



**Universidad Autónoma de Baja
California**



Facultad de Ciencias Marinas

Identificación y caracterización de tres cepas de *Vibrio* spp.
potencialmente patógenas aisladas en sistemas de cultivo
cerrados de *Penaeus vannamei*.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOTECNÓLOGO EN ACUACULTURA

PRESENTA

Fernando Guadalupe Mata Torres.

Ensenada, Baja California, México. 09 de junio del 2022.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRES CEPAS DE *VIBRIO* SPP.
POTENCIALMENTE PATÓGENAS AISLADAS EN SISTEMAS DE CULTIVO
CERRADOS DE *PENAEUS VANNAMEI*.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOTECNÓLOGO EN ACUACULTURA

PRESENTA

FERNANDO GUADALUPE MATA TORRES.

Aprobada por:



Dra. Ivone Giffard Mena

Directora de tesis



Dra. Natalie Millán Aguiñaga

Sinodal



Dr. Samuel Sánchez Serrano

Sinodal

Dedicatoria

A mis padres, Yolanda y Jorge por ser mis pilares de vida, por amarme y enseñarme a fijar metas para cumplirlas, luchar por mis ideales, sin olvidarme de ser feliz y hacer lo que más me gusta. Siendo las personas que han estado en todos mis logros y fracasos, siempre enseñándome algo nuevo e inculcando valores basados en hechos. *LOS AMO*, porque gracias a ustedes soy el hombre que hoy presenta estas palabras y que dedica su vida a las ciencias del mar.

A mi hermano Karlo, por ser un ejemplo de superación y por ser la persona que me acompaña y cuidó en momentos difíciles, siempre viendo por mí.

A Elsa, por acompañarme desde el primer momento de mi formación profesional, por creer siempre en mí y en lo que hago, mostrándome su amor y siendo un ejemplo de que nunca hay que tener miedo.

A mis amigos, por ser los distractores necesarios para no perder mi enfoque.

Desde lo más profundo de mi corazón y de mi ser, se los digo:

¡MUCHAS GRACIAS!

“La cura para todo es siempre el agua salada; el sudor, las lágrimas y el mar”.

-Karen Blixen-.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California, en especial al Laboratorio de Biotecnología de Crustáceos de la Facultad de Ciencias Marinas, por el conocimiento brindado y los organismos facilitados de *Penaeus vannamei* para el desarrollo de esta investigación.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), al departamento de genómica funcional por el equipo facilitado para las pruebas moleculares realizadas en este trabajo.

Al departamento de Innovación Biomédica del Centro de Investigación Científica de Estudios Superiores de Ensenada (CICESE), por el equipo facilitado para analizar las laminillas histológicas en este trabajo.

A mi directora de tesis la Dra. Ivone Giffard Mena, por la confianza, el apoyo y la paciencia de ser mi guía en este proyecto. Por el tiempo dedicado, el conocimiento transmitido a través de la experiencia, con la constante orientación y su visión crítica.

A mis sinodales, por todo el tiempo y el conocimiento compartido, por el respeto, la confianza y la paciencia demostrada en todo momento.

A la Dra. Natalie Millán Aguiñaga, la guía y el conocimiento sobre el mundo de la microbiología y por el gusto transmitido hacia las bacterias.

Al Dr. Samuel Sánchez Serrano, por los consejos compartidos, los espacios brindados y, sobre todo, por transmitir el gusto hacia la histología y la perspectiva amplia de la acuicultura.

Gracias a mi comité de tesis afirmé mi pasión por la patología, mi total admiración y respeto hacia ustedes.

ÍNDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iv
Lista de figuras	vi
Lista de tablas	vii
Resumen	viii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Hipótesis.....	5
IV. Objetivo general	5
4.1. Objetivos específicos	5
V. Justificación	6
VI. Materiales y métodos	7
6.1. Toma de muestra y aislamiento de bacterias	8
6.2. Caracterización bacteriológica	9
6.3. Curvas de crecimiento bacterianas y conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) ..	10
6.4. Análisis bioquímico.....	10
6.5. Análisis molecular	11
6.5.1. Extracción de ADN.....	11
6.5.2. Amplificación del gen ARNr 16S por reacción en cadena de polimerasa (PCR)	12
6.5.3. Análisis filogenético.....	14
6.5.4. Extracción de plásmidos.....	14
6.6. Desafíos de patogenicidad	15
6.6.1. Obtención de organismos y diseño experimental	15
6.6.2. Generación de inóculo bacteriano y dosis de infección.....	16
6.6.3. Proceso de infección	16
6.6.4. Signología y daños.....	17
6.7. Análisis histológico	18
6.8. Análisis estadístico	18
VII. Resultados	19

7.1. Obtención y caracterización de bacterias	19
7.2. Curvas de crecimiento bacterianas	24
7.3. Análisis bioquímico.....	25
7.4. Extracción de ácidos nucleicos	26
7.5 Análisis filogenético.....	27
7.6. Mantenimiento de organismos en cultivo	29
7.7. Análisis de patogenicidad y signos clínicos	29
7.8. Comprobación de postulados de Koch.	34
7.9. Caracterización histológica.....	37
7.10. Mortalidad/Sobrevivencia.....	42
VIII. Discusión	46
IX. Conclusiones	53
X. Referencias.....	54
XI. Anexos.....	65

Lista de figuras

Figura 1. Secuencia de actividades para realizar la caracterización de bacterias patógenas y evaluación de su patogenicidad.....	7
Figura 2. Tres muestras de agua de mar del sistema de bombeo de la UBP, inoculadas en medio cromogénico HardyCHROM™ específico para bacterias del género <i>Vibrio</i>	20
Figura 3. Crecimiento y evaluación de iridiscencia de tres cepas en medio de cultivo general TSA al 2% de NaCl a las 24 horas de incubación.	22
Figura 4. Medición de las curvas de crecimiento de tres cepas de <i>Vibrio</i> spp en 48 horas por triplicado (n=3).....	24
Figura 5. Analisis moleculares de las tres cepas. A) Extracción de ADN, B) Amplificación del gen 16S, C) Extracción de plásmidos de tres cepas bacterianas.	26
Figura 6. Alineamiento de nucleótidos del gen 16S ARNr de las tres cepas bacterianas aisladas.	27
Figura 7. Árbol filogenético de <i>Vibrio</i> spp.	28
Figura 8. Daños externos registrados en <i>P. vannamei</i> desafiados a tres diferentes concentraciones del inóculo de la cepa verde.....	32
Figura 9. Daños presentados en telson y urópodos de <i>P. vannamei</i> desafiado con la cepa verde a una dilución alta.	33
Figura 10. Daños presentados en pereiópodos, pleópodos y urópodos de <i>P. vannamei</i> desafiado con la cepa verde a una dilución alta (1×10^5 ufc/mL).	33
Figura 11. Siembra de hemolinfa de <i>P. vannamei</i> desafiado con la cepa verde a una dilución muy alta (1×10^6 ufc/mL) durante 12 días.....	35
Figura 12. Siembra de hemolinfa de <i>P. vannamei</i> desafiado con la cepa verde a una dilución alta. (A) Camarón infectado con la cepa verde con daños evidentes característicos de la infección.	36
Figura 13. Histología de hepatopáncreas (HP) de <i>P. vannamei</i> desafiado con la cepa verde a una dilución alta durante cinco días.	37
Figura 14. Histología de hepatopáncreas (HP) de <i>P. vannamei</i> desafiados con la cepa verde en diferentes tiempos post infección.	38

Figura 15. Histología de hepatopáncreas (HP) de <i>P. vannamei</i> desafiado con la cepa verde en diferentes tiempos post infección.	39
Figura 16. Amplificación de un túbulo de hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> desafiado con una dilución alta de la cepa verde.	40
Figura 17. Amplificación de un túbulo de hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> desafiado con una dilución alta de la cepa verde.	41
Figura 18. Curvas de sobrevivencia de <i>P. vannamei</i> desafiado con las tres cepas de <i>Vibrio</i> spp. a una dosis muy alta.	42
Figura 19. Curva de sobrevivencia de <i>P. vannamei</i> desafiado con la cepa verde a tres diferentes dosis de experimentación.	44

Lista de tablas

Tabla 1. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por muestra.	13
Tabla 2. Gradiente de amplificación utilizado para PCR.	13
Tabla 3. Guía general para dar un valor numérico cualitativo de grado de severidad a la infección o enfermedad.	17
Tabla 4. Coloración de las colonias de las tres cepas en distintos medios específicos para bacterias del género <i>Vibrio</i>	23
Tabla 5. Perfiles bioquímicos de las tres cepas de <i>Vibrio</i>	25
Tabla 6. Peso y talla inicial-final de <i>Penaeus vannamei</i> mantenido a una salinidad de 20 ups durante cinco meses de cultivo.	29
Tabla 7. Clasificación de daños registrados durante el segundo desafío de infección con una cepa color verde a tres concentraciones diferentes en <i>P. vannamei</i> . MH, caldo de cultivo Mueller-Hinton.	30
Tabla 8. Comparación de la enfermedad del AHPND y la vibriosis generada por la cepa verde en <i>Penaeus vannamei</i>	45

Resumen

La acuicultura es una actividad que sustenta en gran parte la producción de alimento para el consumo humano. Sin embargo, los sistemas acuícolas intensivos son afectados por bacterias y virus patógenos. Particularmente las especies del género *Vibrio* han ocasionado una mortalidad considerable en camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Para desarrollar estrategias de control de estos microorganismos es necesario identificarlos y caracterizarlos microbiológica, bioquímica y molecularmente, así como evaluar su grado de patogenicidad. Para esto, se utilizaron cinco medios de cultivo selectivos cromogénicos y se seleccionaron tres colonias dominantes de diferente color (cepa verde, cepa azul, cepa morada). Se realizaron pruebas fenotípicas, bioquímicas. Además, se realizó la extracción de ADN, de plásmidos y PCR para identificar la especie con base al gen ribosomal 16s ARNr. También se llevaron a cabo los desafíos de patogenicidad con las tres cepas a diferentes concentraciones bacterianas y se tomaron muestras para el análisis histológico y comprobar el daño causado. Se identificaron tres especies de *Vibrio*, la más patógena fue la cepa verde (*V. alginolyticus*), que presentó iridiscencia y un crecimiento clasificado como tipo de enjambre rápido, que causó una mortalidad mayor a 74%, manifestando daños externos de vibriosis y en el hepatopáncreas; causando atrofia, desprendimiento celular, melanización y necrosis de los túbulos hepatopancreáticos y melanizaciones multifocales en el exoesqueleto. Este cuadro es diferente a aquellos reportados con anterioridad.

Palabras clave: Camarón blanco, *Vibrio alginolyticus*, vibriosis, patogenicidad, mortalidad, iridiscencia, crecimiento tipo enjambre, sistemas de recirculación.

I. Introducción

Para el año 2050 se prevé que la población mundial será mayor a 9 mil millones de personas y seguirá aumentando (FAO, 2020). Con este aumento, también lo hará el consumo per cápita de productos acuícolas y consigo el gran reto de satisfacer la demanda alimenticia (Trejo, 2019). En el año 2020, la FAO reportó que la producción de la acuicultura a nivel mundial fue de 180 millones de toneladas (FAO, 2020). De las cuales 9.4 millones de toneladas fueron de crustáceos, la cual alcanzó un valor de \$69,300 millones de dólares, duplicando el valor de la producción de moluscos que tienen un alto valor comercial en el mercado internacional (FAO, 2020). El camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei*, representa uno de los productos acuícolas con mayor volumen de producción y comercialización a nivel nacional e internacional, en varios países es el producto de exportación más valioso y su efecto en el empleo también es considerable (FAO, 2020; Zhang et al., 2014).

La acuicultura a través del desarrollo y diversificación a nivel mundial, busca lograr los mayores rendimientos incrementando la producción, por medio de la intensificación de los sistemas acuícolas (De la Rosa, 2006; FAO, 2020; Varela y Choc, 2020) y obtención de mayores rendimientos, que solo se pueden lograr si se erradica o disminuye el impacto que causan los patógenos (Varela y Choc, 2020). Sin embargo, todos los tipos de sistemas se encuentran constantemente amenazados por enfermedades infecciosas (Guzmán, 2019). Las más comunes son causadas por agentes etiológicos como virus, bacterias, hongos y/o parásitos (Briggs, 2004; Varela y Choc, 2020). Aunque se considera que los de mayor impacto en la acuicultura son los virus y las bacterias (Ayala, 2021; Cordero et al., 2013; FAO, 2017).

La presencia de poblaciones bacterianas específicas en los sistemas acuícolas, puede generar problemas patológicos en los organismos cultivados (Aguirre et al., 2005; Cuéllar y Brock, 2018). En los últimos diez años, se ha incrementado la incidencia de enfermedades causadas por bacterias en los cultivos de camarón blanco (INAPESCA, 2018; Yang et al. 2022). Particularmente las vibriosis afectan continuamente la camaronicultura, generando grandes mortalidades y pérdidas económicas (Ayala, 2021; Trujillo et al., 2005;). Se asocia a luminiscencia, letargia, nado errático, intestino semi vacío, melanización y coloración roja o anaranjada de los apéndices, exoesqueleto, branquias y daño graves en el hepatopáncreas (Cuéllar, 2013; FAO, 2017; Haws et al., 2001).

En la década de los 90 's en México, algunas cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela* fueron protagonistas de brotes infecciosos en engorda de camarón, mientras que *V. harveyi* y *V. splendidus* fueron aisladas en cultivos larvarios (Gómez et al., 1998). Diferentes especies de *Vibrio* se han detectado en la hemolinfa y hepatopáncreas de camarones juveniles y adultos sanos de *P. vannamei*, representando un reservorio natural para estos patógenos que pueden ser introducidos en otras regiones o países a los sistemas de cultivo (Amatul et. al., 2020; Cano et al., 2010).

En 2009, una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* impactó gravemente la producción camaronícola, denominada inicialmente como la enfermedad del síndrome de mortalidad temprana (o EMS) causó pérdidas en los mercados internacionales notablemente en Asia (Peña y Varela, 2014). En China, la producción se redujo hasta en un 80% en ciertas regiones en Tailandia (del 2010 al 2016) donde se reportaron las mayores pérdidas históricas, mientras que Vietnam reportó pérdidas de más de \$ 2.5 mil millones de dólares (Fletcher, 2021). En 2013 y 2014 en los cultivos de camarón y laboratorios del noreste de México, se reportaron mortalidades masivas atípicas, con pérdidas >90%. Los análisis revelaron daños de necrosis en el hepatopáncreas con muy alta colonización de bacterias atribuidas al género *Vibrio* (INAPESCA, 2018). Actualmente la enfermedad se ha denominado AHPND por sus siglas en inglés (Soto et. al., 2015).

Recientemente en China en 2019, se reportó en laboratorios de producción de larva otra nueva enfermedad conocida como la enfermedad de la postlarva de vidrio, que tuvo como agente causal a una cepa altamente letal de *Vibrio*. Esta enfermedad afectó a las postlarvas de *P. vannamei* de entre 6 - 12 días de vida y provocó más del 90% de la mortalidad en los cultivos dentro de las 24 a 48 horas posteriores al primer signo de enfermedad (Yang et al., 2022). Debido a su amplia distribución geográfica, alto grado de virulencia, transferencia plasmídica e intensificación de las artes de cultivo (Hai-Hong et al., 2013), es posible que surjan nuevas cepas de *Vibrio* con adquisición de plásmidos (Dahlberg et. al., 1998) y que desarrollen enfermedades nuevas (Cuéllar y Brock, 2018; Krishna et al., 2014; Yang et al. 2022).

La ocurrencia de nuevas especies y sus posibles similitudes en cuanto a las lesiones o afecciones que producen, exigen constantes actualizaciones en las bases de datos y vigilancia para implementar medidas correctivas adecuadas, capacitar personal e invertir en detección, aislamiento e identificación para erradicar oportunamente a los patógenos y reducir pérdidas de producción

(CONAPESCA, 2012; Varela y Choc, 2020). Por lo que en esta tesis se caracterizan microbiológica, bioquímica y molecularmente tres cepas de bacterias de origen marino con un potencial patogénico. Se evaluará el nivel de patogenicidad mediante desafíos controlados y se describirá el cuadro clínico desarrollado en camarón blanco *P. vannamei*.

II. Antecedentes

2.1.- *Penaeus vannamei*

El camarón blanco del pacífico (*Penaeus vannamei*) es una de las especies que más se cultiva en todo el mundo (Zhang et al., 2014). Esto se debe a su adaptabilidad al cultivo, amplia tolerancia térmica, altas tasas de fecundidad, resistencia a altas densidades de cultivo, tolerancia a un intervalo amplio de salinidades y una tasa de crecimiento rápida, completando su etapa de engorda de cuatro a siete meses (Valles et al., 2005). La especie se ha introducido a muchos países para llevar a cabo su cultivo como en China, siendo el país que más la produce a nivel mundial (Zhi-Ying et al., 2006; Reyes, 2017; FAO, 2020).

