadas comunicaron una disminución anual de la producción que oscilaba entre el 30% y el 70%. Se ha detectado la enfermedad en China, Malasia, México, Tailandia y Viet Nam (FAO, 2014).

Por esta razón se hace necesario realizar un diagnóstico técnico-sanitario para descartar o confirmar la presencia de *Vibrio* spp., mediante un análisis clínico presuntivo y un análisis por la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), en una Unidad Pesquera Camarónica (UPC) ubicada en el estado de Tabasco, cultivando el camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*.

Microorganismos

La microbiología es la ciencia que se encarga del estudio de estos pequeños seres vivos denominados microorganismos; este grupo incluye bacterias, hongos, protozoos y algas microscópicas, además de virus (Tortora *et al.*, 2007). Antes del desarrollo de la microbiología como ciencia, las enfermedades golpeaban, y controlaban los acontecimientos humanos (Ingraham e Ingraham, 1998). Con el avance de la ciencia se ha ido manejando estos microorganismos a favor del hombre; sin embargo, queda mucho por descubrir.

La clasificación de los seres vivos ha sido vital para el hombre, con el paso del tiempo se han hecho constantes descubrimientos que van ampliando los métodos de clasificación de los seres vivos, generando distintos métodos para clasificar organismos ya sea con base en su función, sus características fenotípicas y con la ayuda del ADN se ha ido delimitando o relacionando organismos a niveles tan mínimos como de especie y subespecies. Ernst Haeckel (1866) ordenó al mundo de los organismos en tres grupos principales o reinos: animal, vegetal y de los provistos. Basándose en las teorías de la selección y de la herencia de Charles Darwin (1859) reunió Haeckel a todos los géneros y especies vegetales y animales conocidos hasta el momento bajo el punto de vista de su posible desarrollo y distribuyó en un árbol filogenético la posible evolución a partir de una raíz común, “*Radix communis organismorum*”, de todos los organismos vivos conocidos hasta el momento (Schlegel y Zaborosch, 1997).

Le resultó difícil trasladar las ideas de Haeckel a los procariotas mientras no se tenía más que un conocimiento mínimo de la diversidad bacteriana y casi no se sabía de la estructura molecular de los componentes de los organismos. La evolución de los microorganismos fue objeto de especulaciones controvertidas. Se llegó al árbol filogenético de los procariotas cuando Woese en 1967 aisló y secuenció

las bases del RNA de los ribosomas, el RNAr, de un gran número de bacterias. A partir del grado de semejanza entre las secuencias de bases de diversos procariotas pudo extraerse la conclusión de que todos los procariota derivan de una raíz común (también denominado progenote) y que ya en tiempos tempranos los procariotas se dividieron en dos grupos, las arqueobacterias y las eubacterias. (Ingraham e Ingraham, 1998). En ese sistema todos los organismos se agrupan en tres dominios, a saber:

1. Bacterias (las paredes celulares contienen un complejo de proteína-hidrato de carbono denominado peptidoglucano).
2. Archea (sus paredes celulares, si están presentes, carecen de peptidoglucano).
3. Eukarya que incluye:
 - I. Protista (mohos mucosos, protozoos y algas).
 - II. Hongos (levaduras unicelulares, mohos multicelulares y setas [Champiñones]).
 - III. Vegetales (incluye musgos, helechos, coníferas y plantas con floración).
 - IV. Animales (incluye esponjas, parásitos, insectos y vertebrados).

Vibrio.

Características generales.

Entre las eubacterias existe una gran diversidad. La mayoría de las especies tiene una morfología celular característica; pueden ser esféricas, con forma bacilar, helicoidales, con forma de coma e incluso cuadradas. Algunas bacterias son móviles; otras no lo son. Algunas obtienen energía utilizando compuestos orgánicos (alimentos), del mismo modo que los animales; otras obtienen la energía mediante la fotosíntesis, como las plantas. Además, otras usan materiales inorgánicos, como el azufre o el hierro, para obtener energía, algunas bacterias pueden crecer a temperaturas del orden de -20 °C, inferiores al punto de congelación del agua (Ingraham e Ingraham, 1998). En general, *Vibrio* tienden a ser más común en aguas cálidas, en particular cuando las temperaturas exceden 17°C (Thompson *et al.*, 2004) no obstante, Urakawa y Rivera (2006) postulan que en aguas tropicales y subtropicales la variación de poblaciones de *Vibrio* es baja.

Algunas pueden crecer mejor en condiciones más ácidas que el zumo de limón, en tanto que otras encuentran favorables ambientes más alcalinos que el amoníaco doméstico (Ingraham e Ingraham, 1998). Diversos estudios han demostrado que lo *Vibrio* se encuentra a altas densidades en los ecosistemas marinos y han sido extensamente estudiados en los sistemas costeros por su importancia medioambiental e incidencia en la extracción de moluscos (Thompson y Polz, 2006). Además que la distribución y dinámica de estas poblaciones están influenciadas por gradientes medioambientales como: temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y factores biológicos como, depredación y abundancia de dinoflagelados y hospedadores.

Los siguientes miembros tienen un gran impacto en el ser humano: El grupo: entérico (*Enterobacteriaceae*), vibrios (*Vibrionaceae*) y pasteurelas (*Pasteurellaceae*). El grupo entérico (*Enterobacteriaceae*) incluye patógenos humanos, la mayoría de los cuales infectan el sistema digestivo. *Salmonella typhi*, causante de las fiebres tifoideas, varias especies del género *Shigella*, que causan la shigelosis, un tipo de disentería y *Vibrio cholerae*, es causante del cólera que se observa en la figura 4. La entérica también incluye a *Yersinia pestis*, agente causal de la peste bubónica y *Escherichia coli*, que ha permitido la investigación en todas las ciencias de la vida y actualmente es el instrumento principal de la tecnología del ADN recombinante (Ingraham e Ingraham, 1998).



Figura 4. *Vibrio cholerae*, visto al microscopio a 1 µm. Dartmouth Electron Microscope Facility/ Louisa Howard tomada de (www. Bacteriaynphotos.com).

El término entérico significa “intestinal”, pero no todos los miembros del grupo entérico se encuentran en el tracto digestivo de los animales. El grupo entérico se caracteriza por un metabolismo similar y no

por su hábitat. El género *Vibrio* naturalmente habitan ambientes marinos y de agua dulce en formas de vida planctónica en la columna de agua dulce (Worden et al., 2006) y en el tracto gastrointestinal de organismos marinos (Watnick et al., 2001), el tracto gastrointestinal de organismos marinos posee mayor disponibilidad de materia orgánica que el agua de mar, transformándose en un ambiente apropiado para vibrios, aunque en este micro ambiente están expuestos a un pH bajo, secreción de ácido bílico y a condiciones micro o anaeróbicas (Urakawa y Rivera, 2006).

Algunos organismos, incluidos algunos miembros del género *Erwinia*, causan enfermedades en plantas (Ingraham e Ingraham, 1998). Algunos miembros del grupo entérico son móviles mediante flagelos, mientras otros son inmóviles. Todos poseen morfología bacilar. Como anaerobias facultativas, las bacterias entéricas metabolizan los azúcares mediante fermentación cuando no disponen de oxígeno. Dos tipos diferentes de fermentaciones complejas son típicas del grupo entérico, denominadas fermentación ácidomixta y fermentación butanodiólica. Los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* poseen especies luminiscentes, que emiten luz como producto metabólico. La mayoría de las bacterias luminiscentes, posiblemente todas, se encuentran asociadas con la vida marina; algunas de estas asociaciones enormemente evolucionadas (Ingraham e Ingraham, 1998).

Las especies de *Vibrio* varían considerablemente en patogenicidad y aún están indefinidas las causas de su aparición y epidemiología. Esto es relevante debido a que ocasionan numerosos episodios patológicos, casos de mortalidad y grandes pérdidas económicas y alteraciones sociales en la población dedicada a industrias extractivas y procesadoras de productos del mar (Hernández *et al.*, 2005). Actualmente se están desarrollando nuevos métodos para identificar la patogenicidad, ecología y distribución de vibrios, además, de evaluar aquellas especies que evaden los métodos convencionales de cultivo (Eiler *et al.*, 2007).

***Vibrio* patógenos en organismos acuáticos.**

En el ecosistema marino los vibrios juegan funciones importantes como biodegradación de la materia orgánica y regeneración de nutrientes (Cavallo y Stabili 2004), además, pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial, o bien afectar al hombre (Thompson *et al.*, 2004). Existe una gran diversidad de vibrios reconociéndose casi 74 especies descritas dentro de este grupo, algunas de las cuales se han elucidado su función ecológica en la naturaleza (Thompson *et al.*, 2004). En

la tabla 2 se mencionan algunos Vibrios aislados y su presencia en diferentes organismos marinos con sus respectivos CFU en inglés Colony Forming Unit que son las Unidades Formadoras de Colonias.

Tabla 2. Concentración de Vibrios aislados de muestras de agua de mar y de diferentes organismos marinos (Leyton y Riquelme, 2008).

| N° | Agua/Organismo | Especie de Vibrio | Concentración y referencia |
|---------------------------------|---|-----------------------------|---|
| 1 | Agua de mar | <i>Vibrio spp.</i> | 10 ² CFU mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> , 1999) |
| | | <i>Vibrio spp.</i> | 1x10 ² -7x10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> , 2006) |
| | | <i>Vibrio spp.</i> | 9,7x10 ⁵ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> , 2000) |
| | | <i>V. vulnificus</i> | 10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> , 2006) |
| | | <i>V. cholerae</i> | 10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> , 2006) |
| | | <i>V. splendidus</i> | 10 ² CFU mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> , 1999) |
| | | <i>V. harveyi</i> | 26 a 58 CFU mL ⁻¹ (Makemson <i>et al.</i> , 1992) |
| | | <i>V. harveyi</i> | 5 a 8 CFU mL ⁻¹ (Lavilla- Pigoto <i>et al.</i> , 1990) |
| | Agua de mar (16°C) | <i>V. parahaemolyticus</i> | 4 cél. 100 mL ⁻¹ (DePaola <i>et al.</i> , 1990) |
| | 2 | Agua de mar (cultivo peces) | <i>V. spp.</i> |
| Agua de mar (cultivo rotíferos) | | <i>V. rotiferianus</i> | 1,7x10 ⁵ CFU mL ⁻¹ (Suantika, 2001) |
| <i>Crassotrea gigas</i> | | <i>Vibrio spp</i> | 3,2x10 ² y 1,9x10 ³ CFU mL ⁻¹ (Estes <i>et al.</i> , 2004) |
| 3 | Ostras | <i>V. parahaemolyticus</i> | 8,4x10 ⁵ -3,4x10 ⁷ CFU g ⁻¹ (Calik <i>et al.</i> , 2002) |
| | | <i>V. splendidus</i> | 10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> , 1999) |
| | | <i>V. parahaemolyticus</i> | 10 ³ CFU g ⁻¹ (Kaysner y DePaola, 2000) |
| | Ostión | <i>V. parahaemolyticus</i> | 10 ³ CFU g ⁻¹ (DePaola <i>et al.</i> , 2007) |
| | | <i>V. vulnificus</i> | 10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Cai <i>et al.</i> , 2007) |
| | | <i>V. parahaemolyticus</i> | 10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Colwell, 1996) |
| 4 | <i>Turbo cornutus</i> | <i>V. halioticoli</i> | 1,7x10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2003) |
| | <i>Haliotis diversicolor sepertexta</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | 3,5x10 ⁵ CFU mL (Cai <i>et al.</i> , 2007) |
| | <i>Haliotis discus</i> (digestivo) | <i>V. halioticoli</i> | 2,6x10 ⁶ a 9,9x10 ⁸ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> , 1995) |
| | <i>Haliotis midae</i> (digestivo) | <i>V. halioticoli</i> | 3,7x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> , 2006) |
| | <i>Haliotis tuberculata</i> | <i>V. gallicus</i> | 3,0x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> , 2006) |
| | <i>Haliotis laevigata</i> (digestivo) | <i>Vibrio spp</i> | 9,4x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> , 2006) |
| | <i>Litopennaneus vannamei</i> | <i>Vibrio spp</i> | 10 ⁵ y 10 ⁴ CFU g ⁻¹ (Gómez-Gil <i>et al.</i> , 1998) |
| 5 | | <i>Vibrio spp</i> | 10 ⁹ CFU g ⁻¹ (Moss <i>et al.</i> , 2000) |
| | <i>Penaeus merguensis</i> | <i>V. logei</i> | 10 ⁴ y 10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Oxley <i>et al.</i> , 2002) |
| | <i>Penaeus monodon</i> | <i>A. pelagius</i> | 10 ⁴ CFU mL ⁻¹ (Aguirre-Guzmán <i>et al.</i> , 2003). |
| | <i>Penaeus monodon</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | 1x10 ⁵ CFU peneido ⁻¹ (Sudheesh y Xu, 2001) |

| | | | |
|---|-------------------------------|----------------------|---|
| 5 | <i>Anguilla japonica</i> | <i>V. vulnificus</i> | 9,4x10 ³ a 2,3x10 ⁵ CFU anguila ⁻¹ (Tison <i>et al.</i> , 1982) |
| | <i>Plecoglossus altivelis</i> | <i>V. cholerae</i> | 1,26x10 ⁴ y 1,26x10 ² cél. mL ⁻¹ (Yamanoi <i>et al.</i> , 1980) |
| 6 | <i>Sepiolla</i> sp. | <i>Vibrio</i> spp. | 10 ¹¹ cél. Órgano ⁻¹ (Nishiguchi, 2000) |
| 7 | <i>Oculina patagónica</i> | <i>V. shiloi</i> | 10 ⁸ a 10 ⁹ cél. (cm ³) ⁻¹ (Rosenberg y Koren, 2006) |
| 8 | Zooplankton | <i>Vibrio</i> spp. | 4,3x10 ⁶ cél. (mm ²) ⁻¹ (Heidelberg <i>et al.</i> , 2002) |
| 9 | Sedimento | <i>Vibrio</i> spp. | 3,0x10 ³ CFU g ⁻¹ (Maeda <i>et al.</i> , 2003) |
| | | <i>V. harveyi</i> | 10 ³ CFU g ⁻¹ (Ramesh <i>et al.</i> , 1989) |

***Vibrio* en camarón.**

Las enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos y protozoarios representan una amenaza en la creciente industria camaronícola del noreste de México y del mundo en general (Morales, 2004). En la tabla 3 se mencionan algunas de las especies de *Vibrio* y al camarón donde se encuentra con mayor frecuencia generando enfermedades y pérdidas en las Unidades Camaronícolas.