Su producción en México comenzó en la Universidad de Sonora a principios de la década de los 70's, pero el desarrollo comercial ocurrió en los 80's. Desde entonces, se ha desarrollado vasta infraestructura principalmente en la región noroeste del país (INAPESCA, 2021). Sin embargo, en los últimos años el cultivo de camarón en sistemas intensivo e hiper-intensivos, ha sido impactado por distintas enfermedades de origen bacteriano, reduciendo su producción y rentabilidad (INAPESCA, 2021).

En Baja California se han desarrollado los cultivos del camarón blanco en tres zonas: San Quintín, El Valle de Mexicali y San Felipe (CESAIBC, 2010). Siendo estas dos últimas las de mayor potencial en la región en cuestiones de acuicultura comercial (Giffard et al., 2014; INAPESCA, 2018). La camaronicultura en estas zonas presenta un gran desafío en la planificación de estrategias para el control y prevención de enfermedades bacterianas como las vibriosis (Varela et al., 2017). En la actualidad AHPND, es causada por al menos cinco especies diferentes de *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. owensii* y *V. punensis*), es por eso que existe la posibilidad de la transferencia de genes patógenos a otras especies y presencia de brotes infecciosos en la región del noroeste de México. La prevención, monitoreo y caracterización de cepas tipo *Vibrio*, es vital para evitar la transfronterización de agentes patógenos o enfermedades (Aranguren et al., 2020; Varela et al., 2017).

2.1.- Género *Vibrio*

Vibrio corresponde a la familia *Vibrionaceae*, en donde se destacaban seis géneros: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia* y *Aliivibrio* (Chimetto et al., 2011). Actualmente se reconocen hasta 15 géneros dentro de esta familia (List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature [LPSN], 2022). Las bacterias del género *Vibrio* se clasifican como bacterias halófilas, quimioórganoheterótrofas, gram negativas y de amplia distribución geográfica (Thompson et al., 2004). Presentan forma de bacilos que miden de 2-3 μm de largo, generalmente presentan un flagelo polar que les permite movilidad. Los agentes patógenos bacterianos como *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, han sido asociados a mortalidades en camarón durante toda las fases de cultivo (Cuéllar, 2018).

Gran parte de las especies del género *Vibrio* son clasificadas como oportunistas (Madigan et al., 2015), generalmente son aisladas de ambientes marinos costeros, en partículas de sedimento, corales, peces, moluscos, crustáceos, esponjas, macroalgas, fitoplancton y zooplancton (Thompson et al., 2004). Algunas circunstancias y factores específicos como la predisposición genética del camarón, influencia antropogénica del medio ambiente e intensificación de los métodos de producción, favorecen el estrés en los organismos cultivados (Ibarra et al., 2003), lo que los vuelve susceptibles a infecciones, comprometiendo sus oportunidades de supervivencia (Ibarra et al., 2007).

La distribución y dinámica de poblaciones de *Vibrio* spp, está definida por variantes físico-químicas como la temperatura, salinidad, pH, disponibilidad y concentración de nutrientes, así como el número y variedad de hospederos (Rodríguez et al., 2001). De acuerdo con el manual de Bergey de sistemática bacteriana en su 2ª edición (2005), describe 44 especies de *Vibrio*, aunque con el tiempo se describieron aproximadamente 134 especies y sus biotipos (Sawabe et al., 2014; Soto, 2017). Recientemente, se han descrito y reconocido por lo menos 158 especies de *Vibrio* (LPSN, 2022). Se espera que este número aumente debido al avance tecnológico en la identificación molecular e intensificación de los sistemas de cultivo con agua de mar (Casariego y Jhunion, 2014; Tarr et al., 2007; Yang et al. 2022) donde son ubicuos (Jones, 2017). Su persistencia en los sistemas de recirculación se puede exacerbar debido a la elevada disponibilidad de nutrientes, temperaturas y salinidades óptimas para su crecimiento, donde pueden causar enfermedad (Amin et al., 2021). Por lo que este trabajo está enfocado en caracterizar la presencia de bacterias patógenas en un sistema de recirculación de *Penaeus vannamei*.

III. Hipótesis

Las tres cepas bacterianas aisladas en camarón blanco (*Penaeus vannamei*) pertenecen al género *Vibrio* spp. Cada cepa presenta igual grado de patogenicidad que se ve reflejado con alteraciones en la signología, el comportamiento, el daño tisular y un elevado porcentaje de mortandad en los camarones infectados experimentalmente.

IV. Objetivo general

- ❑ Identificar y caracterizar tres cepas bacterianas aisladas en agua de mar durante eventos de vibriosis en sistemas de cerrados.

4.1. Objetivos específicos

- Aislar y purificar cepas de bacterias a partir del agua de mar, que alimenta los sistemas de recirculación cerrados en instalaciones acuícolas durante un evento de vibriosis.
- Identificar y caracterizar tres cepas de *Vibrio* spp, por medio de pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares.
- Establecer un cuadro clínico y una descripción de la infección causada por la cepa más patógena mediante desafíos controlados en *P. vannamei* siguiendo los postulados de Koch.

V. Justificación

El aumento en la intensificación de los sistemas de producción y las fluctuaciones en la calidad del agua de los sistemas acuícolas, favorece la proliferación de bacterias patógenas que afectan directamente la eficiencia y producción de los sistemas acuícolas. Debido a esto, es importante reconocer e identificar a los agentes bacterianos causales de las enfermedades presentes en los sistemas de cultivo (Morales *et al.*, 2011).

En algunas ocasiones, los ejemplares de *P. vannamei* que son adquiridos presentan una condición externa sana, antes, durante y después de su transporte o siembra en los sistemas de cultivo, pero esto no significa que los organismos estén libres de patógenos (Rodríguez *et al.*, 2001). Ya que después de un evento de estrés o con las fluctuaciones en las condiciones de cultivo, se puede manifestar una alta tasa de replicación de algún patógeno o varios, produciendo una afección donde se presenta un alto porcentaje de mortalidad.

En ocasiones pueden ocurrir cambios físico-químicos, nutricionales o fisiológicos que afectan directamente al camarón y debido a la pérdida de la homeostasis interna, estos quedan susceptibles a los patógenos oportunistas como lo son las especies del género *Vibrio* (Medina, 2018). De esta forma, un camarón puede presentar una infección por una bacteria o varias (co-infección), los signos clínicos que se pueden presentar son los típicos de estas enfermedades, pero en ciertos casos se presentan nuevos signos clínicos, daños y afecciones.

Debido a esto, es importante caracterizar e identificar las especies de bacterias del género *Vibrio*, así como los daños causados mediante desafíos de patogenicidad bajo condiciones controladas, basándose en los postulados de Koch para obtener una descripción detallada de las bacterias y del cuadro clínico que generan.

VI. Materiales y métodos

Toda la metodología que se describe a continuación se resume en el siguiente diagrama de flujo (Fig. 1).

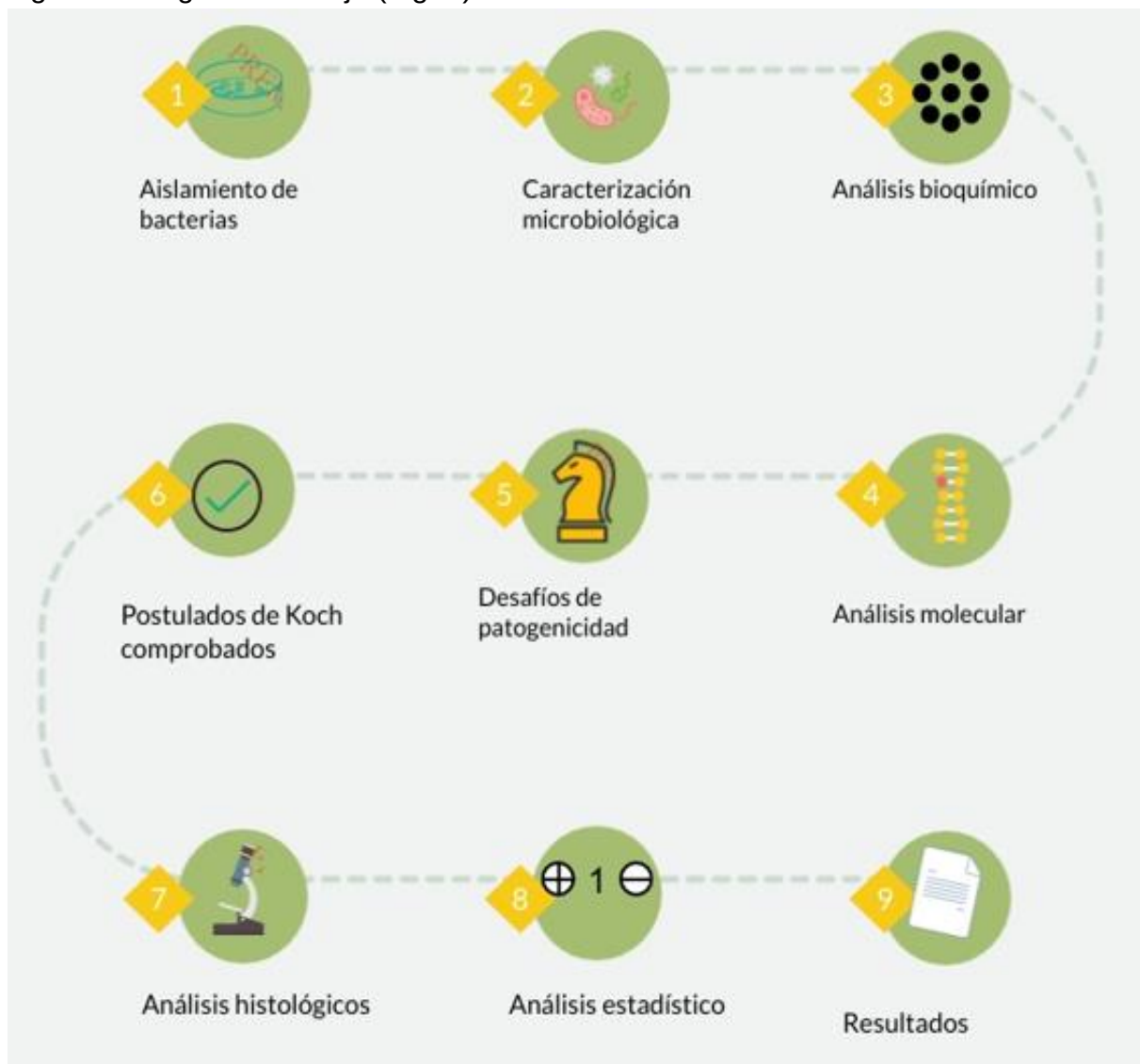


Figura 1. Secuencia de actividades para realizar la caracterización de bacterias patógenas y evaluación de su patogenicidad.

6.1. Toma de muestra y aislamiento de bacterias

En el otoño del 2020 (07 de octubre del 2020), de la tubería principal de agua de mar de la Unidad de Biotecnología de Piscicultura (UBP) que abastece a los laboratorios de acuicultura de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), se colectaron 250 mL de agua de mar por medio de un vaciado por gravedad en un frasco estéril de cristal con tapón.

Se prepararon cinco medios de cultivo cromogénicos selectivos para bacterias del género *Vibrio spp.* Hardy-Chrom™ (HC - Criterion™), Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS - Difco™), Vibrio Chromo Select Agar (VC - Sigma-Aldrich®), CHROMagar™ Vibrio (CAV - Chromogenic media) y Vibrio Chromogenic Agar (VCA - Condalab). Las cajas se inocularon con 100 uL de la muestra de agua de mar mediante un sembrado por estriado en una campana de flujo laminar. Las cajas petri fueron selladas con papel parafilm para evitar su contaminación y se colocaron en una incubadora a $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Las cepas pertenecientes al género *Vibrio* que crecieron sobre los medios selectivos y se purificaron hasta el punto que presentaron un color específico. Se transfirieron a medio de cultivo general Agar Triptona Soja (TSA - Difco™) y Agar Mueller-Hinton (MH- Sigma-Aldrich®) al 2% de NaCl, previamente esterilizados en una autoclave ($121^{\circ}\text{C} \times 20 \text{ min/ } 15 \text{ psi}$). Se sembraron colonias individuales por estriado en TSA y MH al 2% de NaCl, enseguida se sellaron con papel parafilm para evitar la contaminación y se incubaron a $28 \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ durante 48 horas. Se renovaron en su mismo medio las colonias que crecieron en cada placa (cada segundo o tercer día).

6.2. Caracterización bacteriológica

Se aislaron y se purificaron las colonias con mayor predominancia y frecuencia, siendo las de color verde, azul y morado en el medio de cultivo HC, después de 5 pases hasta su purificación, se transfirieron a medio de cultivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), Vibrio Chromo Select Agar (VCSA), CHROMagar (CA) y Vibrio Chromogenic Agar (VCA) y se incubaron a $28 \pm 0.5^\circ \text{C}$. Ya que las bacterias presentaron un crecimiento estandarizado y caracterizado se procedió a inocular en medio de cultivo general agar TSA y MH al 2% de NaCl.

Estos pasos se repitieron varias veces con el fin de corroborar el crecimiento en los diferentes medios de cultivo, el tiempo de crecimiento/colonización y el tipo de crecimiento (forma de las colonias y la presencia/ausencia de iridiscencia). Los medios no selectivos líquidos Luria Bertani (LB) y Mueller-Hinton (MH) al 2% de NaCl, se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se esterilizaron en una autoclave ($121^\circ \text{C} \times 15 \text{ min}/15 \text{ psi}$).

Enseguida se procedió a transferir los medios a matraces de cristal de 50 mL previamente esterilizados, se agregó 30 mL del medio estéril, se inocularon y se les colocó un tapón de gasa estéril. Lo siguiente fue colocar los matraces en una plancha de agitación a 100 rpm en un cuarto con temperatura de 28°C durante 48 horas. Los medios fueron renovados cada segundo o tercer día dependiendo la turbidez y absorbancia que presentaron. Estos cultivos se utilizaron para comparar en que medio presentaron mejor crecimiento y para preparar criopreservados con glicerol al 10% para pruebas posteriores.

6.3. Curvas de crecimiento bacterianas y conteos de unidades formadoras de colonias (UFC)

En tubos Falcon de 50 mL se prepararon inóculos con 27 mL de medio MH al 2% de NaCl y 3 mL de bacteria (inóculos de 24 horas de incubación, cepa verde con densidad óptica (DO) de: 0.986, cepa azul DO: 0.847, cepa morada DO: 0.485) con un volumen final de 30 mL). Con un espectrofotómetro (N4S, UV-VIS Spectrophotometer) se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm. El medio de cultivo MH al 2% estéril se utilizó como blanco. Y posteriormente se midió la absorbancia de los inóculos a las 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 hora por triplicado y los datos se procesaron con el programa Excel y en base a la fase exponencial se calculó la tasa de duplicación bacteriana de cada cepa con la ecuación:

$$\text{Tiempo de duplicación} = T(2/1) = \ln 2/k$$

Para las UFC se utilizaron inóculos de 24 horas de crecimiento (30 mL y DO: 0.6-0.9). Se prepararon diluciones seriadas con medio de cultivo MH al 2% NaCl de 10^{-1} hasta 10^{-6} , cada dilución se inoculó en agar TSA al 2% de NaCl y medio específico HC. Se incubaron a 28 °C durante 24 horas y finalmente se realizaron los conteos de UFC esperando valores dentro de los rangos establecidos (mínimo 30 y un máximo de 300 UFC).

6.4. Análisis bioquímico

Se identificaron las tres cepas aisladas previamente con un kit bioquímico (Microplate GEN III™ – Biolog), con 94 pruebas fenotípicas de las cuales 71 fueron sustratos de carbono y los otros 23 sustratos fueron de sensibilidad química (Anexo 1). Las bacterias fueron sembradas en medio de cultivo agar TSA al 2% de NaCl mediante la técnica de estriado y se incubaron durante 24 horas a $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$, se tomó una pequeña porción de una colonia aislada con un asa estéril y se inoculó en el medio líquido con el protocolo B del kit. Se midió la transmitancia con un turbidímetro (Turbidimeter, Biolog) antes y después de inocular para evitar una sobresaturación de los pozos. En seguida, se inocularon con 100 μL los 94 pozos y las placas se incubaron a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Posterior al tiempo de incubación, la asimilación de la cepa con la fuente de carbono o sustancia química de cada pozo, indicó colorimétricamente por los tintes redox de tetrazolio en cada pozo inoculado en color púrpura para un resultado positivo o negativo de manera incolora. Los datos se analizaron con el software de *Biolog Gen III* y con la base de datos se compararon las huellas fenotípicas en cada placa y el software indicó el género/especie de las bacterias con un valor estadístico de 0 a 1.

6.5. Análisis molecular

6.5.1. Extracción de ADN

A partir de inóculos de 30 mL con 24 horas de crecimiento, se tomó el 10% y se renovó en medio nuevo. Estos inóculos se centrifugaron a 13 000 *g* X 5 min. Enseguida se retiró el sobrenadante y al pellet se le agregó 600 μ L de Buffer lítico SNET (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5mM EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl; 1% SDS), se resuspendieron bien los pellets y se transfirieron a tubos de 2.0 mL Eppendorf y se le agregó 5 μ L de Proteinasa K (10 mg/mL), las muestras fueron incubadas a $65 \pm 0.5^\circ$ C durante 60 minutos en agitación. Posteriormente se centrifugaron a 12 000 *g* X 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le añadió 600 μ L de Fenol y se agitó suavemente durante cinco minutos, lo siguiente fue centrifugar las muestras a 12 000 *g* X 5 min, se recuperó la fase superior y se transfirió a un tubo limpio.

Después se le agregó 600 μ L de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1), se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente (TA) con agitación, se centrifugaron a 12 000 *g* X 5 min y se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio. Se le añadió 600 μ L Cloroformo-Isoamílico, se incubaron durante cinco minutos a TA, se volvieron a centrifugar a 7 000 *g* X 3 min, se recuperó la fase superior y se transfirió a un tubo limpio. Para precipitar las muestras se les añadió 50 μ L de acetato de sodio (NaAc) y 200 μ L de isopropanol, lo siguiente fue colocar las muestras a $-20 \pm 0.5^\circ$ C X 10 min y finalmente se centrifugaron a 12 000 *g* X 10 min.

Para el lavado de los pellets se les añadió 1 mL de etanol al 70% frío y se agitaron suavemente sin disolver los pellets, se decantó el alcohol con cuidado, se destaparon los tubos y se les colocó papel parafilm. Se dejaron secar 30 minutos en una campana de flujo laminar y finalmente se resuspendieron en 100 μ L de PPI (agua Milli-Q y libre de pirofosfatos), se mantuvieron a $60 \pm 0.5^\circ$ C por 30 minutos, después las extracciones se almacenaron a $-20 \pm 0.5^\circ$ C hasta su uso para la amplificación de genes por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

Enseguida se evaluó la calidad (integridad) de los extractos de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, Wide Mini-sub® Cell GT) con un sistema continuo a base de TBE 1X. La separación se realizó durante 10 min a un gradiente de 50 volts/cm constantes y después 20 minutos a 80 volts/cm. Los geles fueron visualizados mediante

irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador (T1202 Sigma Chemical company Kodak). El registro de resultados se realizó por medio de fotografía digital (Cámara DC290 ZOOM Kodak).

6.5.2. Amplificación del gen ARNr 16S por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se amplificó el gen ribosomal ARNr 16S utilizando los cebadores universales FC27 (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3), y RC1492 (5-TACGG CTACCTTGTTACGACTT-3) (Tarazona et. al., 2018). Para ello, se preparó una mezcla de PCR conteniendo: agua PPI (agua Milli-Q libre de fosfatos), 0.4 μ M dNTP's (Promega, Southampton, UK), 0.4 μ M de cada cebador, 1 Unidad de Taq ADN Polimerasa (PROMEGA), 1x amortiguador de reacción para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl) (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂ y 0.25% de DMSO (Life Science).

Las reacciones de PCR (Tabla I). se realizaron en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler personal). Las condiciones de amplificación se establecieron para una desnaturalización, alineamiento y extensión de los productos (Tabla II). Los productos de PCR (25 μ L) se detectaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y con bromuro de etidio. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen), el gel se visualizó mediante irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador (T1202 Sigma Chemical company Kodak), el registro de los resultados se realizó mediante fotografía digital (Cámara DC290 ZOOM Kodak).

Tabla 1. Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por muestra.

Reactivo	(μL)
Agua PPI	15.5
dNTP's [0.4 μ M]	1
Cebador FC27 [10 μ M]	0.5
Cebador RC1492 [10 μ M]	0.5
1X Buffer	2.5
MgCl ₂ [3 mM]	2.5
DMSO [5%]	1.25
Taq Pol [1 U]	0.25
ADN [100 ng/ μ L]	1
Vol. final	25

Tabla 2. Gradiente de amplificación utilizado para PCR.

CICLO	Gradiente
Ciclo 1 (1x)	94 °C x 10 min
Ciclo 2 (35x)	94 °C x 1 min 63 °C x 1 min 72 °C x 1 min
Ciclo 3 (1x)	72 °C x 7 min 16 °C x ∞

6.5.3. Análisis filogenético

Con el objetivo de determinar una relación filogenética de las tres cepas aisladas al género *Vibrio*, se mandó a secuenciar el gen ribosomal ARNr 16S a la compañía ETON bioscience Inc. (San Diego, CA) utilizando la plataforma Sanger de secuenciación. Los resultados de las secuencias fueron visualizadas y curadas utilizando el programa Geneious versión 8.1.9.

Posteriormente, las secuencias parciales obtenidas (cepa verde de 390 pb - 1, 404 pb, cepa azul de 1 - 1, 335 pb y cepa morada 1, 004 pb – 1, 358 pb) se compararon con diferentes secuencias en bases de datos por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y el programa EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>). Las cepas bacterianas con secuencias del gen ARNr 16S, que presentaron porcentajes de similitud entre el 94 - 100% y que sean cepa tipo (aquellas cepas que son utilizadas como referencia para describir una especie) con respecto al género *Vibrio*, fueron seleccionadas para la realización del árbol filogenético.

Una vez seleccionadas las cepas tipo con mayor porcentaje de similitud, se prosiguió con el alineamiento utilizando el algoritmo Muscle dentro del programa Geneious 8.1.9. El alineamiento obtenido se utilizó para realizar un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 11. En dicho programa se eligió el modelo más compatible para el alineamiento (GTR GAMMA) y el árbol fue creado utilizando el método de máxima verosimilitud (RaxML) con 1,000 réplicas.

6.5.4. Extracción de plásmidos

La extracción se llevó a cabo con un kit FastPlasmid® Mini de la marca Eppendorf, siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de las extracciones plasmídicas (50 µL) se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen). El gel fue expuesto a irradiación de luz ultravioleta en un transiluminador (T1202 Sigma Chemical company Kodak) y el registro fotográfico se realizó con una cámara de un teléfono celular (iPhone 8, Apple).

6.6. Desafíos de patogenicidad

6.6.1. Obtención de organismos y diseño experimental

Para realizar los bioensayos de infección se obtuvieron postlarvas (PL's) de *Penaeus vannamei* de 0.3 gramos, del laboratorio de Crustáceos de la FCM - UABC campus Sauzal. Las PL's fueron alimentadas con pellets comerciales de camaronina al 40% de proteína, al 7% de la biomasa total distribuida en cinco raciones diarias, hasta que alcanzaron un mínimo de cuatro gramos de peso húmedo, partir de este peso la ración de alimento se ajustó al 3%. Los juveniles se distribuyeron en dos tanques circulares de 1.1 m³ con una salinidad ajustada a 20 unidades prácticas de salinidad (UPS), con aireación constante (4.0-7.0 mg/L) y temperatura de 28 ± 0.5 °C mantenida con calentadores de titanio (200 W).

El agua se pasó a través de un sistema de filtración de cartuchos de 5 µm y filtros de calcetín. Durante el proceso de engorda se utilizó un fotoperiodo natural de 10:14. (10 horas luz y 14 horas de oscuridad). Una vez que los camarones presentaron una distribución de tallas uniforme, se transfirieron al interior del Laboratorio de Patología Experimental Acuícola (LPEA) en peceras con capacidad de 60 L. El agua de mar que se utilizó para los acuarios se pasó por un sistema de filtración secuencial de 10 - 5 µm y filtración con luz UV. El agua se desinfectó con cloro comercial al 6% y se neutralizó con tiosulfato de sodio antes de ser utilizada. Para mantener la calidad del agua durante los bioensayos, se realizaron recambios del 20 al 40% del volumen total de agua de los acuarios cada segundo o tercer día, las heces, el alimento no consumido y las mudas fueron removidos cada día.

El agua sucia y los desechos sólidos fueron recolectados y tratados en un tanque especial con cloro y después neutralizados con tiosulfato de sodio. Los parámetros fisicoquímicos del agua para las condiciones experimentales que se requirieron fueron: salinidad de 20 UPS, temperatura de 28 ± 0.5°C (Bückle, et al., 2006). Oxígeno disuelto 5.0 - 8.0 mg/L, pH 7.5 ± 0.5 y amonio total menor que 0.5 mg/L. Cada acuario contó con un sistema de aireación por difusión y un sistema de recirculación independiente con un filtro de cartucho de 5 µm. El bioensayo se desarrolló en dos áreas experimentales; una para el grupo control y otra para el grupo infectado, con el fin de evitar la contaminación cruzada durante los desafíos de patogenicidad.

6.6.2. Generación de inóculo bacteriano y dosis de infección

Se preparó el inóculo de las tres cepas por triplicado (verde, azul y morado) en medio MH al 2% en un volumen total de 7 mL, inoculando 1 mL del cultivo de cada bacteria (cepa verde DO: 0.107, cepa azul DO: 0.098 y cepa morada DO: 0.084) y 6 mL del medio de cultivo. A las 24 horas de inoculación se midió la absorbancia y se realizaron conteos por dilución (hasta 10^{-6} en tubos Eppendorf de 1.5 mL) para calcular las UFC/mL del inóculo. Los conteos se realizaron sembrando 100 μ L de la dilución en medio Agar TSA al 2% de NaCl y HC, se incubaron a $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas y se realizó el conteo de las UFC/mL.

6.6.3. Proceso de infección

El primer desafío fue para detectar que bacteria de las tres seleccionadas para los desafíos era patógena para el camarón. Para ello se probaron las tres cepas de manera individual, se utilizaron camarones de 14 gramos de peso húmedo, distribuidos en 9 peceras cada una con 4 camarones. Por cada tratamiento (Control natural, Control MH 2%, Cepa verde 1×10^6 , Cepa azul 1×10^6 , Cepa morada 1×10^6 UFC/mL), se utilizaron 3 peceras ($n=16$, $N=64$). Estos fueron infectados por medio de una inyección intramuscular con 20 μ L de inóculo bacteriano entre el penúltimo y último segmento abdominal con jeringas y aguja de insulina (Cigna® 31G X 13 mm) utilizando diluciones de 1×10^{-6} .

En el segundo desafío de patogenicidad, se seleccionó la bacteria verde la cual indujo la mayor mortandad de las tres cepas en el primer bioensayo y se distribuyó un nuevo grupo de camarones en las 9 peceras ($n=16$, $N=64$), previamente lavadas y desinfectadas. Se infectó a los camarones del grupo control positivo utilizando un inóculo de la cepa verde a tres concentraciones diferentes, la dilución alta, moderada y baja (1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 UFC/mL), por medio de una inyección intramuscular con 20 μ L del inóculo entre el penúltimo y último segmento abdominal con jeringas de insulina (Cigna® y aguja 31G X 13 mm). Para los organismos del grupo control negativo se infectó con solo el medio MH al 2%. Los camarones fueron colectados en periodos en estado moribundo, se envolvieron en papel aluminio anotando la hora de colecta y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y finalmente se almacenaron a -75°C para análisis posteriores.

Finalmente, de cinco camarones infectados experimentalmente y moribundos (perdieron la respuesta a estímulos) con la dilución alta, se extrajo hemolinfa y hepatopáncreas que se inoculó en medio de cultivo HC, VCSA y TCBS. Se aislaron las colonias color verde por medio de siembra en estriado

hasta el punto que se obtuvieron colonias puras. Se transfirió a caldo de cultivo MH 2% NaCl en un volumen de 7 mL en tubos Falcon, se midió la absorbancia y se realizaron conteos de UFC/mL con el fin de generar una dosis infectiva similar a la dilución alta. Se seleccionaron cuatro organismos sanos del tratamiento control natural y se desafiaron experimental con el mismo procedimiento de infección descrito anteriormente. Finalmente, se realizó una extracción de hemolinfa y se inoculó en medio de cultivo HC para la comprobación de los postulados Koch.

6.6.4. Signología y daños

Se realizó un registro diario de los daños, signos y comportamientos que se presentaron durante los dos desafíos de patogenicidad. Los registros de fotos y videos, se hicieron con una cámara digital (Apple, iPhone 8) para generar los cuadros descriptivos con su imagen correspondiente. Las imágenes fueron editadas para incluir anotaciones, girarlas o acercar con el programa Corel Photopaint X8. El daño externo en los camarones desafiados con las tres cepas de *Vibrio*, se evaluó en base a la tabla III (publicada por Lighthner en 1996).

Tabla 3. Guía general para dar un valor numérico cualitativo de grado de severidad a la infección o enfermedad.

GRADO DE SEVERIDAD	SIGNOS CLÍNICOS
0	No presenta signos de infección por patógenos. No presentan lesiones características de la enfermedad.
1	Presencia muy baja de patógenos, se observan muy pocas lesiones características de la enfermedad.
2	Se observa la presencia baja y moderada de patógenos. Se observan lesiones características de la enfermedad. Incremento en la mortalidad si no se aplica tratamiento.
3	Se observa la presencia moderada de patógenos. Se observan muchas lesiones características de la enfermedad. Potencialmente letal si no se aplica tratamiento.
4	Se observa gran cantidad de patógenos. Se observan severas lesiones características de la enfermedad. Muy letal con altas mortalidades.

Fuente: modificada de Lightner, 1996.

6.7. Análisis histológico

Las muestras de órganos y tejidos de camarón se fijaron con solución Davidson (Anexo 2) por 24 horas. Las muestras se transfirieron a alcohol al 70% y se colocaron en casetes histológicos para someterse a un proceso de deshidratación en gradientes de alcohol, aclaración en benceno e inclusión en parafina con un procesador automático de tejidos (LEICA, TP-1020) (Anexo 3).

Al terminar el procesamiento, las muestras se embebieron en parafina utilizando un inclusor automático de tejidos (LEICA, EG-1160) y se obtuvieron cortes histológicos transversales de 5 - 7 μm de grosor con un microtomo (LEICA, RM-2255). Los cortes se colocaron en agua destilada con grenetina y alcohol a 40°C para ser fijadas a los portaobjetos. Las laminillas se dejaron secar en una estufa (GCA, Precision scientific) por 24 h a 75°C. La tinción se realizó utilizando el protocolo de Hematoxilina-Eosina (Anexo 4) para diferenciar las estructuras celulares y tisulares. Finalmente, se montaron con un cubreobjetos y resina (Thermo Scientific, Cytoseal 60).

6.8. Análisis estadístico

Se determinó el efecto de infección sobre la mortalidad y patogenicidad de las cepas bacterianas en *P. vannamei* a través de pruebas de pendientes (Kaplan-Mayer). Las gráficas de sobrevivencia (o mortalidad) se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism versión 8.0. Las curvas de crecimiento y los valores de tiempo de duplicación, se analizaron con el programa Excel aplicando la prueba T de Student no paramétrica con dos colas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos cuando $p \leq 0.05$.

VII. Resultados

7.1. Obtención y caracterización de bacterias

De las tres muestras de agua de mar obtenidas de la UBP y sembradas en medio HardyCHROM™ (HC), se presentó un crecimiento abundante y variado en colores, indicativos de distintas especies de *Vibrio*. Las colonias moradas fueron las más abundantes, ya que colonizaron la mayor superficie de las placas (50 %), seguido de las colonias azules (30 %) y por último fueron las colonias verdes (20 %) (Fig. 2).

Las colonias verdes presentaron un crecimiento coordinado y de rápida migración con motilidad de enjambre rápido o swarming motility (Bottcher et. al., 2016 y Freitas et. al., 2020) y colonizó toda la placa en menos de 24 horas. En medio específico HC las colonias tenían una forma grande circular, de color verde claro con el borde color café y el centro más oscuro, con una superficie convexa. Las colonias azules presentaron en medio HC, un crecimiento menos abundante, se desarrollaron colonias pequeñas circulares de color azul a las 24 horas de incubación y después se tornaron color morado oscuro fuerte en el centro con borde azul y superficie convexa. Las colonias moradas presentaron el crecimiento más lento y la cantidad de colonias resultó muy baja en comparación con las otras dos cepas, las colonias tenían forma ovalada pequeña, con superficie plana, de color morado con los bordes color crema y el centro de color oscuro (Tabla IV).