Tabla 3. Especies de *Vibrio* causantes de enfermedades en camarones *Penaeidae* (Gómez-Gil *et al.*, 2011)

| Especies | Huésped | Referencia |
|----------------------------|---------------------------------------|--|
| <i>V. alginolyticus</i> | <i>P. monodon</i> | Jayasree <i>et al.</i> , 2006 |
| | <i>P. vannamei</i> | Hsieh <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>V. campbellii</i> | <i>P. monodon</i> | De la Peña <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>P. vannamei</i> , <i>larvas</i> | Soto-Rodríguez <i>et al.</i> 2006 ^a , Soto-Rodríguez <i>et al.</i> , 2006b |
| <i>V. harveyi</i> | <i>P. monodon</i> | Alapide-Tendencia y Dureza 1997, de la Peña <i>et al.</i> , 2001, Jayasree <i>et al.</i> , 2006. |
| <i>V. nogripulchritudo</i> | <i>P. stylirostris</i> | Goarant y Merien, 2006 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>P. monodon</i> | Alapide-Tendencia y Dureza, 1997 |
| | <i>P. vannamei</i> | Roque <i>et al.</i> 1998, Roque <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>V. penaeicida</i> | <i>P. japonicus</i> | Ishimaru <i>et al.</i> , 1995 |
| | <i>P. stylirosris</i> | Saulnier <i>et al.</i> , 2000 |

***Vibrio* patógenos en humanos.**

De todas las especies de *Vibrio* reportadas solo doce afectan la calidad de vida del ser humano, ya sea de manera epidémica o en casos muy aislados, esta familia de microorganismo está fuertemente vigilada por las autoridades sanitarias, en la tabla 4 se mencionan algunas enfermedades con la especie de *Vibrio* que la causa.

Tabla 4. Especies de *Vibrio* asociadas a enfermedades humanas (Delgado, 2005) y (Dalsgaard, 1998).

| Especie | Enfermedad |
|----------------------------|---|
| <i>V. cholerae</i> | Cólera, o diarrea tipo cólera gastroenteritis, infección de tejido blando |
| <i>V. mimicus</i> | Diarrea tipo cólera |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | Gastroenteritis, infección de tejido blando |
| <i>V. fluvialis</i> | Diarrea |
| <i>V. furnissii</i> | Sospecha de diarrea |
| <i>V. hollisae</i> | Diarrea y septicemia |
| <i>V. alginolyticus</i> | Infección de tejido blando |
| <i>V. damsela</i> | Infección de tejido blando |
| <i>V. vulnificus</i> | Septicemia, infección de tejido blando |
| <i>V. metschnikovii</i> | Posible oportunista |
| <i>V. carchariae</i> | Infección de tejido blando |
| <i>V. cincinnatiensis</i> | Septicemia |

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de DNA, obtener millones de copias idénticas, en pocas horas y sin necesidad de usar células vivas. Este método, altamente sensible y específico, ha permitido detectar mutaciones asociadas con enfermedades hereditarias y distintos tipos de cáncer, monitorizar los tratamientos usados para tratar estas enfermedades y como herramienta fundamental en la medicina forense. Debido a su alta sensibilidad, la técnica de PCR permite el diagnóstico de enfermedades para las que los métodos clásicos fracasaban. Un ejemplo es el caso de los métodos de diagnóstico inmunológicos basados en la detección de antígenos en muestras provenientes de pacientes infectados, que en muchos casos resultan ineficientes por ser poco infectados y poco sensibles. Mediante la detección por PCR de secuencias específicas de estos agentes infecciosos se ha podido llegar al diagnóstico temprano de estas infecciones. Por otra parte, el uso de la PCR para amplificar secuencias específicas de DNA permite obtener verdaderas huellas digitales moleculares que han abierto el camino a estudios de identidad y filiación en humanos y otras especies. Su aplicación se ha extendido a estudios de evolución que incluyen el análisis de muestras de DNA correspondiente a individuos desaparecidos hace millones de años (Curtis y Schnek, 2008).

ANTECEDENTES

En los resultados obtenidos por Gómez-Gil y colaboradores en el 1998 en Difco Laboratories, Detroit, MI, dólares; donde tomaron muestras del hepatopáncreas, estómago, intestino y hemolinfa de camarón *P. vannamei* juveniles, Las tres áreas del tracto digestivo contenían una población diversa de *Vibrio* spp. Pero la hemolinfa contenía bacterias en sólo el 14,3% de los animales que se muestrearon tenían *Vibrio* spp., por lo que determinaron que *Penaeus vannamei* puede tener una población diversa de bacterias dentro de sus tejidos. Concluyendo que la presencia de *Vibrio* está en *Litopenaeus vannamei* sanos sin que presenten síntomas de camarones enfermos o de mortalidad, así como mencionan la presencia de dos especies bacterianas para llegar a ser virulentos.

Saulnier y colaboradores en el 2000 realizaron una revisión y mencionan que, las observaciones que llevan a los investigadores a considerar las enfermedades de *Vibrio* como infecciones secundarias debido a patógenos oportunistas y que sólo se producen en camarones inmunológicamente comprometidos. Las causas primarias podrían incluir otros agentes infecciosos como deficiencias nutricionales o intoxicación, prácticas ambientales y de manejo además del estrés inducido. Esto hace evidente que algunas cepas de *Vibrio harveyi* y *V. penaeicida* aisladas de camarón moribundo pueden ser verdaderos patógenos y ser la causa primaria de la enfermedad muy similar a lo que concluyó Gómez-Gil en el año de 1998.

Es importante realizar métodos de detección rápida del genero *Vibrio* en las Unidades de Cultivo debido a que esta bacteria es letal y termina con los organismos en pocas horas como lo menciona González en el 2003 registrando distintos acontecimientos de bacterias del género que provocaron mortalidad de camarones *Litopenaeus vannamei* en granjas del estado de Sonora, México. Los síntomas presentados por estos organismos fueron antenas rojizas, uropodos inflamados y cromatóforos expandidos.

Trujillo y colaboradores trabajaron con camarones juveniles en el 2005, provenientes de la granja Vista Hermosa, ubicada en Soto la Marina, Tamaulipas, los cuales al comparar la mortalidad por los

camarones a lo largo de 240 has., de post-exposición a las cepas experimentales, se observaron que los camarones sometidos a *Vibrio sp.*, tuvieron una mortalidad significativa mayor ($p < 0.05$) que los expuestos a *V. parahaemolyticus* (45 ± 20 y $7 \pm 5\%$ respectivamente). Estos últimos organismos no presentaron una diferencia significativa ($p > 0.05$) comparada con el grupo control. Los camarones que sobrevivieron hasta el final del bioensayo de exposición de *Vibrio sp.*, mostraron signos externos típicos de vibriosis tales como necrosis en apéndices, letargo y tracto intestinal vacío.

Ibarra-Gómez y colaboradores en el 2007, analizaron un total de 649 muestras (la unidad de muestra fue de 10 camarones) de 9 granjas de Sonora y 144 muestras de 42 granjas de Sinaloa, durante los ciclos de cultivo en 2002, con un monitoreo sistemático en granjas camaronícolas de Sinaloa y Sonora para el diagnóstico presuntivo y confirmativo de necrosis hepatopancreática (NHP), el primero por macroscopia de luz, el segundo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y tinciones negativas al microscopio electrónico de transmisión (MET) concluyen que con las herramientas de diagnóstico tradicional y molecular permitieron identificar con certeza el agente causal de epizootias como la causada por la bacteria de NHPB en la región; además de descartar mediante la PCR y análisis microbiológicos otros agentes biológicos como el virus del síndrome de la mancha blanca, el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa el parvovirus hepatopancreático y la vibriosis.

Morales en el 2004, reporta la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR en la costa del golfo de California, en la bahía de La Paz en laboratorios productores de larvas de camarones, los cuales exportan su producción a los Estados de Sonora y Sinaloa, recomendando esta técnica para su detección rápida.

Morales y colaboradores en el 2011 mencionan la presencia de *Vibrio* en necrosis del hepatopáncreas séptico (NHP) detectada en 8 regiones; para dicha selección se tomó como base los reportes de enfermedades de 2003, 2004 y 2006 y los resultados de un muestreo exploratorio realizado en el año 2007. (México 1, México 2, Belice, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Venezuela y Brasil con prevalencia promedio de 19.05%), los organismos enfermos presentaron una o dos especies de bacterias en hemolinfa y hepatopáncreas observándose *Vibrio campbellii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio brasiliensis* y *Streptococcus* spp.

Gómez-Gil y colaboradores en el 2011, mencionan que en crustáceos es común encontrar bacterias en órganos internos e incluso en la hemolinfa en organismos sin signos aparentes de enfermedad y por lo tanto son considerados aparentemente sanos.

Leyva-Castillo y colaboradores en el 2013 hallaron 12 especies del género *Vibrio* reconocidas como patógenas, en ostiones: 33.8%; peces: 29.5%; langostas: 22.1%; y camarones: 14.5%, extraídos de aguas circundantes de dos provincias de la Habana Cuba. Las especies de *Vibrio* con mayor presencia fueron *V. alginolyticus* (34.0%), *V. cholerae* no-O1 (25.5%) y *V. parahaemolyticus* (19.0%).

Albuquerque y colaboradores en el 2013 realizaron un estudio el cual tenía como objetivo investigar la presencia de vibrios en hepatopáncreas del camarón de cultivo, fueron aislados, identificados y cuantificados los *Vibrios* del hepatopáncreas de 75 camarones blancos del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), aparentemente sanos, oriundos de un cultivo. Los hallazgos del presente estudio sugieren que, incluso en ausencia de síntomas de la vibriosis, la microbiota del hepatopáncreas del camarón cultivado puede incluir vibrios positivos y negativos a la sacarosa en el estado de Ceará, Nordeste de Brasil.

Rodríguez-Camacho y colaboradores en el 2014 detectaron la presencia de *V. parahaemolyticus* mediante las pruebas bioquímicas y PCR en cuatro puntos, tres de ellos en cuerpos de agua denominados Sistema Lagunar Huizache-Caimanero (SLHC); Laguna Pescadero (LP) y Laguna San Pedro (LSP) y el cuarto se estableció en un centro de venta al menudeo y medio mayoreo de camarón, ubicado en el centro de la ciudad de Mazatlán, Sinaloa. En mayo del 2012 se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* en los cuatro puntos de muestreo, mientras que en el mes de junio se detectó únicamente en LP y LSP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La ausencia de control sanitario tanto en el estado de Tabasco como en el resto de los estados de la República Mexicana es muy grave:

1) Para los productores, por las grandes inversiones económicas que se realizan, tanto en la compra de los reproductores, como en las instalaciones, alimentación, pago de personal para el cuidado de la granja, y otros insumos necesarios e indispensables

2) Para los consumidores, es un riesgo la presencia del *Vibrio spp.*, en los camarones debido a que algunos de estos pueden generar malestar en los humanos.