En medio específico TCBS, las colonias de la bacteria verde fueron amarillas, grandes de forma circular y cóncavas, con borde convexo, de un tamaño de 3-5 mm. Las colonias de la bacteria azul fueron amarillas, pequeñas, de forma circular planas con un borde convexo, con un tamaño de 1-2 mm. Las colonias de la bacteria morada fueron amarillas, pequeñas, circulares, cóncavas y bien definidas con un borde convexo y con un tamaño de 0.5-1 mm, resultando las tres cepas como *Vibrios* sacarosa positivos. En medio específico Vibrio Chromo Select Agar (VCSA), las colonias verdes fueron cóncavas con borde convexo, y de color verde claro con el centro más azul oscuro y los bordes de color crema. El crecimiento de estas colonias al igual que en el medio HC fue muy abundante y colonizó la mayor parte de la superficie de la placa. Las colonias azules fueron pequeñas, de forma circular con un borde convexo, con un tamaño pequeño y de color azul fuerte con el centro más oscuro y con el borde blanco. Por otra parte, las colonias moradas fueron abundantes, de forma circular con un borde convexo, de color púrpura con el borde de color blanco a las 24 horas de incubación y a las 48 horas, se tornaron moradas oscuras.

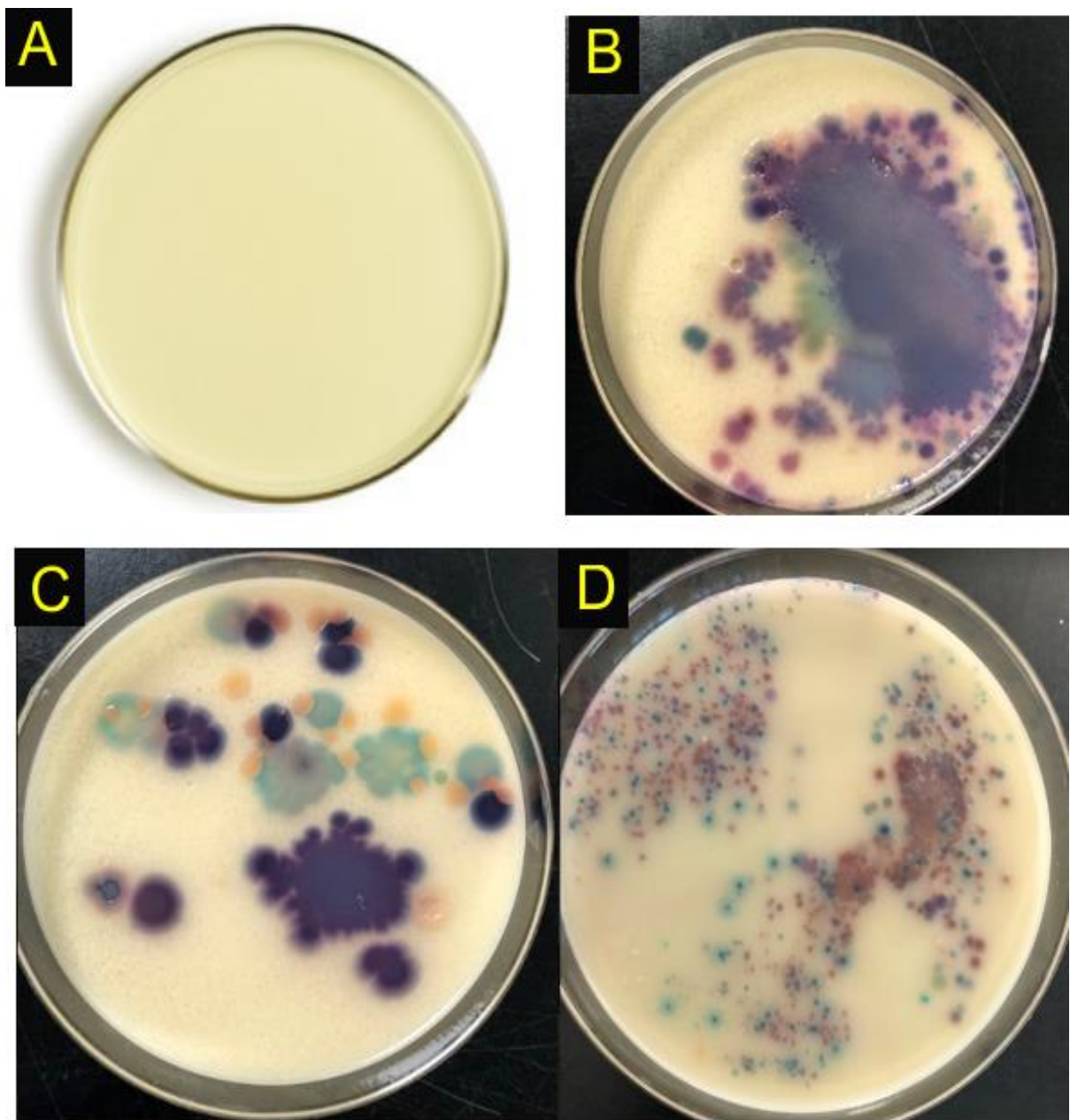


Figura 2. Tres muestras de agua del sistema de bombeo de la UBP, inoculadas en medio específico HardyCHROM™ específico para bacterias del género *Vibrio*. (A) Control negativo (B) 1er muestreo UBP. (C) 2do muestreo de la UBP. (D) 3er muestreo final de la UBP.

En el medio específico CHROMagar, el control negativo fue translucido, con un color opaco. La cepa con colonias verdes presentó un crecimiento muy abundante, generando colonias color crema/blanco, con un borde más claro y de tamaño pequeñas. Para las colonias azules se presentó un crecimiento considerable, generando colonias color malva durante las 48 horas de incubación, los bordes eran más claros con colonias de tamaño muy pequeñas de 1 mm aproximadamente. Las colonias de la cepa morada obtuvieron un crecimiento considerable, generó colonias de color amarillas translucida con un borde color crema, con una forma ovalada (Tabla IV).

Finalmente, en medio específico *Vibrio* Chromogenic Agar la cepa verde generó colonias pequeñas de 3-5 mm, con una forma plana, de color crema con el borde blanco, en algunas zonas donde la bacteria creció se presentó un color azul claro. La colonias azules presentaron el crecimiento más abundante, con colonias un poco más grandes de aproximadamente 5 mm, con una forma circular y convexa, el color de las colonias en las primeras 18 horas fueron azul fuerte y después se tornaron color lila con un borde color oscuro. La cepa morada presentó colonias muy pequeñas de aproximadamente 1-3 mm, con una forma ovalada de color rojo/rosa con el centro color guinda, esta bacteria presentó el crecimiento menos abundante y más lento en este medio de cultivo (Tabla IV).

Por otra parte, en los medios de cultivo general Mueller-Hinton agar al 2% de NaCl las tres cepas presentaron un buen crecimiento y formación de colonias incoloras, la cepa verde presentó el crecimiento más rápido en este medio de cultivo cubriendo la totalidad de la placa. En medio de cultivo TSA al 2% de NaCl, las tres cepas (verde, azul y morada) también fueron incoloras y presentaron un óptimo crecimiento. Sin embargo, la cepa verde creció difusa y al observarla a contraluz se emitió un halo de iridiscencia tornasol, generando colores arcoíris desde el rojo, amarillo al verde y azul (Fig. 3 B). La cepa azul y la cepa morada no presentaron esta característica de iridiscencia ni tampoco el crecimiento de enjambre o swarming (Fig. 3 C, B).

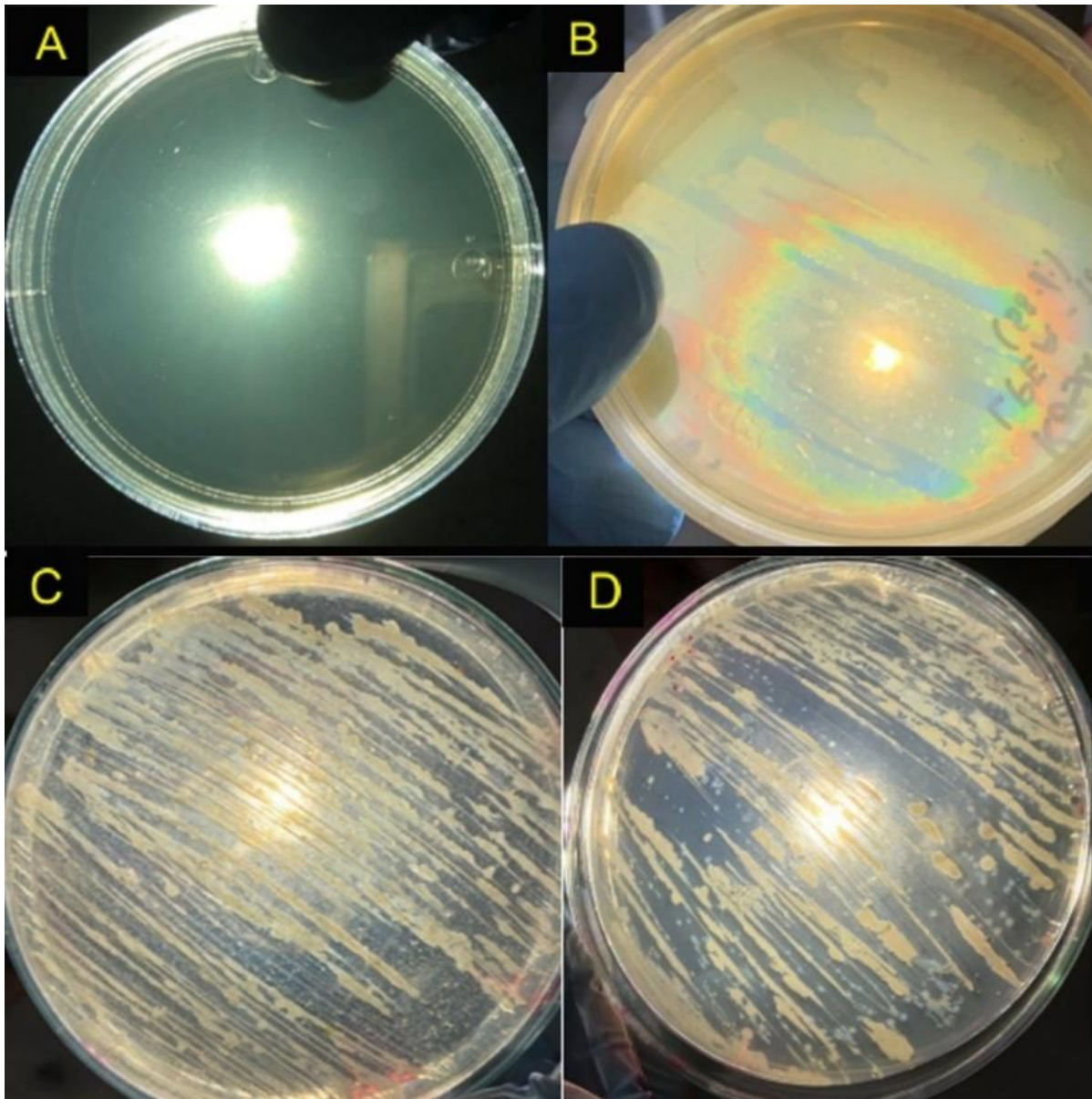
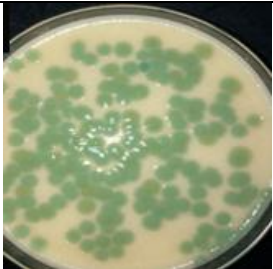
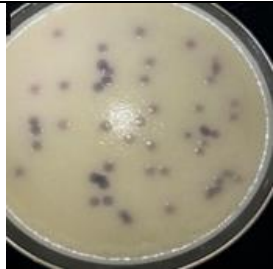
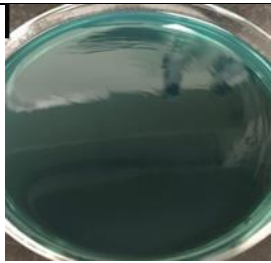
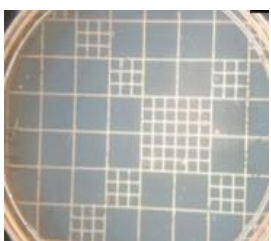
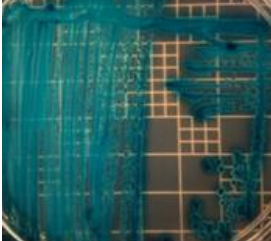
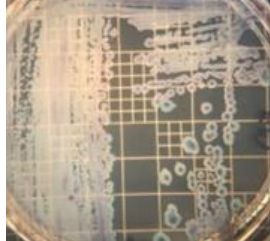
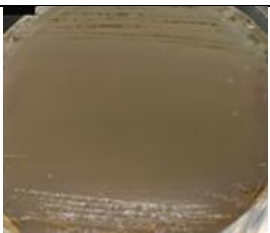
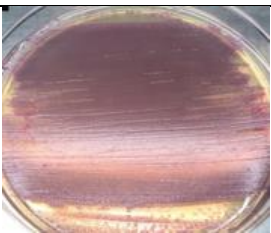
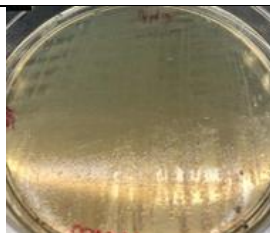
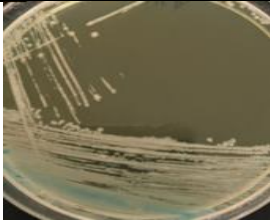
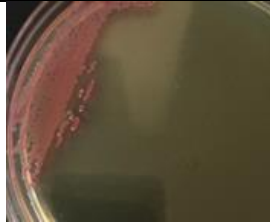


Figura 3. Crecimiento y evaluación de iridiscencia de las tres cepas en medio de cultivo general TSA al 2% de NaCl a las 24 horas de incubación. (A) Control negativo. (B) Cepa verde iridiscente. (C) Cepa azul sin iridiscencia. (D) Cepa morada sin iridiscencia.

Tabla 4. Coloración de las colonias de las tres cepas en distintos medios específicos para bacterias del género *Vibrio*.

Medio de cultivo	Control negativo	Cepa verde	Cepa azul	Cepa morada
HardyCHROME Vibrio				
TCBS				
Vibrio Chromo Select Agar				
CHROMagar				
Vibrio Chromogenic Agar				

7.2. Curvas de crecimiento bacterianas

Para poder preparar el inóculo para la infección experimental de camarones, fue necesario realizar curvas de crecimiento de las tres cepas de interés. Las curvas se realizaron por triplicado en un periodo de 48 horas utilizando el medio MH 2% de NaCl. Las tres cepas mostraron la fase exponencial, estacionaria y de muerte, observándose diferencias claras en su máxima lectura de absorbancia (Fig. 4). Con la fase exponencial de la curva de crecimiento, se obtuvo el tiempo de duplicación el cual fue de 105.7 minutos con una constante (k) de 0.3936 para la cepa verde (Figura 4A), para la cepa azul fue de 91 minutos con $k= 0.457$ (Figura 4B) y la cepa con cepa morada fue de 131.4 minutos con $k= 0.3164$ (Figura 4C).

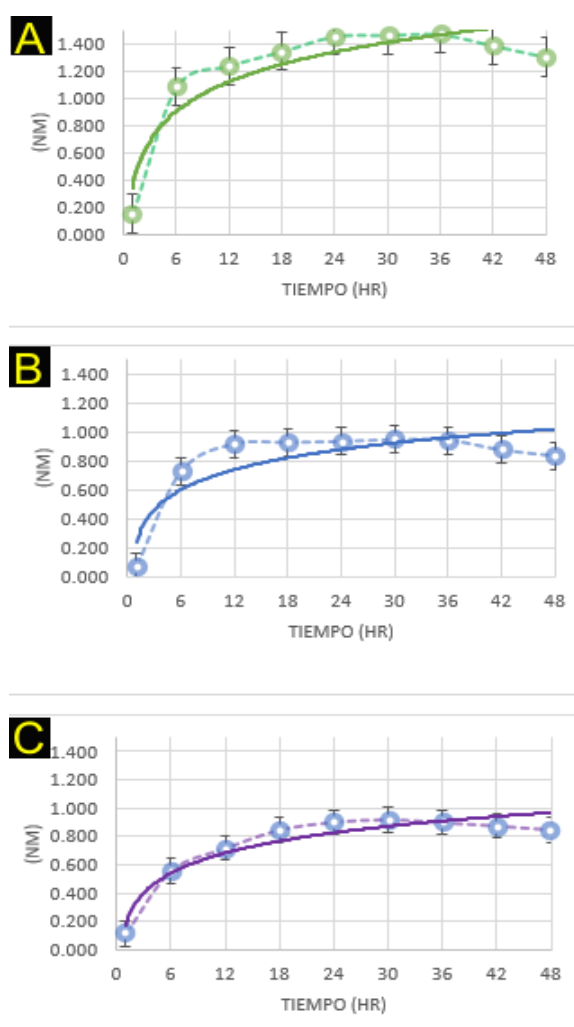


Figura 4. Medición de las curvas de crecimiento de tres cepas de *Vibrio* spp en 48 horas por triplicado ($n=3$). (A) Cepa verde (105.7 minutos). (B) Cepa azul (91 minutos). (C) Cepa morada (131.4 minutos).

7.3. Análisis bioquímico

Con base a los parámetros bioquímicos de cada cepa, se identificaron como bacilos Gram negativos, catalasa y oxidasas positivos. El perfil bioquímico al compararse en la biblioteca de GEN III, indicó que se trató de bacterias del género *Vibrio*. La cepa verde de acuerdo con la huella fenotípica que obtuvo una similitud/probabilidad con *V. alginolyticus* de 0.555, seguido de *V. harveyi* con 0.029, *V. parahaemolyticus* con 0.026 y 0.025 con *V. proteolyticus* (Tabla 5). La cepa azul obtuvo una similitud de 0.275 con *V. harveyi*, seguido de *V. splendidus* (26c) con 0.096, *V. pelagius* con 0.036, y *Photobacterium angustum* con 0.031. Finalmente, la cepa morada presentó una similitud de 0.128 con *V. tubiashii*, seguido de *V. harveyi* con 0.097, *V. splendidus* con 0.075 y como última opción resultó *V. aestuarianus* con 0.050 (Tabla V).

Tabla 5. Perfiles bioquímicos de las tres cepas de *Vibrio*.

Cepa verde

Probabilidad	Tipo de organismo	Especie
0.555	GN-NE nt	<i>V. alginolyticus</i>
0.029	GN-NE nt	<i>V. harveyi</i>
0.026	GN-NE nt	<i>V. parahaemolyticus</i>
0.025	GN-NE nt	<i>V. proteolyticus</i>

Cepa azul

Probabilidad	Tipo de organismo	Especie
0.275	GN-NE nt	<i>V. harveyi</i>
0.096	GN-NE nt	<i>V. splendidus</i>
0.036	GN-NE nt	<i>V. pelagius</i>
0.031	GN-NE nt	<i>Photobacterium angustum</i>

Cepa morada

Probabilidad	Tipo de organismo	Especie
0.128	GN-NE nt	<i>V. tubiashii</i>
0.097	GN-NE nt	<i>V. harveyi</i>
0.075	GN-NE nt	<i>V. splendidus</i>
0.050	GN-NE nt	<i>V. aestuarianus</i>

7.4. Extracción de ácidos nucleicos

Las extracciones de ADN de las tres cepas presentan bandas nítidas de un tamaño mayor 15,000 pb (Fig. 5A). Una vez corrido el gel de los productos de PCR del gen 16S ARNr presentaron bandas nítidas, con un tamaño de fragmento esperado de 1,500 pb. El control negativo (H₂O PPI) no presentó ninguna banda y el control positivo (ADN puro) que se colocó amplificó una banda del mismo tamaño de 1,500 pb (Fig. 5B). Finalmente, en la extracción de plásmidos de las tres cepas solo se extrajo ADN genómico, no se presentó ninguna banda, confirmando la ausencia de plásmidos (Fig. 5C).

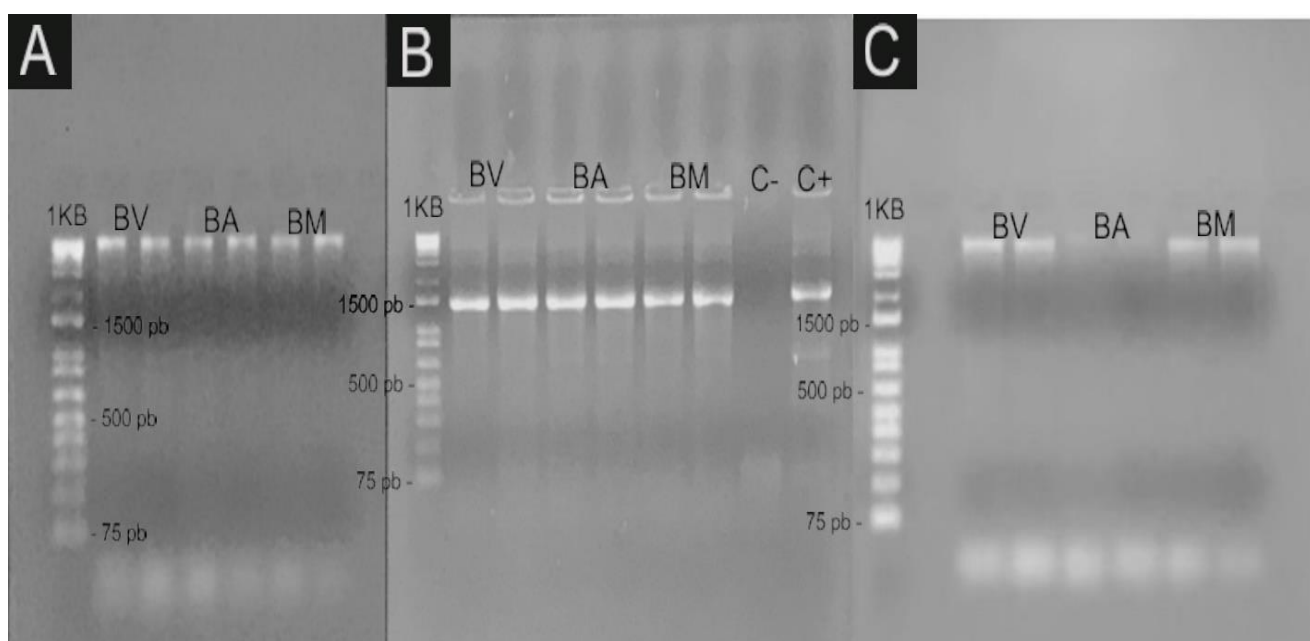


Figura 5. Análisis moleculares aplicados a las tres cepas. A) Extracción de ADN, B) Amplificación del gen 16S, C) Extracción de plásmidos de tres cepas bacterianas. BV (cepa verde), BA (cepa azul), BM (cepa morada), C+ (control positivo ADN puro), C- (control negativo H₂O PPI estéril).

7.5 Análisis filogenético

Al revisar el alineamiento de las secuencias del gen 16S ARNr obtenidas se pudieron observar zonas de variación nucleotídica. La cepa azul (BA) obtuvo un tamaño de secuencia de 1,335 pb (89 % de cobertura) y presentó una sola variación en el nucleótido en la posición 390 con respecto a la secuencia de la cepa verde. La secuencia de la cepa verde (BA) fue de 1,014 pb (67.6 % de cobertura) y presentó cinco variaciones de nucleótidos con respecto a las otras dos secuencias. La cepa morada (BM) obtuvo un tamaño de secuencia de 354 pb (23.6 % de cobertura) y no presentó ninguna variación ni cambio de nucleótido con respecto a la cepa azul y verde (Fig. 6).

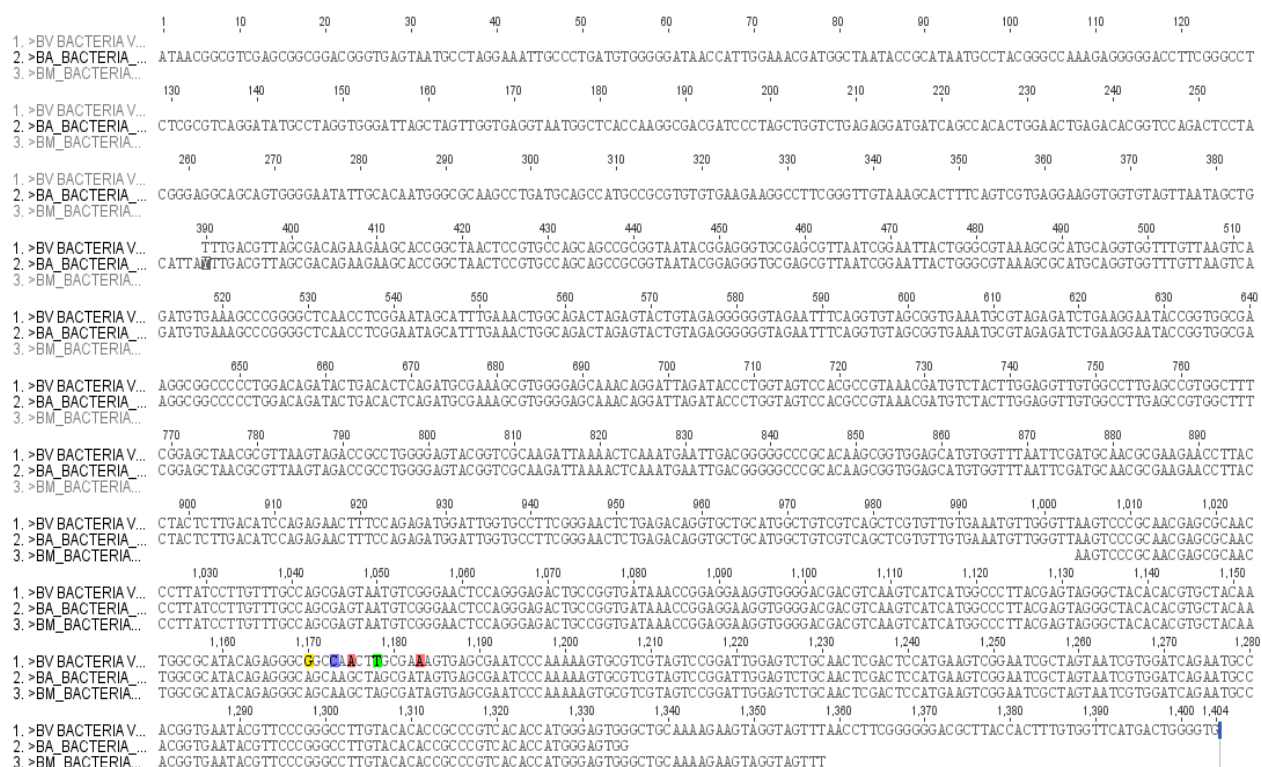


Figura 6. Alineamiento de nucleótidos del gen 16S ARNr de las tres cepas bacterianas aisladas. Recuadros de color en los alineamientos indican diferencias nucleotídicas en la secuencia. 1BV, Bacteria verde; 2BA, Bacteria azul; 3BM, Bacteria Morada.

La afiliación filogenética fue realizada comparando las secuencias del gen 16S ARNr de las tres cepas de interés, incluyendo arbitrariamente 23 cepas tipo de especies *Vibrio* con mayor similitud a nuestras cepas (de acuerdo al BLAST del NCBI y la plataforma EZbiocloud) y con una cepa externa de *Staphylococcus aureus*. Los resultados indicaron que las tres cepas estudiadas en este trabajo se relacionan filogenéticamente al género *Vibrio*. La cepa morada (BM) se relacionó a *V. littoralis* y dentro del mismo clado se encuentran *V. hibernica*, *V. algicola*. Por otra parte, la cepa azul (BA) presentó una relación cercana a *V. owensii* y en el caso de la cepa verde (BV) presentó una relación cercana con *V. alginolyticus* y dentro del mismo clado se presentó *V. natriengens* y *V. azureus* (Fig. 7).

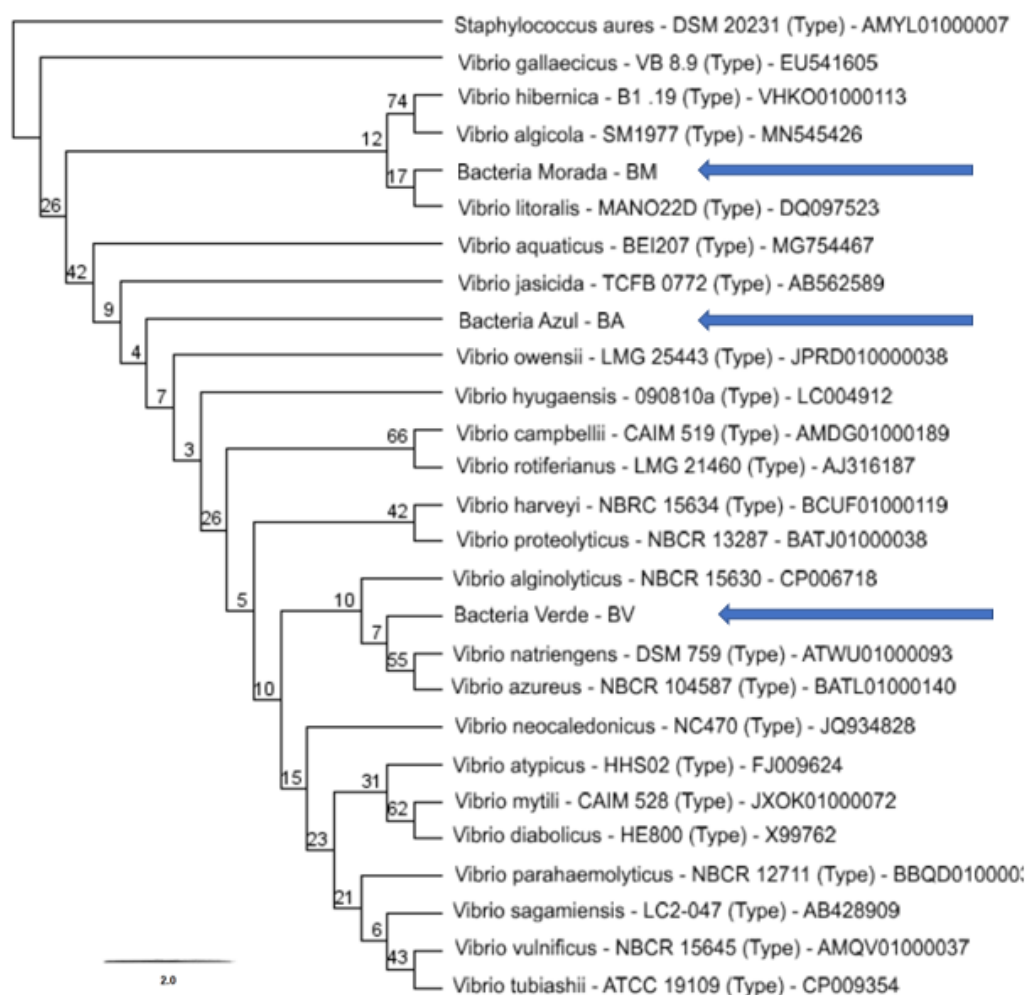


Figura 7. Árbol filogenético de *Vibrio* spp. Flecha azul indica las cepas aisladas y analizadas en este trabajo con el gen 16S ARNr. Se incluyen arbitrariamente 23 cepas tipo de especies *Vibrio* con mayor similitud a nuestras cepas de acuerdo al BLAST de NCBI y la plataforma EZbiocloud y con una cepa externa de *Staphylococcus aureus*.

7.6. Mantenimiento de organismos en cultivo

Los ejemplares de *P. vannamei* en etapa de PL's se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron una talla y peso considerable para los desafíos en el LPEA. Durante el periodo de cultivo se verificó que los parámetros físico-químicos del agua estuvieran dentro de los rangos previamente establecidos para el experimento (salinidad: 20 UPS, temperatura: $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, OD: 5.0 - 8.0 mg/L; pH 7.5 ± 0.5 ; NAT: menor que 0.5 mg/L). La aclimatación a la salinidad fue exitosa ya que ningún organismo presentó mortalidad y debido al constante mantenimiento de los parámetros físico-químicos se obtuvo el 100% de los camarones hasta el inicio de los desafíos de infección. Respecto al peso, los camarones obtuvieron una ganancia de peso mayor a 13 gramos durante la fase de aclimatación en una salinidad de 20 ups. Por otro parte, la talla final registrada por los camarones fue 14.8 ± 0.33 cm (Tabla VI).

Tabla 6. Peso y talla inicial-final de *Penaeus vannamei* mantenido a una salinidad de 20 ups durante cinco meses de cultivo.