En la actualidad, se tienen antecedentes de que existe la enfermedad en el país, principalmente en los estados de donde se abastece la cría del camarón, por lo que se hace necesario conocer y aplicar las medidas preventivas que evitarán la propagación de dicha enfermedad. Por esta razón el análisis fisicoquímico del camarón *Litopenaeus vannamei* es importante.

JUSTIFICACIÓN.

Existen unidades de producción de camarón (UPC) en el estado de Tabasco que carecen de estudios sanitarios, como consecuencia de la falta de monitoreo, lo que respecta a la identificación de *Vibrio spp*, aun cuando existen evidencias y antecedentes de que en diversas granjas camaronícolas en el norte del

país (principal zona de procedencia de las post-larvas sembradas), han reportado enfermedades y mortalidades relacionadas con la presencia de *Vibrio* spp, asociadas a diversos factores de manejo durante el cultivo. Por lo anterior, el presente estudio tiene como finalidad el detectar *Vibrio* spp., mediante el método de PCR.

OBJETIVO GENERAL.

Verificar la presencia de *Vibrio* spp., en el cultivo de camarón y con base en los diagnósticos clínicos establecer la relación con los factores de manejo que pueden influir en la presencia de dicha bacteria durante el ciclo de cultivo de camarón *L. vannamei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Identificar por PCR la presencia de *Vibrio* spp., en camarón *L. vannamei* durante un ciclo de cultivo de dos granjas del estado de Tabasco.

Analizar los diagnósticos clínico, técnico-sanitario para establecer la posible relación con la presencia de *Vibrio* spp., patógenos identificados en camarón durante una etapa del cultivo.

Analizar las condiciones físicas y químicas del agua en donde se cultiva a camarón y su relación con la enfermedad

DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO.

El estado de Tabasco representa 1.26% de la superficie del país. El 95.5% de la superficie del estado presenta clima cálido húmedo, el restante 4.5% es clima cálido subhúmedo hacia la parte este del estado. La temperatura media anual en la entidad es de 27°C, la temperatura máxima promedio es de 36°C y se presenta en el mes de mayo, la temperatura mínima promedio es de 18.5°C durante el mes de enero. La precipitación media estatal es de 2 550 mm anuales, las lluvias se presentan todo el año, siendo más abundantes en los meses de junio a octubre. En la figura 5 se muestra el mapa hidrográfico del estado de Tabasco y con un punto rojo se señala la ubicación de la UPC.

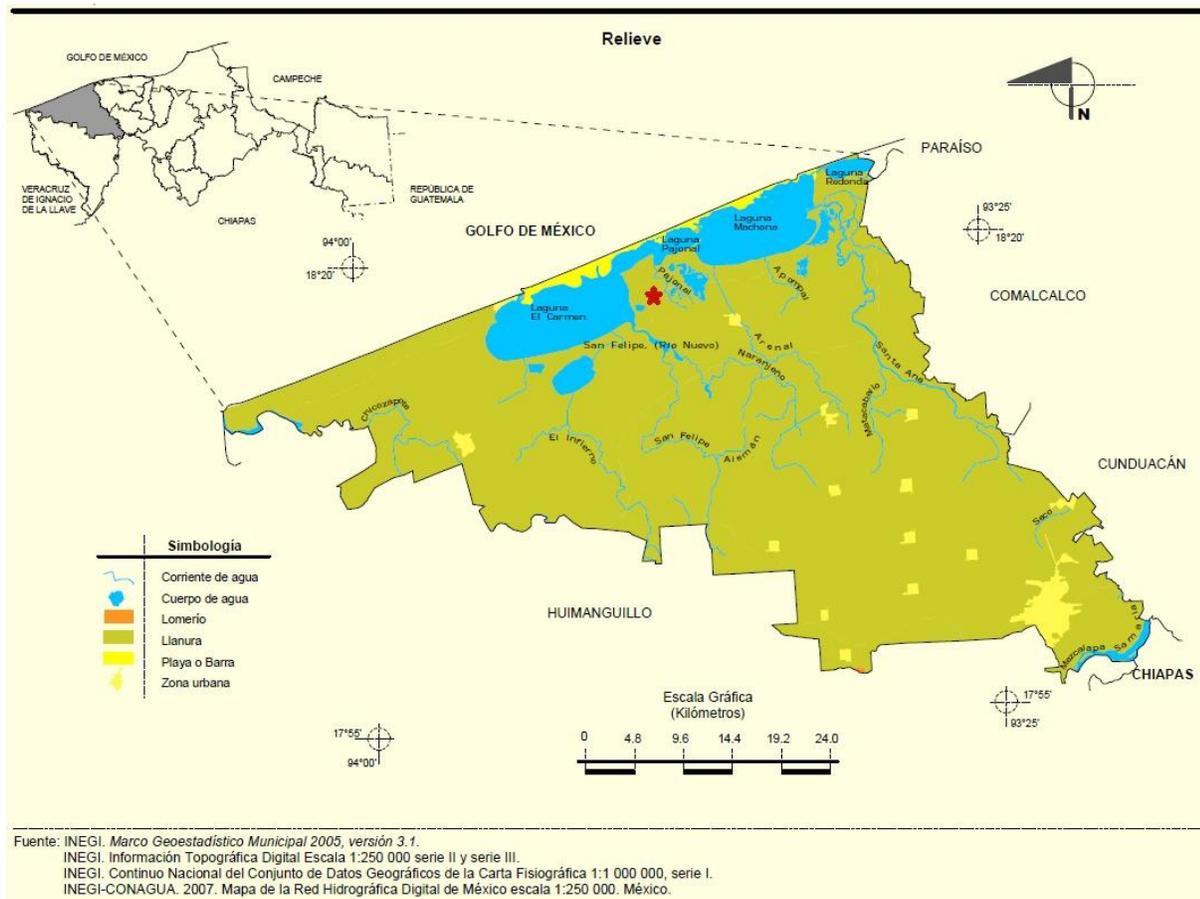


Figura 5. Macro-localización de Cárdenas, Tabasco, México.

El presente estudio en el ciclo comprendido de febrero-mayo del 2014, en la comunidad “Las Azucenas 3ra sección, localidad del municipio de Cárdenas, Tabasco en las coordenadas 18° 17’ 25” LN y 93° 42’ 39” LO, está cuenta con nueve estanques de cultivo semi-intensivo de tipo rústico con una profundidad promedio de 1.20 m y con un canal para alimentación de agua para el estanque y otro canal para desagüe; sólo se seleccionaron dos estanques para la toma de muestras, los cuales cuentan con una dimensión de 2.5 hectáreas y se calcula que solo en estos dos estanque se obtiene una producción de cinco a siete toneladas por ciclo. En la figura 6 se muestra los estanques de cultivo de la Unidad Camaronícola, los que se utilizaron para el presente estudio están señalados con dos estrellas de color rojo.



Figura 6. Unidad de Producción Camaronera las Conchitas

MATERIAL Y MÉTODO

De los dos estanques que se tomaron para realizar el presente estudio, se colectaron 30 organismos por cada uno al azar, con atarraya de 3.8 m. de caída y luz de malla de 0.01m, para realizar análisis clínico y molecular con la finalidad de identificar la presencia de *Vibrio* spp. El tamaño de la muestra se determinó con base a la tabla 5 descrita por Amos en 1985 y modificada por Lightner en 1996, teniendo en cuenta el tamaño de la población mayor a 100,000 camarones.

Tabla 5. Tamaño de muestra basado en una estimación de la prevalencia de un patógeno en una población de camarón (modificada a partir de Amos, 1985) (Lightner et al., 2009)

| Población | Tamaño de muestra requerido a una prevalencia estimada de: | | | | | | |
|-----------|--|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 2% | 5% | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% |
| 50 | 50 | 35 | 20 | 10 | 7 | 5 | 2 |
| 100 | 75 | 45 | 23 | 10 | 9 | 7 | 6 |
| 250 | 110 | 50 | 25 | 10 | 9 | 8 | 7 |
| 500 | 130 | 55 | 26 | 10 | 9 | 8 | 7 |
| 1,000 | 140 | 55 | 27 | 10 | 9 | 9 | 8 |
| 1,500 | 140 | 55 | 27 | 10 | 9 | 9 | 8 |
| 2,000 | 145 | 60 | 27 | 10 | 9 | 9 | 8 |
| 4,000 | 145 | 60 | 27 | 10 | 9 | 9 | 8 |
| 10,000 | 145 | 60 | 27 | 10 | 9 | 9 | 8 |
| ≥100,000 | 150 | 60 | 30 | 10 | 9 | 9 | 8 |

Las muestras colectadas se colocaron en bolsas ziploc según el tamaño y edad de los organismos. Se fijaron con alcohol al 90% y se colocaron en neveras a temperatura de 4-5°C. La recolección, preservación y almacenamiento de muestras se realizó de acuerdo a los criterios de la norma PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005.

Análisis de campo.

Obtención de organismos

Durante la visita a las instalaciones de la UPC se evaluaron solo dos estanques de producción que se seleccionaron para el presente estudio y así inspeccionar si la población de organismos presentaba características normales ó infectados, por lo que se realizó una revisión corporal completa a los organismo que se colectaron, así como la revisión de los estanques, en caso de que los organismos presentaran algunos de los signos que se enlistan a continuación, dichos síntomas son indicadores de alguna enfermedad en particular, presentando uno o varios de éstos se puede formar una idea aproximada de la proporción de la población afectada, grado de severidad y qué tipo de enfermedad podría estar causando el posible brote, de acuerdo a las características observadas en la población muestreada..

Listado de las características de observación para el diagnóstico de camarones presuntamente enfermos (Morales *et al.*, 2008).

- ❖ Color del animal (Es normalmente blanco traslucido)
- ❖ Tamaño del cuerpo comparado con el resto de la población (enanismo)
- ❖ Expansión de cromatóforos
- ❖ Deformidades en rostro, abdomen o apéndices
- ❖ Color de las branquias (amarillas, marrón o negras)
- ❖ Color de los apéndices (pereiópodos, pleópodos y urópodos)
- ❖ Color de las antenas
- ❖ Edema (presencia anormal de líquido) en apéndices
- ❖ Transparencia de los músculos del abdomen y del cefalotórax
- ❖ Repleción intestinal (porcentaje del intestino que se encuentra lleno)
- ❖ Textura del exoesqueleto (duro o blando)
- ❖ Tono del músculo abdominal (firme o flácido)
- ❖ Presencia de moco sobre la cutícula (resbaloso o áspero al tacto)
- ❖ Manchas, laceraciones, heridas, zonas oscuras u opacas, astillas clavadas.
- ❖ Color del esófago y estómago (el color anaranjado sugiere mortalidad)

Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de dos estanques del estado de Tabasco

Las variables de pH, temperatura, oxígeno disuelto (OD), potencial de óxido-reducción (ORP), salinidad, sólidos totales disueltos (STD) en agua se determinaron *in situ* mediante un multiparámetro marca Hanna HI 95928.

Análisis de laboratorio.

Análisis de PCR para identificar la presencia de *Vibrio* spp., en camarón *L. vannamei* cultivados en UPC del Edo., de Tabasco.

Para el presente estudio se empleó la técnica de PCR convencional basándose en la detección y amplificación de los genes correspondientes de *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, los cuales se presentan con frecuencia en los cultivos de camarón reportados por diversos autores (Tabla 2, 3), los análisis se llevó a cabo en el laboratorio de investigación y recursos acuáticos, del Instituto Tecnológico de Boca del Río, ubicado en Veracruz.

La elección de cebadores, primers u oligonucleótidos es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cebadores que se utilizan para éste trabajo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Cebadores utilizados para la detección de bacterias del genero *Vibrio*, mediante el análisis de PCR

| Bacteria | Gen | Primer y prueba de secuencia | Pb | Referencia |
|----------------------------|------|---|-----|-----------------------|
| <i>V. vulnificus</i> | Vvh | Vvh-785F: 5'-CCG CGG TAC AGG TTG GCG CA-3' Vvh-1303R: 5'-CGC CAC CCA CTT TCG GGC C-3' | 205 | Brasher et al. (1998) |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | Tlh | L-TLH: 5'-AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG-3' R-TLH: 5'B-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3' | 450 | Bej et al. (1999) |
| <i>V. harveyi</i> | toxR | F-toxRF1: 5'-GAAGCAGCACTCACCGAT-3' R-toxRR1: 5'-GGTGAAGACTCATCAGCA-3' | 382 | Pang et al. (2006) |
| <i>V. alginolyticus</i> | gyrB | F-gyrB: 5'-ATT GAG AAC CCG ACA GAA GCG AAG-3' R-gyrB : 5'-CCT AAT GCG GTG ATC AGT GTT ACT-3' | 340 | Chen et al. (2002). |

Preparación de muestras de *L. vannamei* para el análisis de PCR.

Para la extracción del ADN se tomaron fragmentos del intestino de *Litopenaeus vannamei* y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL con alcohol al 90%, posteriormente se maceraron con un

bisturí en una caja Petri estéril y se continua con el protocolo de extracción del kit comercial Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Corp.) que se describe en el anexo 1.