Salinidad (ups)	Días de cultivo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Talla inicial (cm)	Talla final (cm)
20	75	0.56 ± 0.25	13.91 ± 1.97	2.42 ± 0.04	14.80 ± 0.33

7.7. Análisis de patogenicidad y signos clínicos

El primer desafío de patogenicidad con una dosis muy alta (1×10^6 UFC/mL) resultó en una mortalidad de más del 80% en 24 hpi con el tratamiento de la cepa verde, observándose daños considerables. La mortalidad que registró el desafío de la cepa azul y morada fue menor en comparación de la cepa verde, con un 20% de mortandad aproximadamente. Durante este primer bioensayo los organismos del grupo control negativo natural y control MH al 2% no presentaron ningún signo evidente de enfermedad a diferencia de los grupos desafiados.

Tabla 7. Clasificación de daños registrados durante el segundo desafío de infección con una cepa color verde a tres concentraciones diferentes en *P. vannamei*. MH, caldo de cultivo Mueller-Hinton.

	Control negativo natural	Control MH al 2% NaCl	Dosis baja (1x10³ ufc/mL)	Dosis moderada (1x10⁴ ufc/mL)	Dosis alta (1x10⁵ ufc/mL)	<u>Total</u>
Hepatopáncreas (Externo)	0	0	1	3	4	<u>8</u>
Apéndices	0	0	1	2	3	<u>7</u>
Musculo	0	0	1	1	3	<u>5</u>
Branquias	0	0	0	2	3	<u>5</u>
Lesiones cuticulares	0	0	1	2	4	<u>7</u>
Tracto digestivo vacío	0	0	0	2	3	<u>5</u>
Telson	0	0	1	3	4	<u>8</u>
Urópodos	0	0	1	3	4	<u>8</u>
<u>Total</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>6</u>	<u>18</u>	<u>28</u>	

En el segundo desafío de patogenicidad utilizando diferentes dosis de inóculo de la cepa verde, los camarones del grupo control negativo natural y MH al 2% de NaCl no presentaron daños o lesiones externas, los exoesqueletos y apéndices de los camarones no presentaron melanización, el hepatopancreas no cambió de color ni presentó daño externo y el tracto digestivo estuvo siempre lleno en los organismos del grupo control, por lo cual se les asignó un valor total de daño de cero (Fig. 8A, B). En cambio, los organismos desafiados con la cepa verde a una dilución baja (1×10^3 UFC/mL) presentaron una cantidad muy baja de daño en diferentes órganos y regiones, el signo más evidente fue la melanización en los apéndices natatorios, maxilas y en el exoesqueleto obteniendo un valor total de 6 puntos (Fig. 8C, D).

La dilución moderada (1×10^4 UFC/mL) registró un daño total de 18 puntos, debido a la melanización del exoesqueleto y apéndices, el hepatopancreas presentó cambios externos en su aspecto, forma y color. Por último, la dilución alta (1×10^5 UFC/mL) presentó los daños más evidentes, que fueron las múltiples melanizaciones en los apéndices, urópodos, telson, en el músculo se presentó un cambio de coloración a un blanco opaco y rigidez, los tractos digestivos de los camarones con la dosis alta estaban segmentados y en algunos vacíos (Fig. 8E, F).

Al tratamiento de la dilución alta se le asignó un valor total de 28 puntos, lo cual indica que es el tratamiento con mayor presencia de daño por la melanización, necrosis (Fig. 8G, H) y signos de vibriosis presentes en los camarones infectados experimentalmente (Tabla VII). En la dilución alta los órganos más afectados y que obtuvieron el puntaje más alto de 8 puntos fueron el hepatopáncreas (Fig. 8F), el telson y los urópodos con múltiples melanizaciones y necrosis externa. En el mismo contexto, el tratamiento de la dilución alta (1×10^5 UFC/mL) tuvo el mayor puntaje de daño, casi el doble que el tratamiento de la dilución moderada (1×10^4 UFC/mL) y el triple de puntos que el tratamiento de la dilución baja (1×10^3 UFC/mL) (Fig. 9).

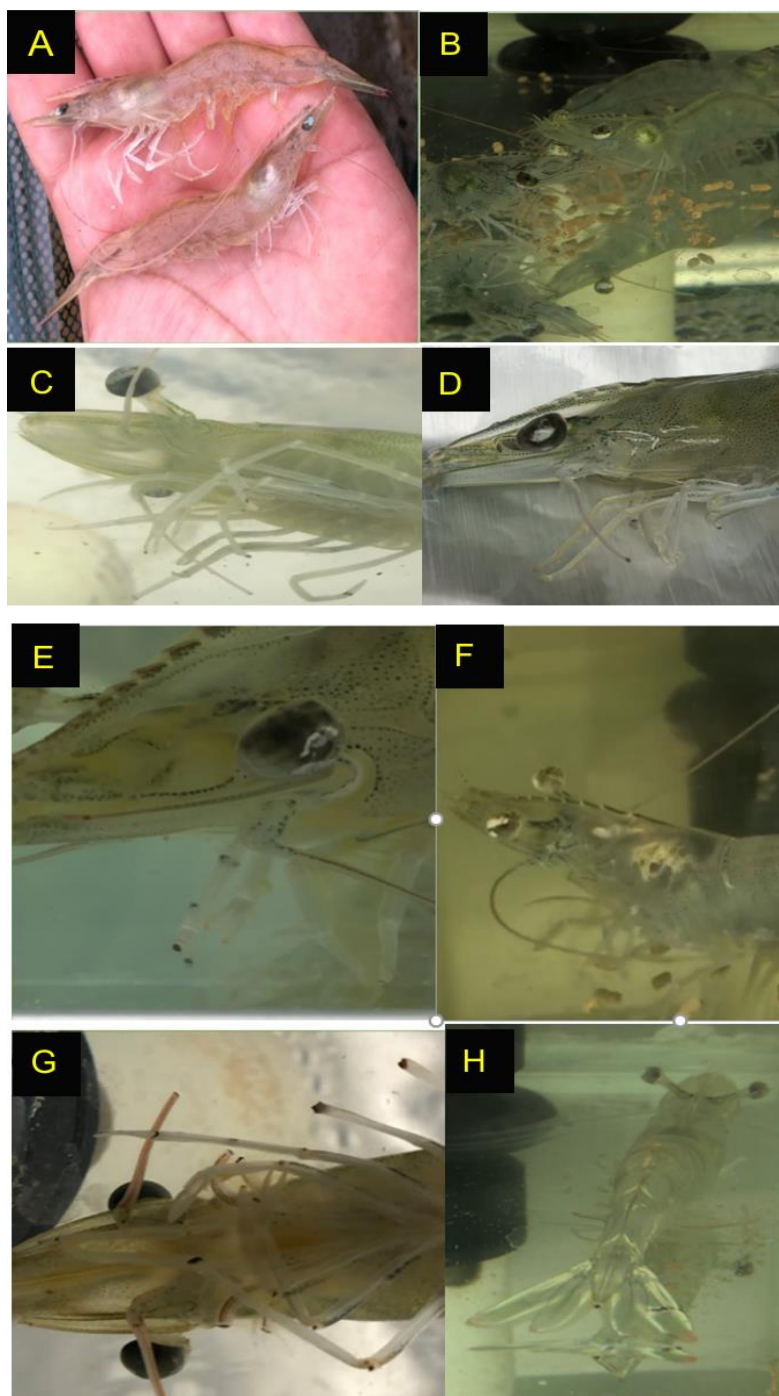


Figura 8. Daños externos registrados en *P. vannamei* desafiados a tres diferentes concentraciones del inóculo de la cepa verde. (A) Control negativo MH 2%. (B) Control negativo natural. (C) Control positivo dilución baja. (D) Control positivo dilución baja. (E) Control positivo dilución moderada. (F) Control positivo dilución moderada. (G) Control positivo dilución alta. (H) Control positivo dilución alta. Flecha negra indica melanización. Flecha blanca indica necrosis.

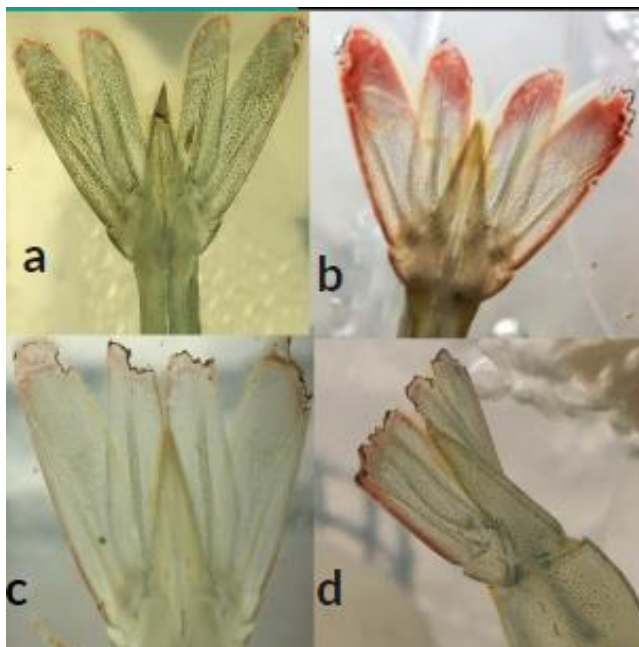


Figura 9. Daños presentados en telson y urópodos de *P. vannamei* desafiado con la cepa verde a una dilución alta. (A) 48 hpi. (B) 76 hpi. (C) 92 hpi. (D) 120 hpi.

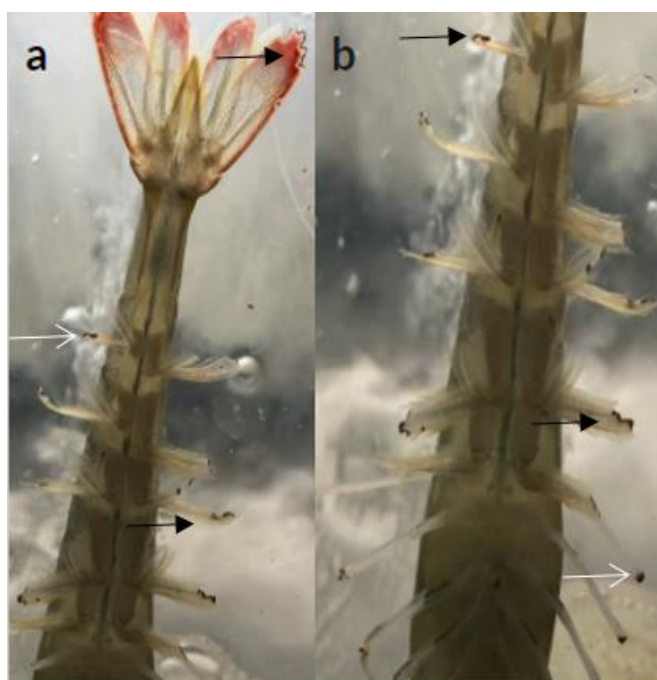


Figura 10. Daños presentados en pereiópodos, pleópodos y urópodos de *P. vannamei* desafiado con la cepa verde a una dilución alta (1×10^5 UFC/mL). Flechas negras indican focos de melanización. Flechas blancas indican necrosis (A) Camarón desafiado durante 152 hpi. (B) Amplificación de los daños causados a las 152 hpi.

El signo más evidente en la dilución alta fue la melanización multifocal en los urópodos, pleópodos y pereiópodos (Fig. 10 A). Estos daños comenzaron a presentarse aproximadamente en el día cinco de experimentación (120 hpi), acompañado de una actividad de muda muy notoria y nado errático. En algunas zonas como los pereiópodos, las melanizaciones se extendieron causando necrosis en los tejidos, con esto la amputación de la extremidad como lo fue en el caso de los quelípodos y maxilas. Debido a esta pérdida y amputación los organismos eran incapaces de alimentarse de manera adecuada por los que se comenzó a presentar la segmentación y espacios vacíos en el intestino (Fig. 10 B).

7.8. Comprobación de postulados de Koch.

De cinco camarones clasificado como controles positivos desafiados con la cepa verde a una concentración alta (1×10^5 UFC/mL), se les extrajo hemolinfa y al ser inoculada en el medio de cultivo cromogénico Vibrio Chromo Select Agar y el medio de cultivo selectivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (Fig. 11A, C), se presentó el crecimiento de dos colonias distintas, unas colonias azules fuerte y otras colonias verdes con el borde color crema en el medio cromogénico VCSA, en el medio selectivo TCBS se presentaron colonias color amarillas de distinto tamaño y forma.

Se procedió con la purificación de estas colonias hasta obtener colonias de color azul y tres colonias verdes con borde claro completamente aisladas (Fig. 11B). Como último, del medio TCBS se purificaron colonias amarillas, estas se inocularon en otro medio cromogénico HardyCHROME™. Se presentaron dos colores diferentes en las colonias que crecieron, siendo las colonias verdes las más dominantes, seguidas de las colonias color moradas (Fig. 11D).

Las colonias verdes se purificaron hasta el punto que se obtuvieron colonias verdes completamente aisladas en medio de cultivo HardyCHROME™. Se comprobó que las colonias recuperadas de la hemolinfa presentaron las características de la cepa verde antes descritas en la sección 8.1.

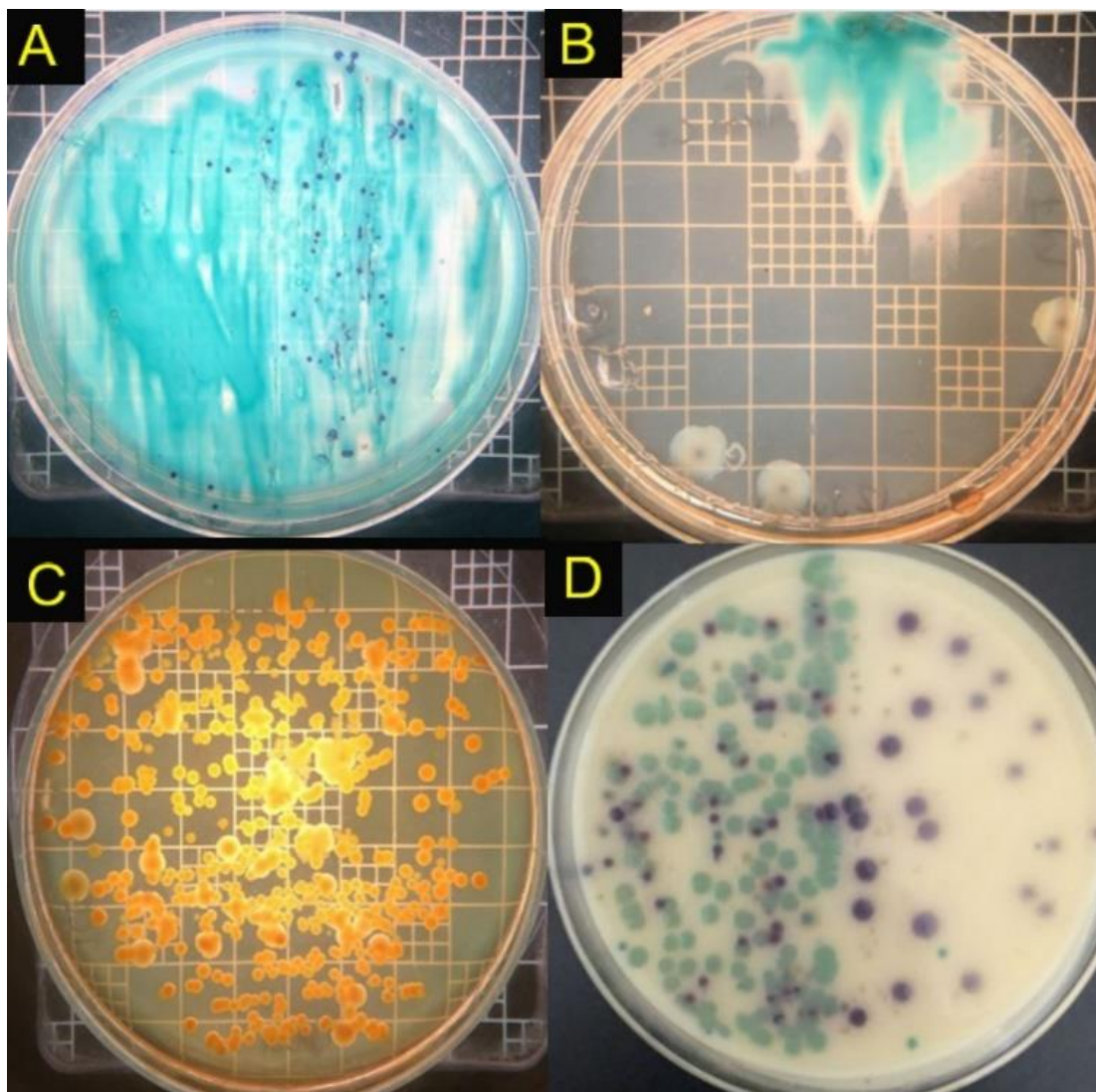


Figura 11. Siembra de hemolinfa de *P. vannamei* desafiado con una cepa de *V. alginolyticus* a una dilución muy alta (1×10^6) durante 12 días. (A) Medio de cultivo Vibrio Chromo Select Agar (VCSA) a las 24 horas de inoculado. (B) Medio de cultivo VCSA con colonias verdes purificadas de una muestra de hemolinfa de un control positivo. (C) Medio de cultivo TCBS inoculado con 100 μ L de hemolinfa de un control positivo. (D) Medio de cultivo HardyCHROME inoculado con 100 μ L de hemolinfa de un control positivo de la dilución alta.