Visualización de ADN del tejido de *Litopenaeus. vannamei*.

Se confirmó que la extracción de ADN por medio del gel de agarosa al 0.8% el cual se describe su preparación en el anexo 2, éste se tiñe con 3 μ l de bromuro (Maxicell ec 360m electrophoretic gel system), una vez hecho el gel y colocado en la cámara de electroforesis se sumerge en una solución de Tris-Acetato-EDTA (Anexo 3 inciso a) hasta cubrir el gel en superficie como se muestra en la figura 7.

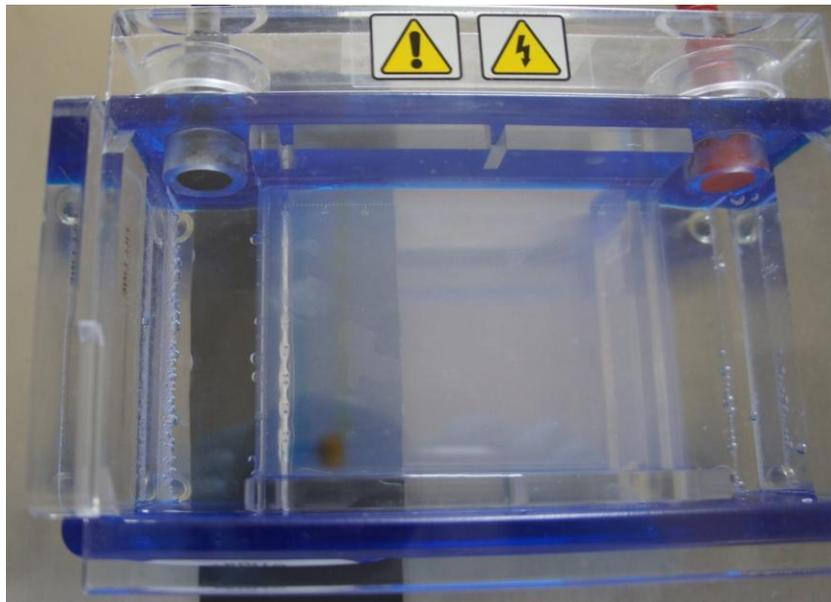


Figura 7. Gel de agarosa sumergido en la solución Tris-Acetato-EDTA, en una cámara de electroforesis

Una vez que se confirmó el ADN, se procedió con las muestras de extracción de ADN y se mezclaron con una solución buffer de carga Loading Dye (Promega Corp.), en papel de parafina. La porción de mezcla fue de 5 μ l de buffer con 2 μ l de ADN los cuales se inyectaron en el gel de agarosa, una vez llenado cada pozo se dio corriente de 90 Volts con un tiempo aproximado de 40 a 60 minutos (Anexo 4). Se visualizaron las bandas definidas en un transiluminador de luz UV, para confirmar su presencia como se observa en la figura 8.

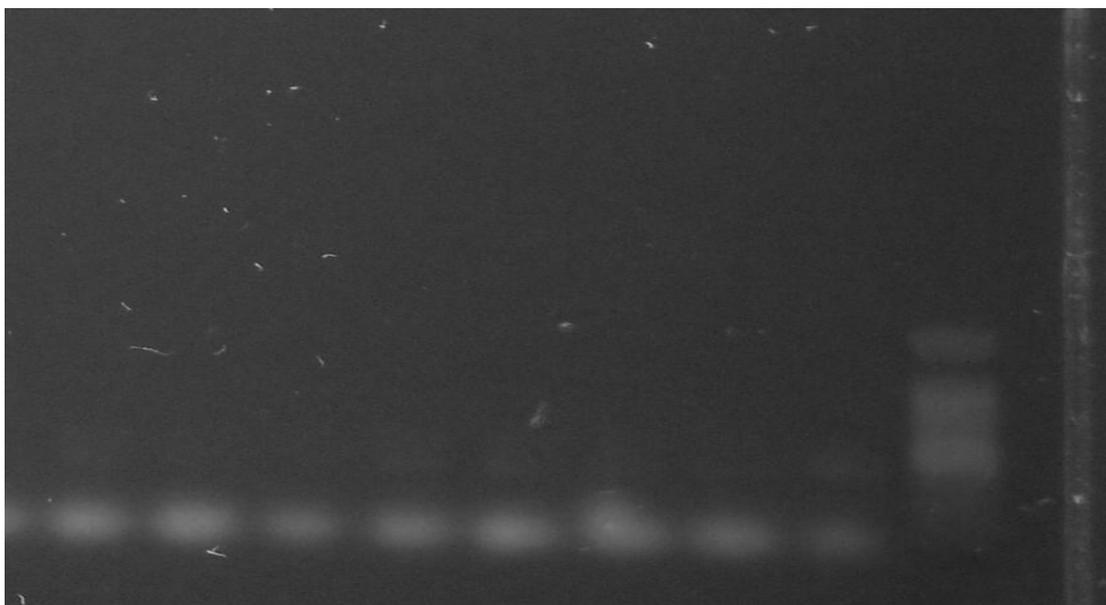


Figura 8. Confirmación de presencia de ADN.

Reacción de PCR para la identificación de *Vibrio* spp., en tejido de *L. vannamei*.

Para las mezclas de reactivos de PCR se empleó la campana de flujo laminar, la cual se esterilizó con alcohol al 70%, cloro al 90% y 30 min de radiación UV. Posteriormente se prepararon tubos Eppendorf de 0.2 mL (Corning), con 25 μ l de reactivos al cual se le añadió 1 μ l de ADN de la muestra que se confirmó previamente, como se observa en la figura 9.



Figura 9. Preparación de tubos Eppendorf con la capacidad para 0.2 mL, y con 25 μ l de ADN en la campana de flujo laminar.

Se realizó un control positivo (C+) con ADN control, el cual se tomó como referencia para visualizar la reacción correcta de PCR. Los tubos Eppendorf con 25µl de mezcla se colocaron en un termociclador (Apollo atc 402) con las condiciones descritas en la Tabla 7, a cada una de las muestras se les aplicó este procedimiento. La determinación de las condiciones del termociclador (Apollo atc 402).

**Tabla 7. Condiciones de operación del termociclador
Condiciones para los cebadores vvh**

| Etapa | Ciclos | Fase | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Autor |
|-------|--------|---------------------------|------------------|--------------|-------------------------|
| 1 | 1 | Desnaturalización natural | 94 | 10 | Brasher et al., (1998) |
| 2 | 25 | Desnaturalización | 94 | 1 | |
| | | Alineamiento | 62 | 1 | Panicker et al., (2004) |
| | | Extensión | 72 | 1 | |
| 3 | 1 | Extensión final | 72 | 10 | |

Condiciones para los cebadores tlh

| Etapa | Ciclos | Fase | Temperatura | Tiempo | Autor |
|-------|--------|---------------------------|-------------|--------|--------------------|
| 1 | 1 | Desnaturalización natural | 94 | 5 | Bej et al., (1999) |
| 2 | 30 | Desnaturalización | 94 | 0.30 | |
| | | Alineamiento | 58 | 0.45 | |
| | | Extensión | 72 | 0.45 | |
| 3 | 1 | Extensión final | 72 | 5 | |

Condiciones para el cebador toxR

| Etapa | Ciclos | Fase | Temperatura | Tiempo | Autor |
|-------|--------|---------------------------|-------------|--------|---------------------|
| 1 | 1 | Desnaturalización natural | 94 | 1 | Pang et al., (2006) |
| 2 | 30 | Desnaturalización | 94 | 1 | |
| | | Alineamiento | 55 | 1 | |
| | | Extensión | 72 | 1 | |
| 3 | 1 | Extensión final | 72 | 10 | |

Condiciones para el cebador gyrB

| Etapa | Ciclos | Fase | Temperatura | Tiempo | Autor |
|-------|--------|---------------------------|-------------|--------|----------------------|
| 1 | 1 | Desnaturalización natural | 95 | 1 | Chen et al., (2002). |
| 2 | 45 | Desnaturalización | 95 | 0.15 | |
| | | Alineamiento | 60 | 0.15 | |
| | | Extensión | 72 | 0.45 | |
| 3 | 1 | Extensión final | 72 | 0.45 | |

Visualización de PCR en tejido de *L. vannamei*

Se mezcló en un parafilm 2µl de marcador molecular o escalera de 1200 pares de bases (DNA Ladder Promega Corp.) mezclado con 5µl de Buffer de carga (Loading dye Promega Corp.), esta mezcla se

inyectó en un gel de agarosa y puesto 90 Volts, durante 40 min en una fuente de poder de la marca Power station 300; posteriormente el gel con cada muestra se colocó en un transiluminador con radiación UV para observar las amplificaciones y realizar una toma fotográfica.

Cada par de cebadores se amplifica a ciertos pares de bases específicos para cada *Vibrio* spp., los cuales se comparan con el marcador molecular del mismo gel, para identificar la presencia del gen en cada muestra, como se muestra en la figura 10.

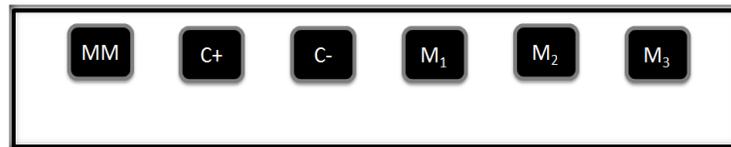


Figura 10. Orden de inyección de las mezclas de PCR en el gel de agarosa. Marcador molecular (M.M.) control positivo (+), control negativo (-), muestra (M₁, M₂, M₃, M₄...)

RESULTADOS

Análisis clínico de *L. vannamei* de ambas UPC.

Durante el examen clínico que se realizó a cada uno de los 60 organismos, se observó si presentaban alguna de las características del listado para el diagnóstico de camarones presuntamente enfermos. En la figura 8 se muestra un camarón colectado al azar en la UPC 1. Estos tenían las siguientes características: color traslucido al tacto, no presenta ninguna anomalía, al igual que no tenía heridas los organismos, como se muestra en la figura 11.



Figura 11. Camarón colectado de la UPC1.

Se determino que no presentaban ninguna de estas características al realizar la revisión, dando como diagnóstico presuntivo que los camarones son sanos, lo que se muestra en la tabla 8 y 9, este resultado se debe complementar con la prueba de PCR en laboratorio.

Tabla 8. Resultados del análisis clínico de *L. vannamei* en la UPC 1

| Unidad de Producción Camaronícola 1 | | | |
|--|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Mes | % Población Afectada | Tipo de Enfermedad | Grado de Severidad |
| Febrero | 0 | Ninguna | 0 |
| Mayo | 0 | Ninguna | 0 |

Tabla 9. Resultados del análisis clínico de *L. vannamei* en la UPC 2

| Unidad de Producción Camaronícola 2 | | | |
|--|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Mes | % Población Afectada | Tipo de Enfermedad | Grado de Severidad |
| Febrero | 0 | Ninguna | 0 |
| Mayo | 0 | Ninguna | 0 |

Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de las UPC del estado de Tabasco

Se monitoreo la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH por periodos de 24 hrs.



Figura 12. Toma de muestras con multiparámetro marca Hanna HI 95928.

En la UPC1 la temperatura promedio registrada fue de 23°C, la más alta de 26°C y la más baja de 22°C; la salinidad fue de 5 ups al comienzo del cultivo y de 31 ups al final; el pH se mantuvo constante con niveles de 7, mientras que la concentración de oxígeno disuelto promedio fue de 4.5 mg/L, el valor más alto fue de 5.6 mg/L registrado a las 16:00 horas, mientras que el nivel más crítico se registró a las 03:00 horas como se muestra en la Figura 13.

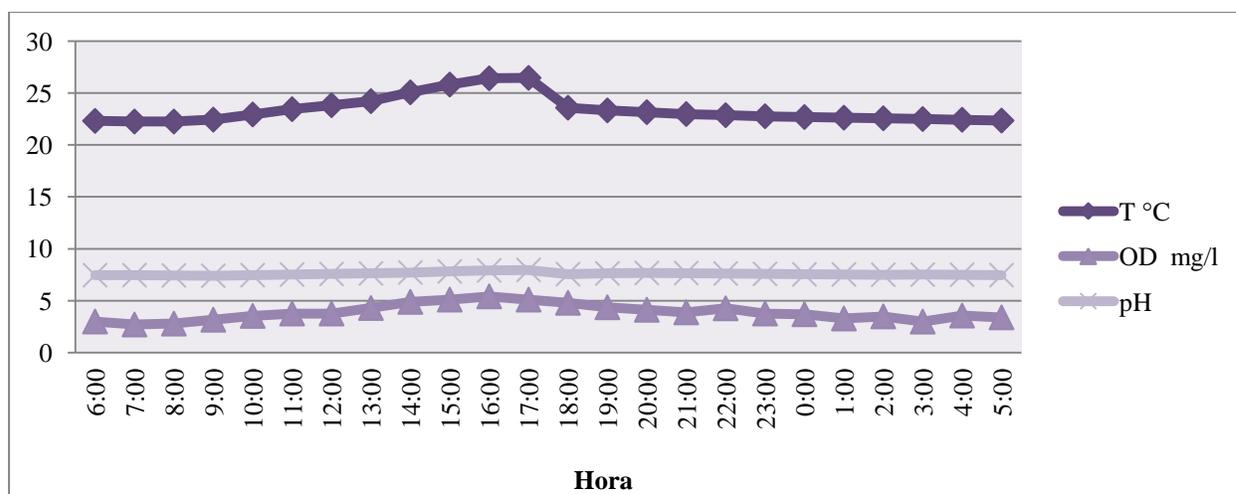


Figura 13. Resultados del monitoreo de los parámetros fisicoquímicos en un ciclo de cultivo de *L. vannamei* en la UPC 1

Resultados del monitoreo en la UPC2 demostraron que la temperatura promedio fue de 26°C, la más alta de 28°C y la más baja de 24°C; la salinidad se mantuvo con niveles de 9-32‰ durante el desarrollo del cultivo; el pH registro nivel máximo de 8 y mínimo de 7; el nivel de oxígeno disuelto promedio fue de 5.2, el más alto fue de 7 mg/L registrado a las 15:00 horas, mientras que el nivel más crítico se registró a las 05:00 horas que se observa en la Figura 14.

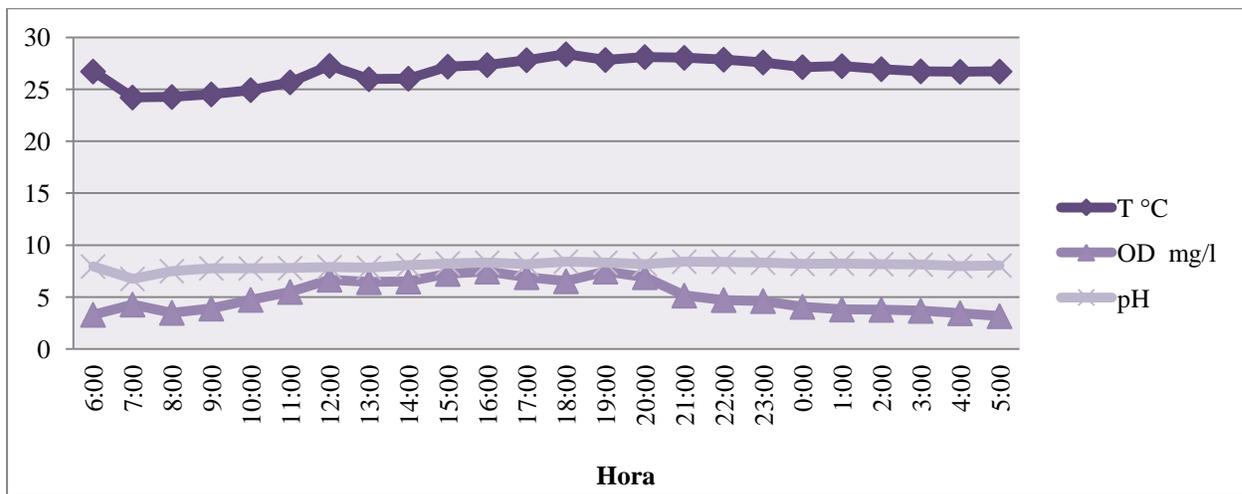


Figura 14. Resultados del monitoreo de los parámetros fisicoquímicos en un ciclo de cultivo de *L. vannamei*. UPC 2

En general todos los parámetros se encontraron dentro de los niveles óptimos para el crecimiento; Sin embargo, los niveles de temperatura y oxígeno disuelto fueron mayores en la UPC2; los niveles de salinidad fueron diferentes debido a que los cultivos no se iniciaron en la misma fecha, ya que la temporalidad del cultivo es separado solo por el tiempo de preparación del estanque entre ciclo y ciclo, la siembra se realizara en forma escalonada, con un periodo máximo de 30 días de diferencia entre cada siembra, mientras que el pH se mantuvo constante en las dos UPC representados en la Figura 15.

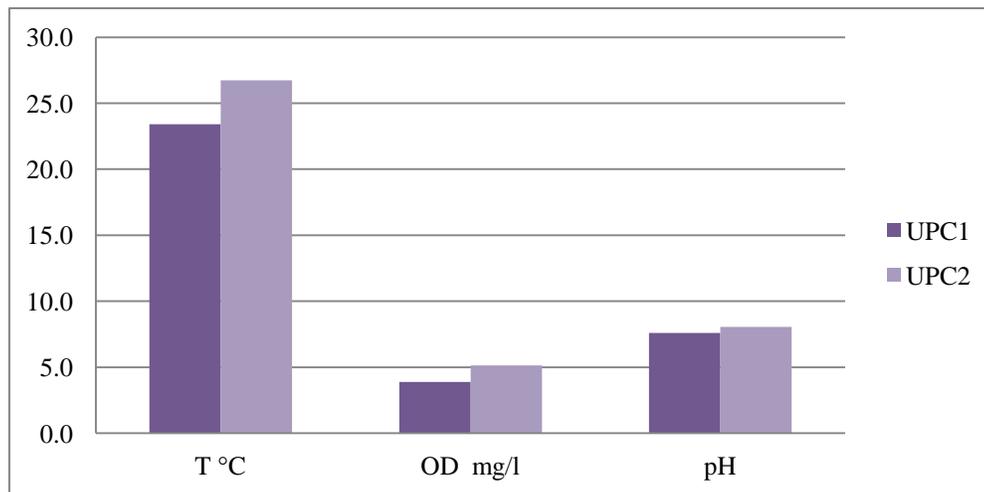


Figura 15. Resultado general del monitoreo de los parámetros fisicoquímicos en un ciclo de cultivo de *L. vannamei* en ambas UPC del Edo., de Tabasco.

Identificación de *Vibrio* spp., presente en cultivos de camarón *L. vannamei*

Los resultados generales del presente estudio revelan que de las muestras analizadas de tejido de camarón (n=60) de las unidades productoras del estado de Tabasco, indican la presencia positiva de bacterias del genero *Vibrio parahaemolyticus*, y ausencia para *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*, con presencia de un 65% de los treinta en el estanque 1 como lo muestra la figura 16 en una etapa del cultivo comprendido de febrero-mayo 2014.

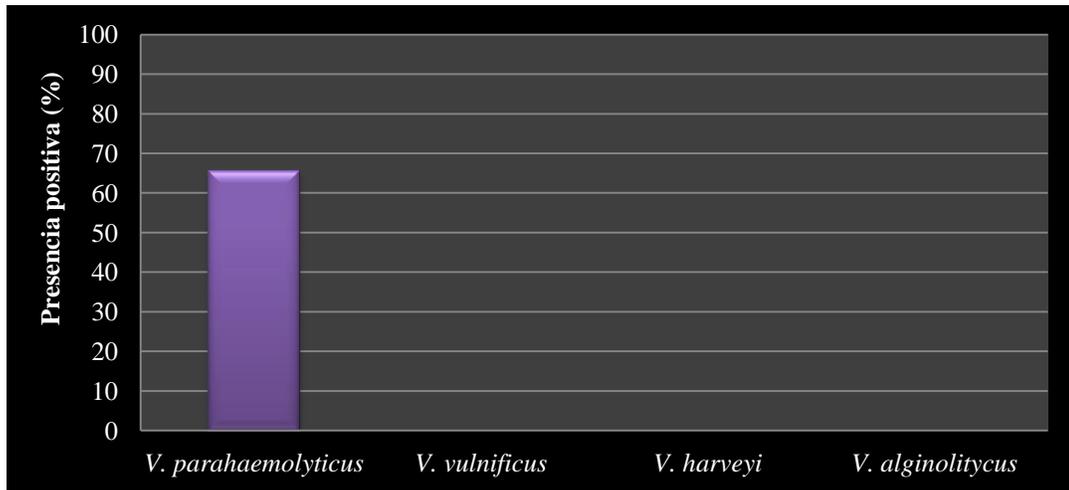


Figura 16. Presencia positiva de bacterias del genero *Vibrio* en tejido de camarón de la UPC 1

Mientras que para el estanque 2 hay presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en un 58% de los 30 organismos examinados de éste mismo estanque, como se muestra en la figura 17.

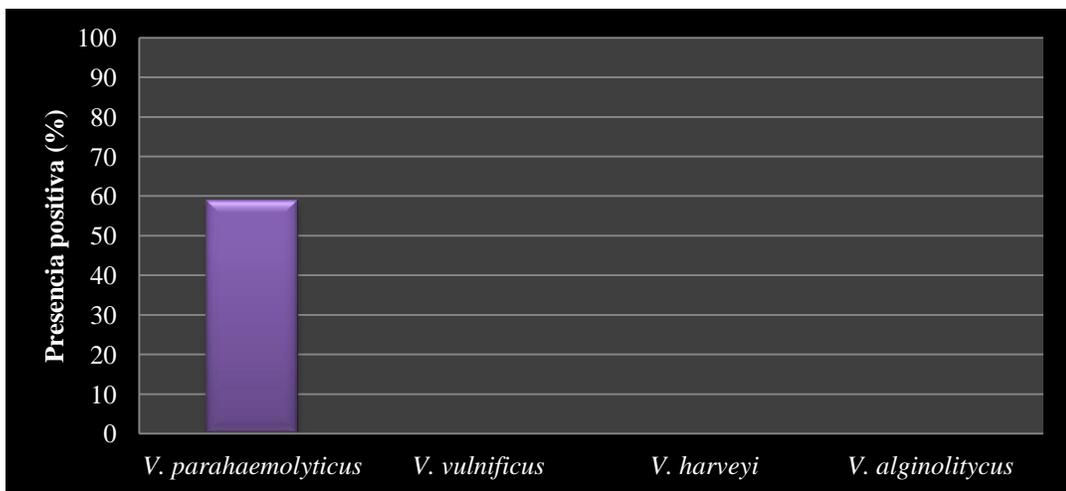


Figura 17. Presencia positiva de bacterias el género *Vibrio* en tejidos de camarón de la UPC 2.

La detección de *Vibrio* por medio de la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) dio como resultado para *Virio vulnificus* su nula presencia, como se observa en la Figura 18, donde se corre a 1000

pb y para *V. vulnificus* corre a 205 pb con primer Vvh, ya que el marcador molecular y el control positivo fueron los únicos que corrieron.

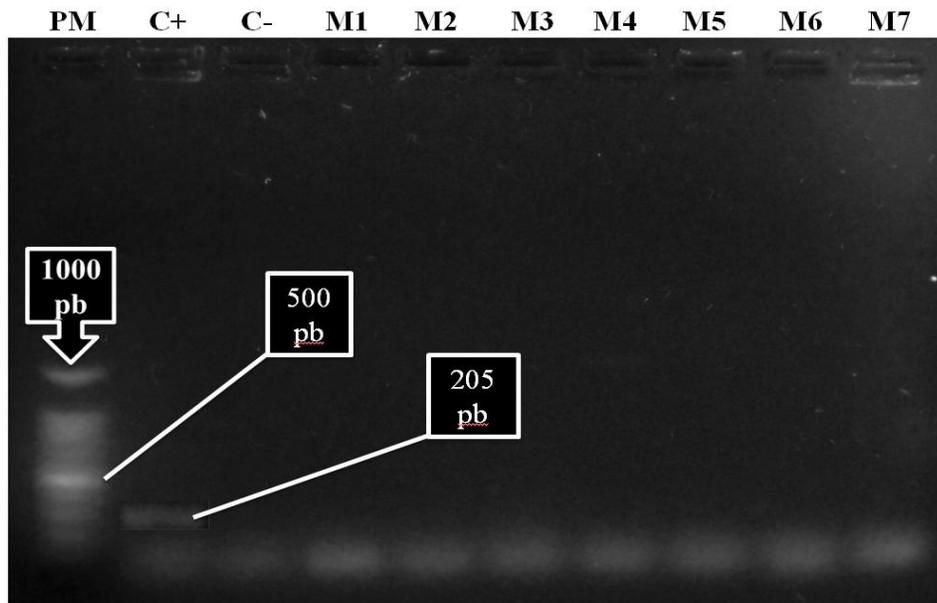


Figura 18. Amplificación correspondiente a *Vibrio vulnificus* con presencia negativa en tejido de camarón.

Para *Virio parahaemolyticus* se observa en la figura 19 la presencia de la bacteria en ambas UP donde el marcador molecular corre hasta 1000pb y en específico para *V. parahaemolyticus* es hasta los 450 pb y todas las muestras corrieron hasta los 450p con el primer es L-TLH.