Los camarones infectados de forma experimental con la cepa verde re-aislada de hemolinfa desarrollaron el mismo cuadro clínico al que presentaron los camarones desafiados inicialmente con la cepa verde a una dilución alta, como lo fue el nado errático, tracto digestivo semi vacío y coloración rosa de los apéndices. Además, se presentó melanización y necrosis multifocal externa muy característica de esta cepa verde en los camarones desafiados (Fig. 12A), con cambios y forma del hepatopáncreas. La extracción de hemolinfa al ser inoculada

en medio de cultivo HC presentó una abundante cantidad de colonias verdes con borde claro y una cantidad baja de colonias moradas (Fig. 12B). De esta muestra se tomó una colonia verde aislada y se resembró en el mismo medio de cultivo y se presentó una coloración verde con puntos color morados (Fig. 12C). En el sexto pase de purificación se obtuvo un crecimiento de colonias verdes totalmente puras (Fig. 12D).

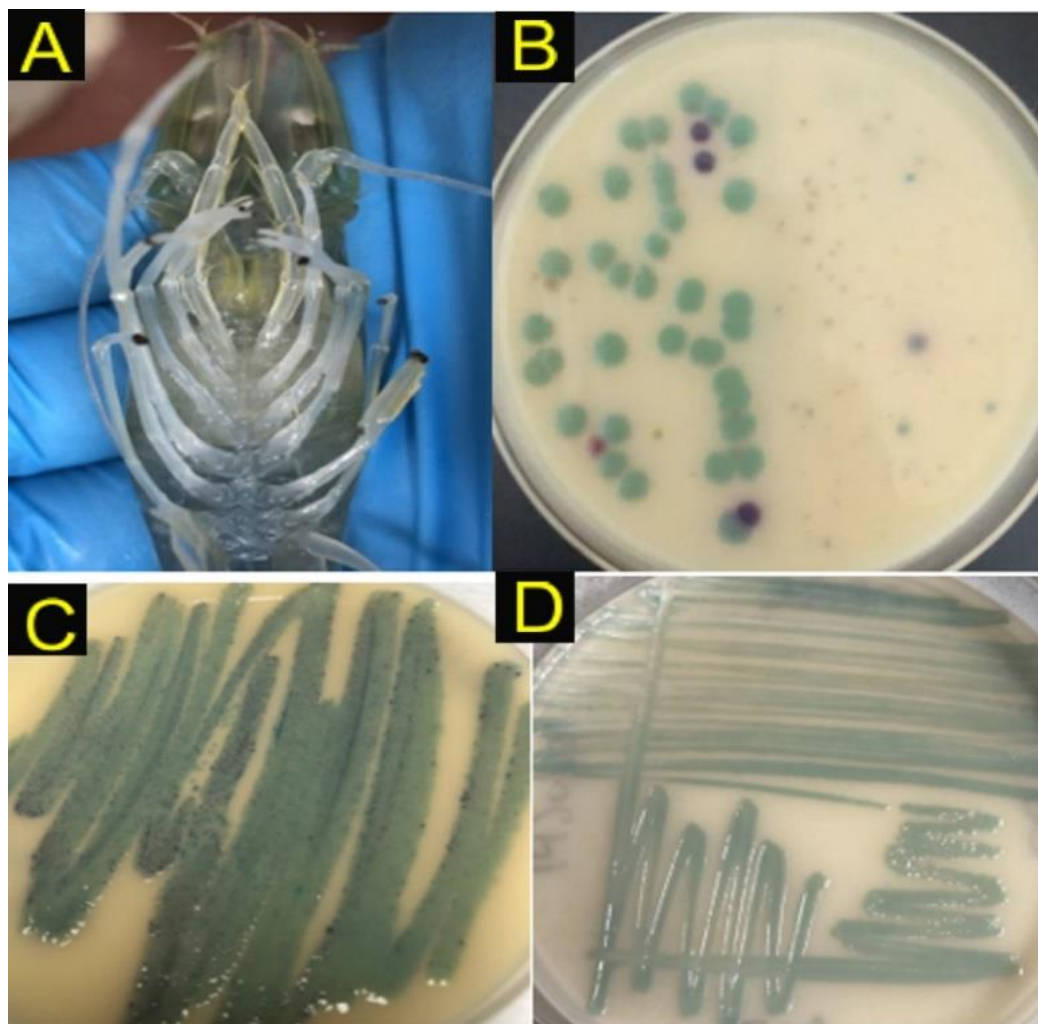


Figura 12. Siembra de hemolinfa de *P. vannamei* desafiado con la cepa verde a una dilución alta. (A) Camarón infectado con la cepa verde con daños evidentes característicos de la infección. (B) Muestra de hemolinfa de camarón inoculada en medio HC. (C) Re-aislamiento y purificación de las colonias de la cepa verde. (D) Cepa verde purificada a partir de hemolinfa de camarones infectados experimentalmente.

7.9. Caracterización histológica

En la histología realizada a un camarón del control natural y otro camarón del control MH al 2% de NaCl, en los dos casos se observó el hepatopáncreas en buen estado, sin presencia de encapsulamientos, nódulos e intrusiones hemocíticas, los túbulos no presentaron cambio en su forma ni desprendimiento epitelial. Se observan reservas lipídicas y los núcleos tienen una apariencia normal, sin atrofia después de cinco días de desafío (Fig. 13A). En el mismo lapso de tiempo se presentó un organismo del tratamiento positivo infectado con la cepa verde a dilución alta, con daños externos evidentes y el color de hepatopáncreas cambió a un color café claro con puntos oscuros y el nado errático fue evidente, el análisis histológico reveló algunas intrusiones hemocítica (Fig. 13B).

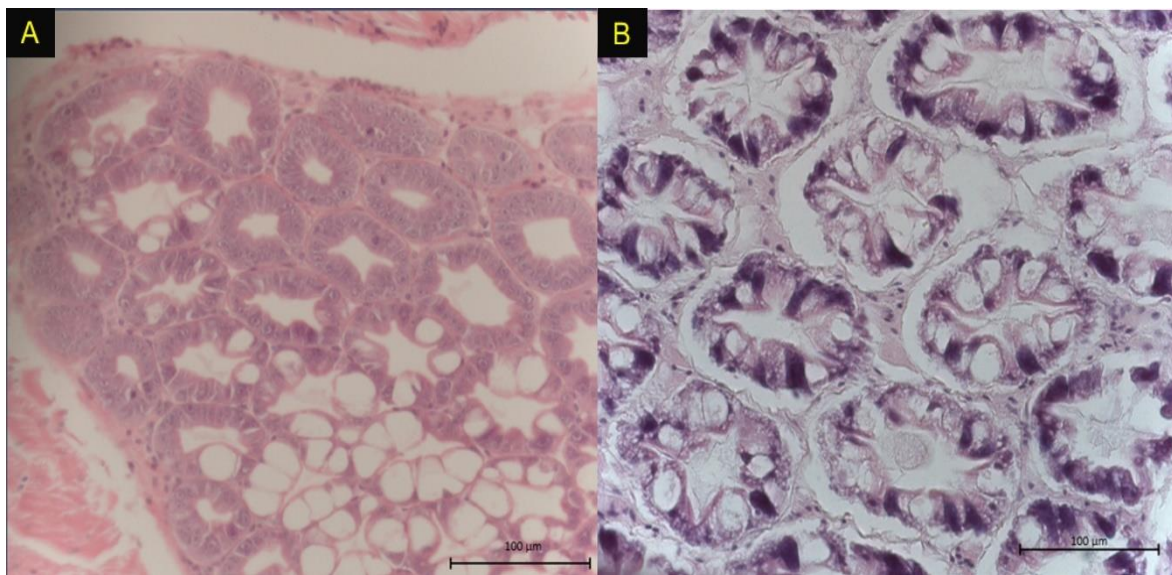


Figura 13. Histología de hepatopáncreas (HP) de *P. vannamei* desafiado con la cepa verde a una dilución alta durante cinco días. (A) HP de camarón control del control MH 2% al NaCl. (B) HP de camarón desafiado con dosis alta 1×10^5 UFC/mL. Tinción H&E 40X.

A los 12 y 18 días post infección la histología de los hepatopáncreas de los organismos de los controles naturales y MH 2% de NaCl, no presentaron ningún daño, lesión o cambio de aspecto (Fig. 14A, B). Por otra parte, el hepatopáncreas de un camarón control positivo desafiado durante 12 días a una dilución alta, presentó un desprendimiento de células epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos, con pérdida y adelgazamiento del tejido epitelial. Estos presentaron diferentes grados de atrofia, con una modificación y engrosamiento de tejido conectivo debido a la displasia generada por la infección, con presencia zonas evidentes eosinófilas (Fig. 14C). Además, se puede observar un

hepatopáncreas desafiado durante 18 días, en este se presentaron múltiples intrusiones y nódulos hemocíticos basófilos con adelgazamiento del tejido epitelial y una modificación evidente con encapsulamientos e incremento de hemocitos y fibras de colágeno. Se presentan melanizaciones y necrosis multifocales de los túbulos hepatopancreáticos (Fig. 14D).

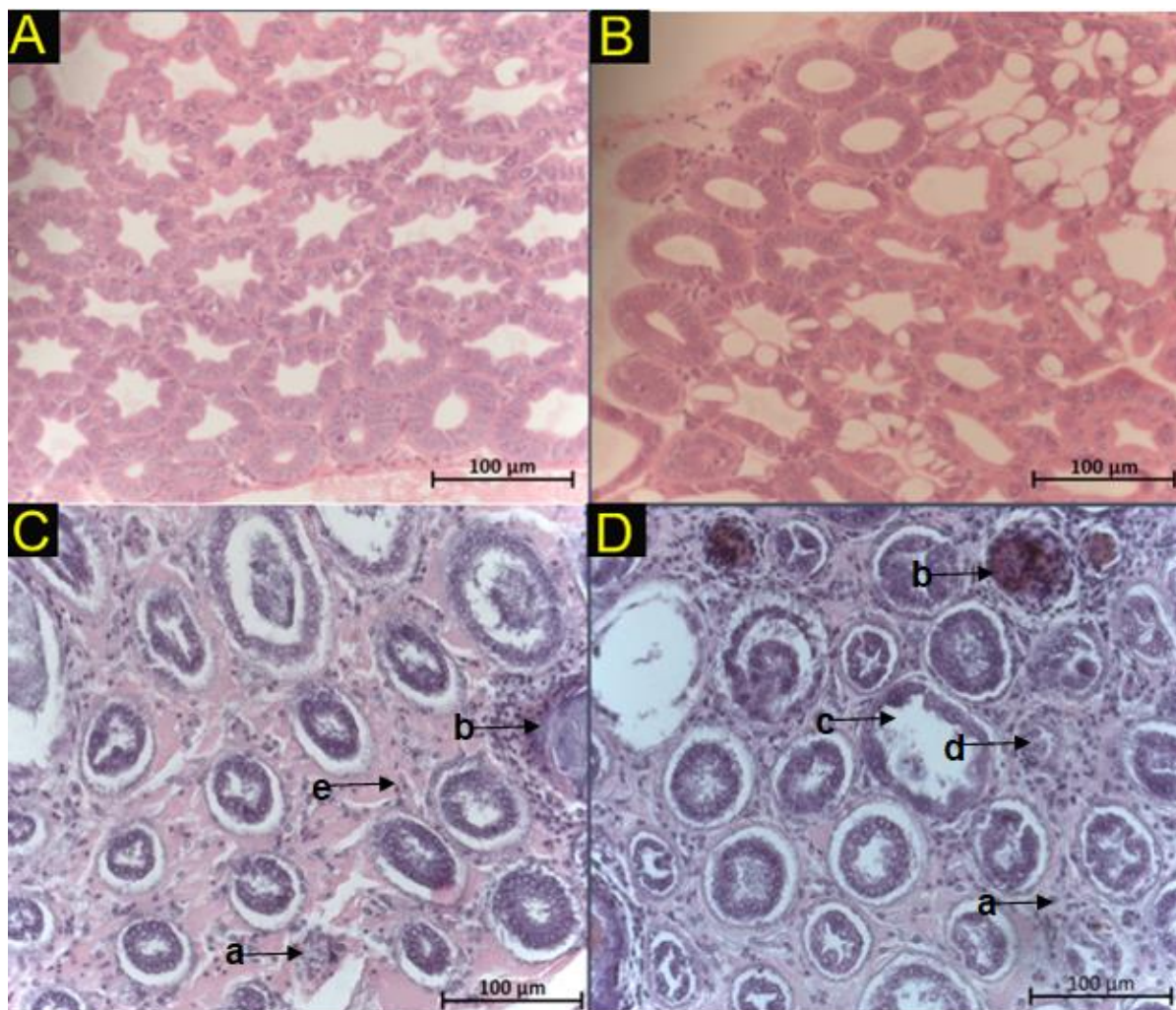


Figura 14. Histología de hepatopáncreas (HP) de *P. vannamei* desafiados con la cepa verde en diferentes tiempos post infección. (A) HP de control natural durante 12 días. (B) HP de control Mueller-Hinton al 2% de NaCl después de 18 días. (C) HP de camarón desafiado con la bacteria verde a una concentración alta de 1×10^5 UFC/mL durante 12 días. (D) HP de camarón desafiado con la cepa verde a una concentración alta de 1×10^5 UFC/mL durante 18 días. (a) Intrusión hemocítica. (b) Melanización y necrosis de los túbulos del hepatopáncreas. (c) Desprendimiento epitelial. (d) Encapsulamiento. (e) Displasia. Tinción H&E. 40X.

A los 22 días post infección en los tratamientos de control natural y control MH al 2% de NaCl, se observaron los hepatopáncreas en buen estado sin daños evidentes (Fig. 15A, B). En cambio, en un organismo desafiado con la cepa verde a una dilución alta, se presentan múltiples melanizaciones en los túbulos del hepatopáncreas, así como nódulos hemocíticos. Además, se presenta un grado alto de modificación y engrosamiento del tejido epitelial con una presencia abundante de intrusiones hemocíticas (Fig. 15C, D). En la histología del hepatopáncreas de los controles positivos de la cepa verde, repetidamente se presentó la melanización y necrosis multifocal en los túbulos hepatopancreáticos con múltiples intrusiones hemocíticas, encapsulamiento y diferentes grados de modificación del tejido epitelial (Fig. 16 B).

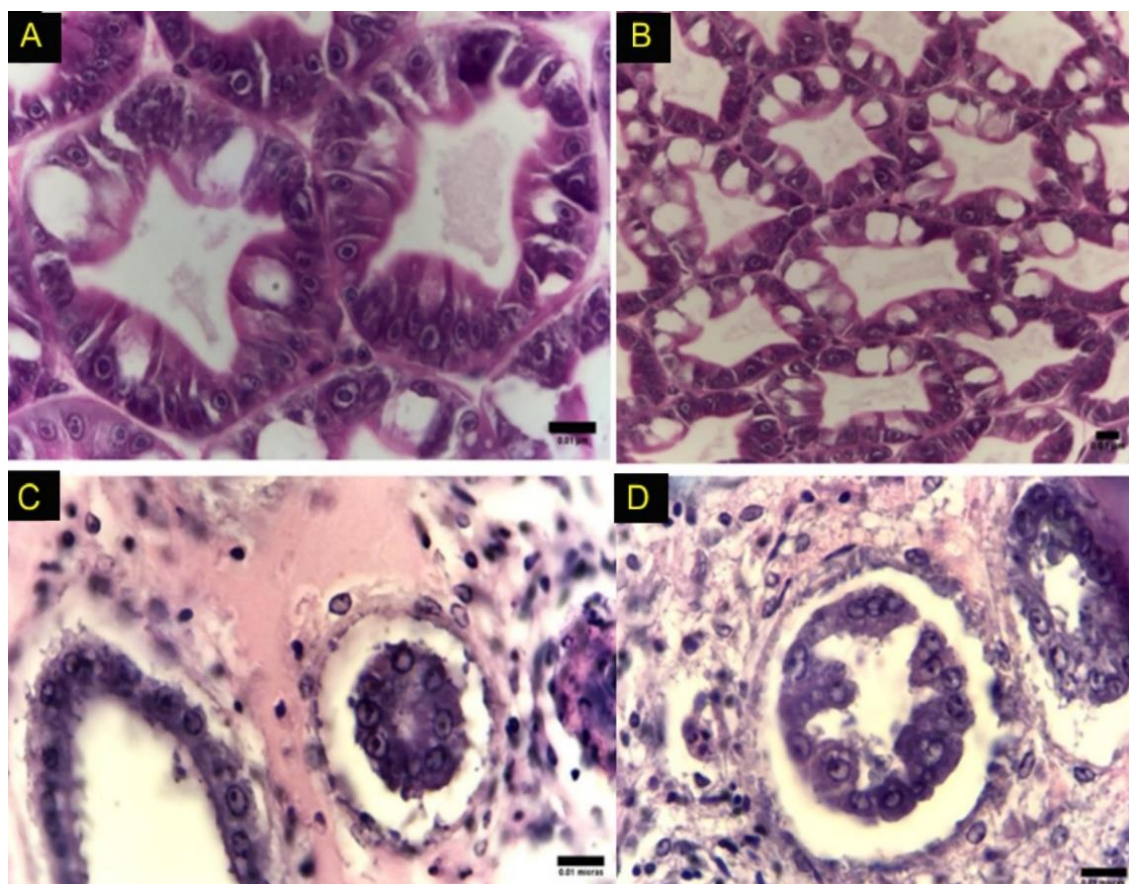


Figura 15. Histología de hepatopáncreas (HP) de *P. vannamei* desafiado con la cepa verde en diferentes tiempos post infección. (A) HP de camarón del control MH al 2% de NaCl. (B) HP de camarón del control natural. (C) HP de camarón desafiado con dosis alta 1×10^5 UFC/mL durante 17 días post-infección. (D) HP de camarón desafiado con dosis alta 1×10^5 UFC/mL durante 20 dpi. Tinción H&E. 100X.