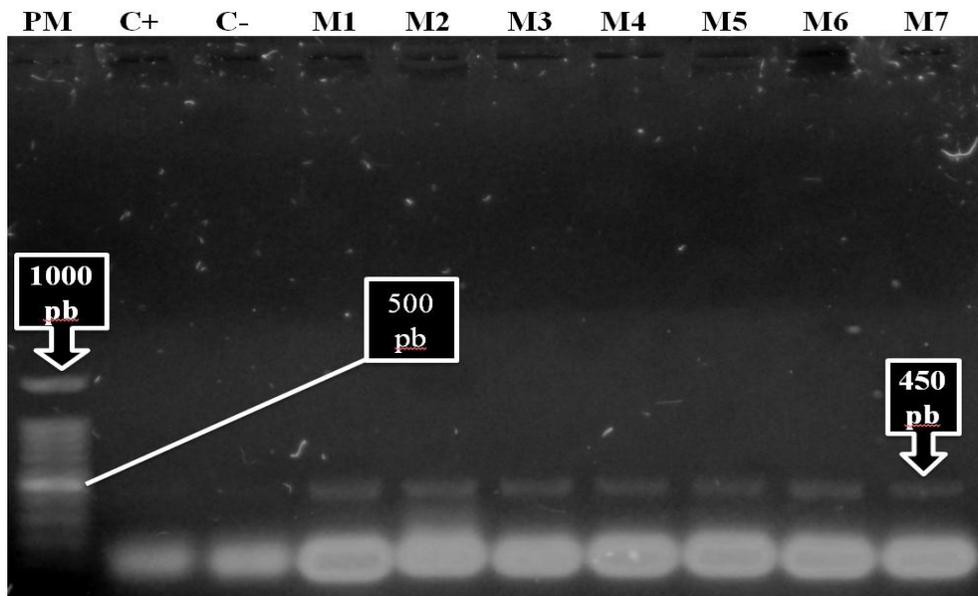


Figura 19. Amplificación correspondiente a la bacteria de *Vibrio parahaemolyticus* con presencia positiva en tejido de camarón de las UPC del Edo. Tabasco.

En *Virio harveyi* con el primer F-tox RF1 y llegando hasta 382pb no se detecta su presencia corriendo únicamente el control positivo de los pozos lo cual se muestra en la figura 20.

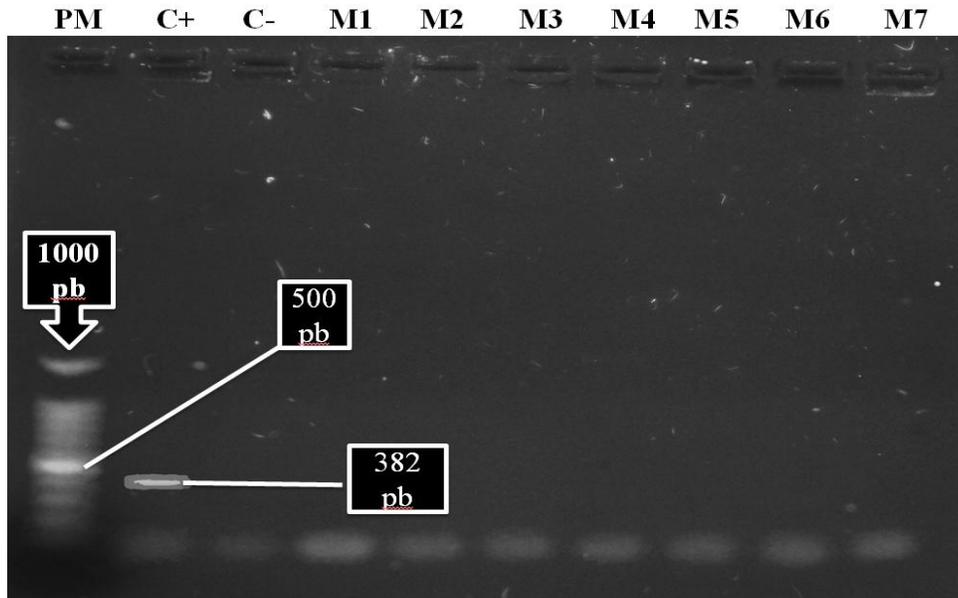


Figura 20. Ampliación correspondiente a la bacteria *Vibrio harveyi* con presencia negativa en tejido de camarón.

Y para *Virio alginolyticus* también fue nula su presencia en ambas UP, con un primer F-gyrB y llegando a los 382 pb se observa en la figura 21 que solo corre el control positivo de los pozos.

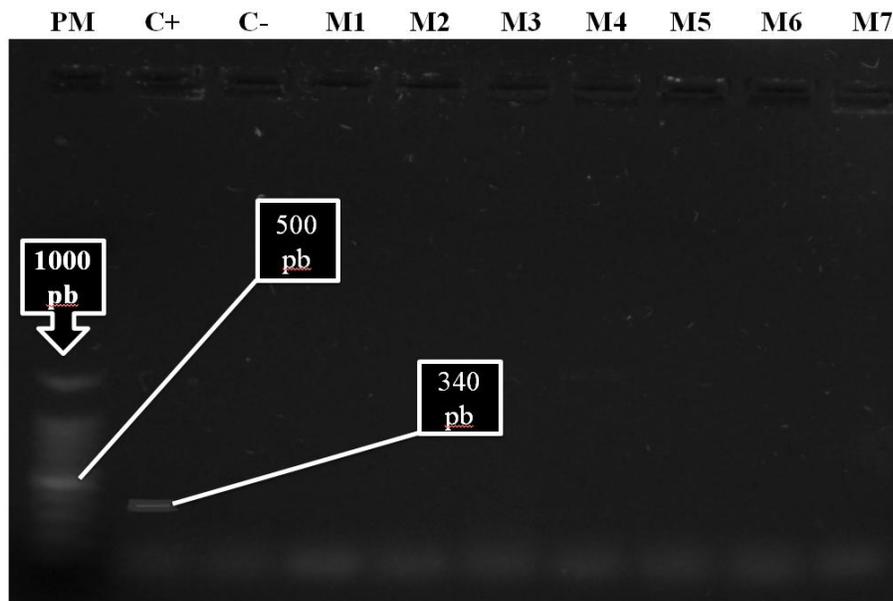


Figura 21. Ampliación correspondiente a las bacterias de *Vibrio alginolyticus* con presencia negativa en tejido de camarón.

Patógenos identificados en camarón durante el ciclo de cultivo.

Las bacterias que resultaron positivas en las unidades productoras de camarón, ubicadas en Cárdenas, Tabasco fue: *V. parahaemolyticus* (Tabla 10).

Tabla 10. Bacterias positivas y negativas en las UPC del Edo., de Tabasco.

| UPC | <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>V. vulnificus</i> | <i>V. harveyi</i> | <i>V. alginolitycus</i> |
|-----|----------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | + | - | - | - |
| 2 | + | - | - | - |

Con base a los resultados obtenidos de los análisis correspondientes se realizó la siguiente tabla comparativa donde se puede observar la relación existente entre el análisis clínico y el diagnóstico técnico-sanitario con la presencia de *Vibrio spp.* en las UPC del estado de Tabasco.

Existe un manejo de cultivo aceptable, ya que los factores críticos e importantes como lo es la preparación de estanque y manejo de la calidad del agua se realizan de una manera adecuada. Más sin embargo, existió la presencia de *V. parahaemolyticus* en las dos UPC, presentándose en un 66 y 58 % respectivamente del total de las muestras y es común encontrarla en cultivos de camarón.

DISCUSIÓN

Los Vibrios están presentes en el ecosistema marino puesto que juegan funciones importantes como biodegradación de la materia orgánica y regeneración de nutrientes, Cavallo y Stabili lo mencionan en el trabajo que realizaron en el 2004 y Vandenberghe en el 1999 concuerda y agrega que es una de las bacterias más observadas durante el cultivo de camarón, puesto que al parecer las condiciones de los

estanques favorecen su proliferación. Muchas veces esto es por las malas prácticas llevadas a cabo por las Unidades Camaronícolas.

Aunque algunas especies de *Vibrio* son conocidas como patógenos de animales marinos en acuicultura, muchos investigadores revelan que los vibrios son miembros de la biota bacteriana normal para animales acuáticos de ambientes marinos, por lo que es normal su presencia en el tracto digestivo en de varias especies marinas concluyeron Urakawa y colaboradores en el 2006.

Newman en 2000 concluye que los camarones por el solo hecho de estar confinados a un espacio físico reducido sufren estrés, por lo cual se podría decir que siempre están susceptibles a cualquier enfermedad, además de que los parámetros físicos como la temperatura, el pH, la salinidad son factores que pueden afectar positiva o negativamente a las poblaciones de *Vibrio*, Abad-Rosales y colaboradores en el 2011 realizaron una revisión de artículos acerca de la interacción de factores físicos, químicos y biológicos en el cultivo de camarón, y concluyen que las enfermedades de los camarones peneidos de cultivo se atribuyen a un desequilibrio entre el hospedero, patógeno y medio ambiente, además de la posible influencia de factores de estrés abiótico y biótico sobre el establecimiento de enfermedades.

Saulnier y colaboradores en el 2000, realizaron un estudio donde no había signos de alguna enfermedad aparente, en los ejemplares que se examinaron, a demás mencionan que las enfermedades de *Vibrio* se consideran como secundarias, debido a que son patógenos oportunistas y que solo se producen en camarones inmunológicamente comprometidos. Las causas primarias podrían incluir otros agentes infecciosos como: la temperatura del agua, salinidad, presencia de patógenos adicionales, prácticas de manejo, factores de sensibilidad del huésped a la infección, como estados fisiológicos, (edad, muda). y/o genética, deficiencias nutricionales o intoxicación, entre otras.

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente con respecto a la sensibilidad de *Litopenaeus vannamei* de contraer alguna enfermedad ya sea por *Vibrio* o de diferente origen, los encargados en las Unidades Camaronícolas están revisando de manera constante los parámetros fisicoquímicos puesto que estos influyen en demasía sobre los organismos cultivados, dando como resultado un cultivo exitoso, ó puede llegar a la pérdida total del mismo, En la Camaronícola del presente estudio se toma la salinidad y pH diariamente una vez por día y dos veces por día la temperatura y oxígeno disuelto.

Mientras que para *V. parahaemolyticus* Hervio-Heath y colaboradores en el 2002 mencionan que el hábitat natural está en las aguas marinas costeras, especialmente los estuarios, las que representan su reservorio. Además que la población microbiana es afectada por los cambios en la temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y así como su asociación con animales marinos. La temperatura óptima para su desarrollo es entre 20 y 30° C, la que permite una mayor concentración de bacterias; bajo 20° C disminuye. La salinidad requerida es entre 5 y 30‰ (bacterias halofílicas), concentración que puede variar dependiendo de la temperatura ambiental y disponibilidad de nutrientes.

Como observamos en la tabla 11, en la primera fila tenemos los parámetros de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH, en la siguiente fila observamos los parámetros óptimos recomendables para el crecimiento de *Litopenaeus vannamei* el cual es recomendado en FIRA en el 2009, si estos se compararan con los datos obtenidos de los parámetros de la UPC 1 y UPC 2 se concluye que están dentro de lo recomendables, sin embargo los rangos óptimos para *Vibrio parahaemolyticus* es bastante amplio como lo menciona Hervio-Heath et. al; 2002 y ya que de manera general *Vibrio spp.* es una bacteria sumamente versátil para lograr su supervivencia, por ésta razón se encontró en los camarones que se utilizaron para el presente estudio con un 66% en la UPC 1 y 58 % en la UPC 2.

Tabla 11. Comparación de parámetros fisicoquímicos ideales para *Litopenaeus vannamei*, los parámetros fisicoquímicos ideales para *Vibrio parahaemolyticus*, y los parámetros fisicoquímicos de la UPC1 y UPC2.

| Parámetro | Rango óptimo para <i>Litopenaeus vannamei</i> | Rango óptimo para <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | UPC 1 | UPC 2 |
|--------------------|--|---|--------------|--------------|
| Temperatura | 18-32 °C | 20-≥30 | 22-26 °C | 24-28 °C |
| OD | 3-9 mg/L | ----- | 4.5-5.6 mg/L | 5.2-7 mg/L |
| Salinidad | 15-35 ups | ----- | 5-31 ups | 9-38 ups |
| pH | 7.2-8.2 | ----- | 7-8 | 7-8 |

Gómez-Gil en conjunto con sus colaboradores en 1998 realizaron un estudio a pesar de no haber sintomatología fenotípica por parte de los organismos, al igual que en el presente estudio donde no había reporte de enfermedades y tampoco de manera aparente, sin embargo, presentaron síntomas de alguna enfermedad al momento del estudio en el cual se tomaron muestras de hepatopáncreas, estomago, intestino y hemolinfa de *P. vannamei* juveniles y en las tres áreas del tracto digestivo se detectó la

presencia de *Vibrio spp.*, y también Gómez-Gil y colaboradores en el 2011 reportaron la presencia de especies *Vibrio* en la hemolinfa de camarones, la cual podría detectarse con las siguientes características: nado letárgico sobre las orillas del estanque, altas mortalidades por anorexia y expansión de cromatóforos (coloración rojiza) en los camarones saludables.

Por esta razón en la acuicultura a nivel internacional se emplean el uso de antimicrobianos, por ejemplo en nuestro país los plaguicidas organofosforados son ampliamente utilizados en Sinaloa, donde existen grandes extensiones agrícolas cuyos residuos son generalmente drenados a lagunas costeras y esteros, las cuales son la fuente de abastecimiento de agua para la mayoría de las granjas camaronícolas (Abad-Rosales *et al.*, 2011). Mientras que Santiago y colaboradores en el 2009 mencionan que los antibióticos no se deben utilizar como medida preventiva, ya que las bacterias desarrollan resistencia a ellos de una manera muy rápida, provocando su ineficiencia, a lo que concluyen que la aplicación de agentes químicos solo debe hacerse si existe un diagnóstico adecuado de la situación y siempre bajo protocolos de control previamente establecidos. Por su parte Álvarez y colaboradores en 2001 concuerdan que el uso incontrolado de medicamentos ha traído gran preocupación por la aparición de cepas bacterianas resistentes a uno o más antimicrobianos, y a la presencia de residuos de estos compuestos en el ambiente acuático y en las partes comestibles de diversos organismos acuáticos. Concluyen que es muy importante realizar estudios destinados a encontrar vías alternas al control de las enfermedades bacterianas a través del uso de los antimicrobianos y uno de los métodos pudiera ser la aplicación de vacunas y el empleo de agentes terapéuticos que eviten o reduzcan la resistencia a dichas enfermedades.

Lo que hace a los Vibrios una bacteria peligrosa para la salud del hombre y la economía de las unidades camaronícolas es la rapidez con la que se propaga como lo menciona González en 2003 quien registró distintos acontecimientos de bacterias del genero *Vibrio* que provocaron mortalidad de camarones *Litopenaeus vannamei* en granjas del estado de Sonora, México; generando grandes pérdidas económicas puesto que se propagó a gran escala, e impacto en el mismo año a nivel mundial generando escases de este producto y como consecuencia elevados precios.

Debido a lo ocurrido en las granjas acuícolas en Sonora hace importante el desarrollo de métodos rápidos y eficaces en la detección de Vibrios, concluyendo que la técnica de PCR es un método adecuado y eficaz; lo que reduce el tiempo de diagnóstico por los métodos microbiológicos oficiales de 15 días a 28 horas con la PCR (Pérez, 2003) para obtener los resultados y a las Unidades Camaronícolas

el realizar una constante revisión para evitar pérdidas catastróficas tanto de organismos, como de insumos que a la larga se concentran en pérdidas económicas, de tiempo y de inversión en el trabajo del personal encargado del centro de producción.

Para el humano, este microorganismo causa gastroenteritis y los síntomas que se presentan son dolor abdominal severo, náusea, vómito, fiebre, dolor de cabeza y diarrea, la cual persiste hasta ocho días, en casos severos la diarrea es acuosa con moco y sangre, y pueden presentarse cuadros de deshidratación, hipotensión y acidosis. La dosis infectiva es de 10^5 a 10^7 UFC (Unidades Formadoras de Colonias), el periodo de incubación es de 12-24 horas.

En el 2003 reportó Ramírez la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras que tomó en agua, ostión y sedimento en la Laguna de Mecoacán, Tabasco y concluyó que el aislamiento de *Vibrio*, con potencial patógeno en la laguna, lleva a la necesidad de realizar estudios constantes de vigilancia epidemiológica, siempre que se tengan cultivos para producción de camarón. Esta bacteria ha provocado grandes pérdidas económicas no tan solo en la República Mexicana sino también en China, Malasia, Tailandia y Viet Nam según lo reporto la FAO en el 2014.

Por otra parte también se debe considerar la sanitización en el manejo del camarón ya durante el mercadeo, puesto que Franco-Monsreal y colaboradores en el 2010 durante su investigación concluyeron que el haber encontrado alimento marino parcialmente cocido con calor y completamente cocido con calor, contaminado con especies del género *Vibrio*, lo cual permite suponer la existencia de manipuladores de alimentos portadores asintomáticos.

Sin embargo, en la Unidad Camaronícola donde se realizó el presente estudio no se ha reportado ninguna enfermedad a pesar de que no se emplean antibióticos de prevención y los resultados del análisis clínico demostraron que en el 100 % de la población evaluada no se presentaron manifestaciones características de alguna enfermedad. Pese a que en la zona de Tabasco en otras Unidades Camaronícolas aledañas había reportes de pérdida de los cultivos por camarones infectados por *Vibrio harveyi* y *V. parahaemolyticus*, aunado al hecho de que no hay la cultura de la prevención y laboratorios que monitoreen constantemente las unidades.

CONCLUSIÓN

Registros de temperatura de 22°C – 26°C, salinidad de 5 a 31 ups, oxígeno disuelto de 4.5 a 5.6 mg/L y pH de 7 para la UPC I. Mientras que para la UPC II se registró una temperatura de 24°C - 28°C, salinidad de 9 – 38 ups, oxígeno disuelto 5.2 – 7 mg/L y un pH de 7 – 8, que entran dentro de lo ideal para el crecimiento de *Litopenaeus vannamei*, sin embargo la capacidad de *Vibrio* para sobrevivir a Temperaturas $20 \geq$, niveles de salinidad de gran amplitud de variación al igual que el oxígeno disuelto y pH está presente en sistemas ácidos y se ajusta a niveles básicos, sin embargo en esta unidad camaronícola solo hay presencia de un *Vibrio*.

Se detectó únicamente la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* por la técnica de PCR en ambas Unidades

Con la técnica de PCR es rápida y muy sensible la detección de *Vibrio*

Es recomendable el realizar un conteo bacteriano, ya que la técnica de PCR detecta la presencia o ausencia, mas no la cantidad que excede los parámetros normales de *Vibrio* en *Litopenaeus vannamei*. Además de determinar si el agua que extraen de la Laguna El Pajonal es la que contiene *Vibrio parahaemolyticus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Rosales S. M., Betancourt-Lozano M., Vargas-Albores F., Roque A. 2011. Interacción de factores físicos, químicos y biológicos en el cultivo de camarón pp. 151-164. En: Ruiz-Luna, A., C. A. Berlanga-Robles y M. Betancourt-Lozano (Eds.). Avances en Acuicultura y Manejo Ambiental. Mazatlán. Trillas.
- Albuquerque, C., Cristina, S., Lima, A., Edirsana, M. R. y Regine, H. S. 2013. Microbiota of *Vibrio sp.* in the hepatopancreas of cultured white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Revista MVZ Córdoba, 18(2), 3439-3443.
- Allsopp, M., Johnston P., Santillo D. 2008. La industria acuícola y de engorde: Un reto de sostenibilidad. Greenpeace Internacional. Ámsterdam, The Netherlands. 24p.
- Álvarez J. D., Austín B., Álvarez A. M., y Agurto C. P. 2001. Resistencia a los antimicrobianos de vibrios aislados de peces y camarones marinos en Venezuela. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, 11(2), 139-14.
- Barba-Macías. E., Melgar C. E. y Juárez J. F. 2009. Manual para el uso de la Tecnología EM en granjas de tilapia en Tabasco. 1ª. ed. El Colegio de la Frontera Sur. Villahermosa, Tabasco, México. 37p.
- Bej, A. K., Patterson D. P., Brasher C. W., Vickery M. C., Jones D. D., Kaysner C. A. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Methods 36, 215–225.
- Brasher C. W, De Paola A, Jones D. D., Bej A, K. 1998. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. Cur. Microb. 37: 101-107.
- Cavallo R. A., y Stabili. L. 2004. Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). Sci. Mar. 68:23–29.
- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B.L., Hughson F. M. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. Nature, 415: 545–549
- Curtis H. y Schnek A. 2008. Biología Curtis. Séptima edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid España. 276p.
- Dalsgaard A. 1998. The occurrence of human pathogenic *Vibrio spp.* and *Salmonella* in aquaculture. International Journal of Food Science and Technology, 33: 127-138.

- Davis D. A., Samocha T. M. y Boyd C. E. 2004. Acclimating Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to inland low-salinity waters. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publication No 2601.
- Delgado G. 2005. Análisis Molecular de cepas de *Vibrio Cholerae*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 106p.
- De Walt B. R., Ramírez Z. J. R., Noriega L. y González R. E., 2002. Shrimp aquaculture, the people and the environment in coastal Mexico. Report prepared under World Bank, NACA, WWF y FAO. Consortium program on shrimp farming and the environment. Work in Progress for Public Discussion. 73 p
- Diario Oficial. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2010, Segunda Sección
- Evaluación de riesgos de *Vibrio spp.* en pescados y mariscos <http://www.fao.org/docrep/008/y8145s/y8145s08.htm>, Fecha de consulta: 15-03-2015
- Eiler A. C., González-Rey, S. A., S. Bertilsson. 2007. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Ecology 60(3): 411-418.
- FAO, 2014. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura, El estado Mundial de la Pesca y la acuicultura oportunidades y desafíos (SOFIA). 253p.
- Franco-Monsreal J., Zarza-García A. L., Villa-Ruano N., Ramón-Canul L. G., Galván-Valencia O. T., Meza-Jiménez M. de L. y Mota-Magaña L. 2010. Especies patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos de establecimientos de Isla del Carmen, Campeche, México. Ciencia y Mar, XIV (40): 31-44.
- Gillett R. 2010. Estudio mundial sobre las pesquerías del camarón. FAO documento técnico de pesca Núm. 475. Roma.
- Guerrero-Olazarán E., Cab-Barrera E. L., Galán-Wong L. J., Viader-Salvadó J. M. 2004. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. En: Cruz S.L.E., Ricque M. D., Nieto L.M.G., Villarreal D., Scholz U., González M. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora. México. 16-19: 419
- González, A. 2003. Diagnóstico de evaluación técnica. Asistencia Técnica para la Elaboración de Diagnóstico. Junta local, La Atanasia. Sonora México.
- Gómez-Gil, B., Fajer-Avila E., Pascual J., Macián M.C., Pujalte M.J., Garay E., Roque A. 2008. *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiological 58:1621-1624

- Gomez-Gil B., Roque A., y Soto-Rodríguez S. 2011. Vibriosis en camarones y su diagnóstico. pp. 137-150. En: Avances en Acuicultura y Manejo Ambiental. Ruiz A., Berlanga C., Betancourt-Lozano M. (eds). Editorial Trillas, México.
- Gomez- Gil B., Tron-Mayén L., Roque A., Turnbull J. F., Inglis V., Guerra-Flores A. L., 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1-9.
- Hernández C., Ulloa J., Vergara J. A., Espejo R. y Cabello F. 2005. Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. *Revista Médica de Chile* 133: 1081-1088.
- Hervio-Heath D, Colwell R, Derrien A, RobertPillot A, Fournier J M, Pommeuy M. 2002;Ocurrence of pathogenic vibrios in the coastal areas of France. *J Appl Microbiol* 92: 1123-35.
- Ibarra-Gámez, J. C., Galavíz-Silva, L., y Molina-Garza, Z. J. 2007. Distribución de la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, en México. *Ciencias marinas* 33(1): 1-9.
- Ingraham J. L. e Ingraham C. A. 1998. Introducción a la microbiología. Ed. Reverte. España. 4p
- Leyton Y. y Riquelme C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 441-456.
- Leyva-Castillo V., Puig Y., Espino M., Pereda G., Aportela N. 2013. Especies patógenas de *Vibrio* aisladas en alimentos de origen marino. *Revista Panamericana de Infectología e Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA)*, La Habana, Cuba 15(1-4):25-32
- Lightner, D. V. y Pantoja C. R., 2009. Manual para el diagnóstico de enfermedades del camarón. United States Department of Agriculture. Programa de Reconstrucción Huracán Match. 92p
- Lightner, D. V. 1996a. Diagnostic procedures for diseases in shrimp. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society* 1-220.
- Martínez-Córdova L.R., Martínez M. y Cortés J. 2009. Camaronicultura Mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25 (3):181-196
- Morales, M. S. 2004. Enfermedades del Camarón detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas. Octubre. 122 p.

- Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel. 2008. Guía Técnica-Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.
- Morales M., Ruiz A., Pereira A., Solís V. y Conroy G. 2011. Prevalencia de Enfermedades de Camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia 21(5): 434-446.
- Newman S. 2000. Prevención de enfermedades del camarón de cultivo. Panorama Acuícola. Vol. Noviembre-diciembre. Pág. 22-23.
- Pang L., Zhang X.-H., Zhong Y., Chen J., Li Y., Austin B. 2006. Identification of *Vibrio harveyi* Using PCR Amplification of the *toxR* Gene. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 43: 249–255
- Panicker G., Call D. R., Krug M. J., Bej A. K., 2004. Detection of Pathogenic *Vibrio spp.* in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. Applied and Environmental Microbiology. 70(12): 7436–7444
- Pérez C. L. B. 2003. Determinación de *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae* O1 en Camarón para exportación procedente de Zonas Marítimas del Noroeste de México con la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Trabajo para optar por el Grado de Maestra en Ciencias. De la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia División de Estudios de Posgrado en la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ramírez P. M. 2003. Frecuencia de aislamiento de *Vibrio spp*; en muestras de agua, ostión y sedimento en la Laguna de Mecoacán, Tabasco; México. Trabajo para optar por el título Maestría en Ecología y Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez-Camacho, J.C., Méndez-Gómez, E., Rivas-Montaña, A.M., Cortés-Ruiz, J.A. 2014. Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. Revista Bio Ciencias. 2(4): 282-292.
- Santiago H. M. L., Espinosa P. A., Bermúdez A. M. C. 2009. Uso de Antibióticos en la camaronicultura. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 40(3):22-32.
- Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P., Ansquer D. 2000. Experimental infection models for shrimp Vibriosis studies: a review. Aquaculture 191: 133–144.
- Schlegel H. G. y Zaborosch C. 1997. Microbiología General. Nueva edición. Ed, Omega S. A. Barcelona; 654p.

- Thompson J.R., M.A. Randa, L.A. Marcelino, A. Tomita-Mitchell, E. Lim y M.F. Polz. 2004. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4103-4110.
- Thompson J. R. y Polz M. F. 2006. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*, 13: 190-203. ASM Press, Washington DC.
- Trujillo, T., Aguirre, G., Sánchez, G., y Rabago, J. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrios* *sp.* en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Ciencia y Mar.* IX (27), 11-18.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2007. *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana. México D. F. 4p.
- Urakawa H. y Rivera I. N. 2006. Aquatic environment. *The biology of vibrios*, 12: 175-189. ASM Press, Washington DC.
- Vandenberghe J., Verdonck L., Robles R., Rivera G., Bollard A., Balladares M., Gomez B., Calderón J., Sorgeloss P. y Swings J. 1999. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larve, Postlarve, Broodstock, and Hatchery Probiotics. *Applied Environmental Microbiology* vol. 65 p 2592-2597.
- Watnick P. L., Lauriano C. M., Klose K. E., Croal L. y Kolter R. 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology* 39: 223-235.
- Worden A. Z., Seidel M., Smriga S., Wick A., Malfatti F., Bartlett D. y Azam F. 2006. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environmental Microbiology* 8: 21-29.
- Woese, Carl. 1967. *The Genetic Code: the Molecular Basis for Genetic Expression*. New York: Harper & Row. OCLC 29369

ANEXOS

Anexo 1: Método para la extracción de ADN de tejido animal.

(Kit de extracción de ADN Promega.)

Preparación de las muestras

1. Pesar aproximadamente 10-20 mg de tejido, se macera en un mortero y se coloca en un tubo Eppendorf limpio y estéril de 1.5 mL

Lisis celular

2. Adicionar en el tubo Eppendorf 600 µl de amortiguador (solución de lisado) y 20 µl de proteinasa k (20 mg/mL).
3. Incubar a baño maría durante un periodo de tres horas a 55 °C (Cada hora agitar en vortex hasta que el tejido este completamente lisado).
4. Adicionar en el tubo Eppendorf 3µl de RNAsa a la muestra e incubar a 37 °C durante 15-30 minutos.

Precipitación de proteínas

5. Adicionar en el tubo Eppendorf 200 µl de amortiguador (solución precipitadora de proteína) a la muestra. Agitar con el vortex durante 20 segundos, posteriormente sumergir completamente el tubo en escarcha durante 10 minutos.
6. Centrifugar durante cinco minutos a 16,000 rpm, donde el precipitado proteínico forma un pellet de color blanco.

Precipitación de ADN y rehidratación

7. Recuperar el sobrenadante (este contiene el ADN), cuidadosamente con una pipeta tratando de no tomar el precipitado. Transferir 600 µl del sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL
8. Añadir 600 µl de isopropanol, suspender cinco veces suavemente, invirtiendo el tubo, (el ADN puede ser observado a contraluz como delgados filamentos blancos).
9. Centrifugar durante un minuto a 13,000-16,000 rpm, cuidadosamente decantar el sobrenadante (el precipitado es el ADN).
10. Añadir 600 µl de etanol al 70%, mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces. Centrifugar durante un minuto a 13,000-16,000 rpm.

11. Cuidadosamente aspirar el etanol con una pipeta de 1,000 μL , invertir el tubo sobre un papel limpio absorbente hasta que el pellet este completamente seco.
12. Añadir 100 μL de amortiguador rehidratación (TE) incubar a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante una hora, enfriar a temperatura ambiente. Almacenar el ADN a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta usarse.

Anexo 2. PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA

Materiales

- Cámara de electroforesis horizontal y accesorios
- Agarosa al 2%
- Buffer TAE 50 X (MÉTODO 1)
- Bromuro de etilo

Nota: Para la preparación del gel es importante ensamblar la cámara de electroforesis ubicándola sobre una superficie totalmente plana y nivelada asegurando que no presente algún tipo de declive. Es importante asegurarse de usar guantes durante la manipulación de las soluciones.

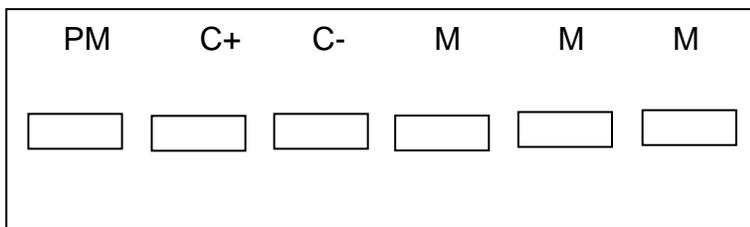
Gel de agarosa 0.8%

1. Disolver 0.8 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1x, homogenizar y disolverlo en el horno de microondas durante 2 minutos.
2. Agregar 3 μL de bromuro de etilo por cada 100 mL de agarosa preparada. (dejar reposar un momento hasta que alcance una temperatura entre 50 $^{\circ}\text{C}$ y 60 $^{\circ}\text{C}$).
3. Verter el gel en la cámara de electroforesis, asegurándose de tener debidamente insertado los peines que formarán los pocillos (dejar enfriar por espacio de 20 minutos).
4. Adicionar buffer TAE 1X entre 0,5 y 1 cm por encima del gel, para posteriormente empezar a inyectar las muestras en los pocillos.

Nota: Para la visualización del producto de PCR se recomienda utilizar agarosa al 2% (2g en 100 mL de buffer TEA 1X).

Inyección de muestras

1. Mezclar sobre parafilm el producto de PCR y el cargador (Load Dye) a una relación 1:5
2. Inyectar la muestra en cada pozo de acuerdo al siguiente orden:



PM: peso molecular

C+: Control positivo

C-: Control negativo

M: Muestras

Nota: Dejar correr las muestras en la cámara de electroforesis a 90 V durante 40 minutos o el tiempo que la muestra cubra casi en su totalidad el gel.

Anexo 3: PREPARACIÓN DE BUFFER TAE 1X

1.- PREPARACIÓN DE TAE A 1X

a) Preparación de buffer de solución stock Tris-ácido acético y EDTA (TAE) 50X se disuelven los reactivos de la tabla y se afora a 1L con agua bidestilada, ajustando el pH a 8,0.

| Reactivos | Cantidad | Concentración final |
|-----------------------|----------|---------------------|
| Tris base | 242 g | 1,9 M |
| Ácido acético glacial | 57.1 mL | 57.1 % |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 100 mL | 0,05 M |

b) Solución de 100 mL de EDTA 0.5 M, para preparar se utiliza la siguiente fórmula:

Peso= Molaridad (moles) x Peso molecular (g/mol) x Volumen de disolución (L)

Peso= 0,5 M x 372.24 g/mol x 0.1 L = 18.6 g

Por lo tanto para preparar una solución de 100 mL de EDTA 0.5 M diluir 18.61 g de EDTA en un volumen de 50 mL de agua bidestilada y se afora a 100 mL

c) Preparación de buffer TAE 1X a partir de una solución stock de TAE 50X

Tomando en cuenta los datos obtenemos que:

Volumen inicial 1 (V₁) =?

Concentración inicial 1 (C₁)= 50X

Volumen final 2 (V₁) = 500 mL

Concentración final 2 (C₂) = 1X

Se calcula el volumen de TAE 50 X:

Aplicando el siguiente factor de dilución: $V_1 C_1 = V_2 C_2$

y reemplazando los valores se tiene que: $V_1 (50X) = (500 \text{ mL}) (1X)$

Despejando $V_1 = \frac{500 \text{ ml } (1x)}{50x} \quad V_1 = 10 \text{ mL}$

Por lo tanto, para la preparación de buffer TAE 1X a partir de una solución stock de TAE 50X, se toma 10 mL de TAE 50X y se aforar hasta 500 mL con 490 mL de agua destilada.

2.- PROTEINASA K

Disolver el contenido del frasco de 100 mg en 10 mL de agua ultra pura

$$10 \text{ mg/mL} = 10 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

20 μl del contenido disuelto contiene = 200 μg de proteinasa K

3.-MEZCLA DE dNTPs

- | | | |
|----|---------------|---|
| 1. | Datp (100 Mm) | 5 |
| 2. | Dctp (100 Mm) | 5 |
| 3. | dGtp (100 Mm) | 5 |
| 4. | Dttp (100 Mm) | 5 |

$$\text{H}_2\text{O} \quad \frac{30}{50\mu\text{l}}$$

El mix de dNTPs que se utiliza en el PCR debe tener una concentración final de 10 Mm, por lo tanto, se calcula el volumen a utilizar de cada dNTPs para hacer la mezcla de dNTPs (100 Mm) si se desea preparar un mix de 50 μl con concentración de 10 Mm, por lo que se calcula con la siguiente fórmula:

Dilución: $V_1 C_1 = V_2 C_2$ $V_1 (100 \text{ Mm}) = (50 \text{ } \mu\text{l}) (10 \text{ Mm})$

Despejando V_1 tenemos que:

$$V_1 = \frac{(50 \text{ } \mu\text{l})(10 \text{ Mm})}{100 \text{ Mm}} = \frac{500\mu\text{l}/\text{Mm}}{100 \text{ Mm}} = 5\mu\text{l}$$

Por lo tanto se requiere 5 μl de cada dNTPs para preparar un mix de 50 μl con concentración de 10 Mm.

4.-HIDRATACIÓN DE PRIMERS O CEBADORES

Los primers o cebadores liofilizados que están en el Nmol se hidratan en agua ultra pura a una concentración de 100 μ M. [http:// www.Promega.com/biomath /](http://www.Promega.com/biomath/)

Anexo 4. VISUALIZACIÓN DE ADN

Para visualizar los resultados de la extracción de ADN se debe realizar una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%, de esta forma se corrobora el éxito de la extracción y la concentración aproximada de ADN que se tiene en el tubo (según la intensidad de la banda de ADN en el gel).

1. Para la preparación de 100 mL de agarosa se pesa 0.8 g de agarosa y se coloca en una botella de cristal de 500 mL con 100 mL de buffer TEA 1X. (Agitar suavemente para disolver y evitar que la agarosa se adhiera en las paredes del recipiente).
2. Calentar el recipiente con agarosa en el microondas durante aprox. 1 minuto (es importante no cerrar por completo la tapa del recipiente) y se retira una vez que empiece a hervir.
3. Inmediatamente agregar en la agarosa disuelta 2.5 μ l en bromuro de etilo (fluorocromo que se intercalará en los nucleótidos de ADN y que se excita con la luz ultravioleta y emite una luz de color naranja).
4. Una vez que la agarosa fundida se enfríe a 60 °C se vierte en la cámara de electroforesis colocando el peine, una vez la agarosa solidificada retirar el peine con cuidado.
5. Agregar Buffer TEA 1X a la cámara de electroforesis, hasta que cubra los pozos.
6. Inyectar las muestras de ADN en el gel agregando 5 μ l de la muestra de ADN extraídos con 2 μ l de buffer de carga.
7. Encender la fuente de poder a 90 V por aprox. 30 min. (A un menor voltaje se obtiene una mejor resolución de bandas, especialmente con fragmentos chicos).
8. Para la visualización de ADN colocar el gel sobre el transiluminador de la luz UV.