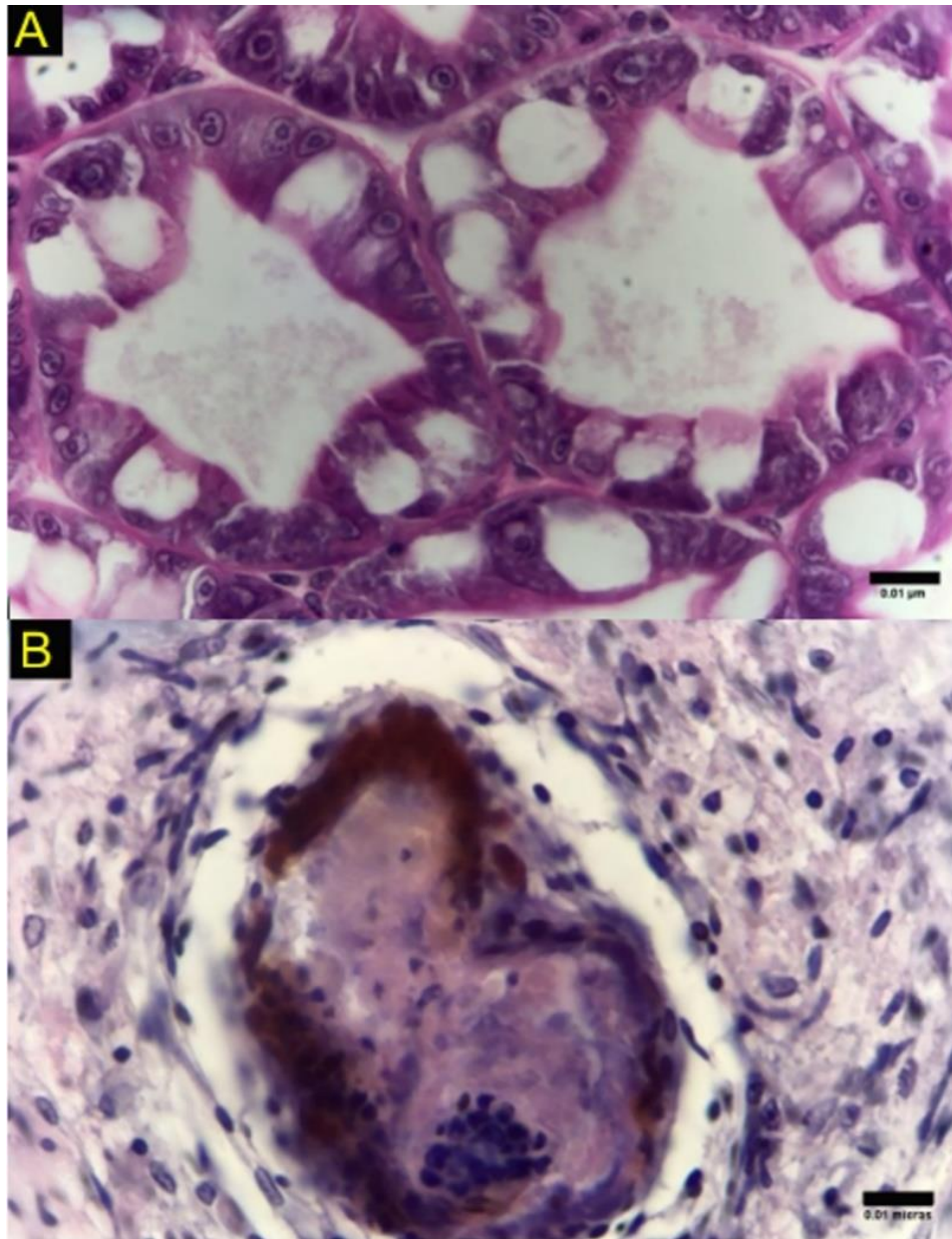


Figura 16. Amplificación de un túbulo de hepatopáncreas de *P. vannamei* desafiado con una dilución alta de la cepa verde. (A) HP de camarón del tratamiento control negativo. (B) HP de camarón desafiado con dosis alta de la cepa verde (1×10^5 UFC/mL). Tinción H&E. 100X.

En los hepatopáncreas de los camarones de los controles negativos no se presentó ningún daño aparente y lucían en buen estado (Fig. 16 A, Fig. 17 A). En cambio, los camarones desafiados con la dilución alta de 1×10^5 UFC/mL presentaron daños evidentes como la melanización y necrosis multifocal en los túbulos hepatopancreáticos, con nódulos y encapsulamientos en los túbulos del

hepatopáncreas (Fig. 16 B) con presencia de intrusiones hemocíticas multifocales, formación de nódulos, diferentes grados de modificación del tejido y presencia de bacterias (Fig. 17 B).

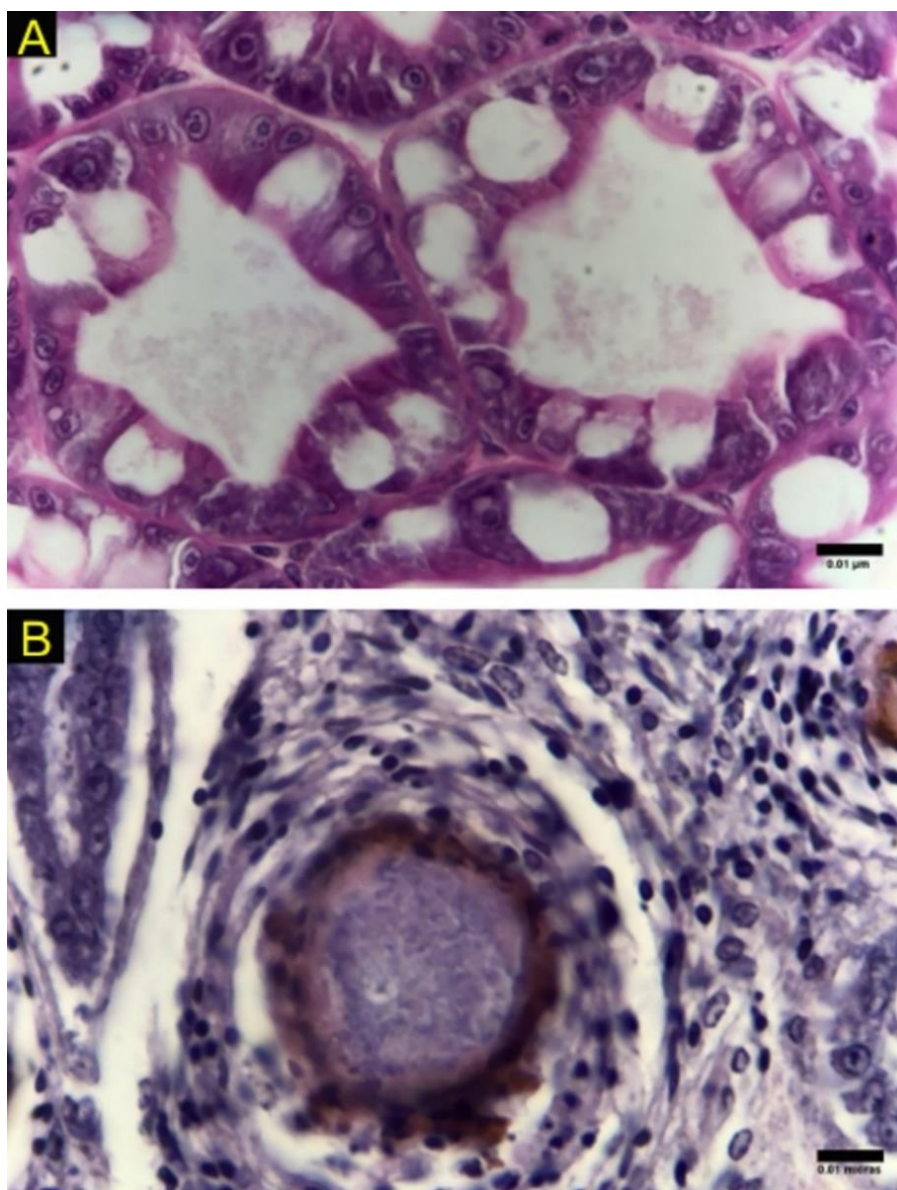


Figura 17. Amplificación de un túbulo de hepatopáncreas de *P. vannamei* desafiado con una dilución alta de la cepa verde. (A) HP de camarón del tratamiento control MH al 2% de NaCl. (B) Amplificación de túbulo hepatopancreático de camarón desafiado con una dosis alta de la cepa verde (1×10^5 UFC/mL). Tinción H&E. 100X.

7.10. Mortalidad/Sobrevivencia

Durante el primer desafío de patogenicidad con una dosis muy alta 1×10^6 UFC/mL, los camarones infectados con la cepa verde comenzaron a presentar signos de enfermedad aproximadamente a las 4 horas post-infección (hpi) y una mortalidad considerable en los rangos de 14-36 hpi. Posterior a este rango de tiempo ya no se registró ningún organismo muerto, solamente desarrollaron signos clínicos y daños externos hasta las 168 horas finales del bioensayo. La cepa azul causó signos de enfermedad y registró las primeras mortalidades en los rangos de 25-28 hpi, después se presentó un organismo muerto a las 168 hpi y posterior a este tiempo ya no se registró ningún camarón muerto. Por otra parte, la cepa morada no presentó ningún signo de enfermedad o comportamiento anómalo y se registraron organismos muertos a las 24, 60, 117 y 154 hpi (Fig. 18). Con base a este análisis preliminar se determinó que la dilución de 1×10^6 UFC/mL fue una dosis muy alta, por lo cual se seleccionaron las siguientes diluciones 1×10^5 UFC/mL, 1×10^4 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL, como dosis alta, moderada y baja respectivamente para ser utilizadas en el segundo bioensayo, solamente utilizando la cepa verde (Fig. 19). Ya que la cepa morada y azul no fueron significativamente diferentes de los controles.

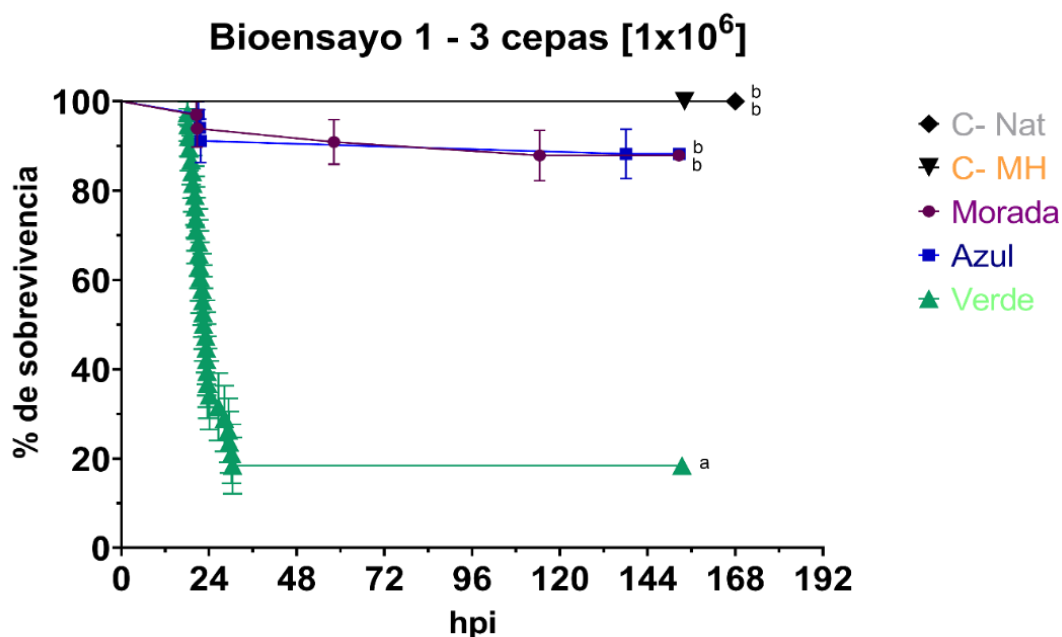


Figura 18. Curvas de sobrevivencia de *P. vannamei* desafiado con tres cepas de *Vibrio* spp. a una dosis muy alta. ^a, ^b, – Las curvas que llevan superíndices diferentes representan diferencias significativas con prueba de pendientes ($p \leq 0.05$).

Para el segundo desafío de patogenicidad el grupo control natural y control Mueller-Hinton al 2% de NaCl, no presentaron organismos muertos, no se presentaron lesiones o signología que indicaran signos de vibriosis durante todo el experimento. La dilución baja de la cepa verde presentó el primer organismo muerto a las 24 hpi sin ningún daño externo o evidente de vibriosis, después a las 456 hpi se presentó el siguiente organismo muerto. Se observaron algunas manchas oscuras en los apéndices y rostrum, el tracto digestivo estaba casi lleno y a las 528 hpi y posterior a ese tiempo, se presentaron los últimos organismos muertos con los mismos signos, poca melanización en los apéndices y rostrum, con tractos digestivos casi llenos.

En cambio, la dilución moderada comenzó a presentar los primeros signos de infección a las 120 hpi, los organismos redujeron su actividad natatoria y la ingesta de alimento, con esto se empezaron a presentar los primeros tractos digestivos segmentados. La melanización se presentó a las 172 hpi en los apéndices, urópodos y telson. Durante este periodo de tiempo los organismos estuvieron mudando cada nueve días aproximadamente, las mudas presentaban múltiples áreas con melanización y se tornaron de color rosa. A las 432 hpi los signos clínicos en los camarones aumentaron, presentándose más daños en los urópodos, los tractos digestivos segmentados, quelípodos y pereiópodos con necrosis por la melanización y amputados, daño en el rostrum, antenas y anténulas. El nado errático se comenzó a presentar a las 480 hpi, el músculo se tornó opaco de color blanco y rígido, también los organismos dejaron de ingerir alimento y las múltiples melanizaciones eran más evidentes.

La dilución alta comenzó a presentar signos de enfermedad a las 8 hpi, organismos desafiados comenzaron a reducir su actividad natatoria y los reflejos disminuyeron al igual que la ingesta de alimento. Los daños más evidentes comenzaron aproximadamente a las 132 hpi, con presencia de múltiples melanizaciones en diferentes zonas del exoesqueleto, apéndices, pereiópodos, telson y urópodos. El proceso de muda se intensificó más en esta dilución ya que cada seis días los camarones mudaron, en algunos casos los organismos no podían llevar a cabo el proceso de manera adecuada y morían, posterior a este tiempo los tractos digestivos se observaron casi vacíos y en algunos casos los camarones tenían una coloración rosa. Los pleópodos presentaron un grado de melanización alto y se observaron regiones con necrosis, al igual que en los pereiópodos, quelípodos y maxilas. Después de las 360 hpi los camarones dejaron de mudar, el músculo se comenzó a opacar y se tornó de color blanco, con melanizaciones en los bordes de los segmentos abdominales (Fig. 19).

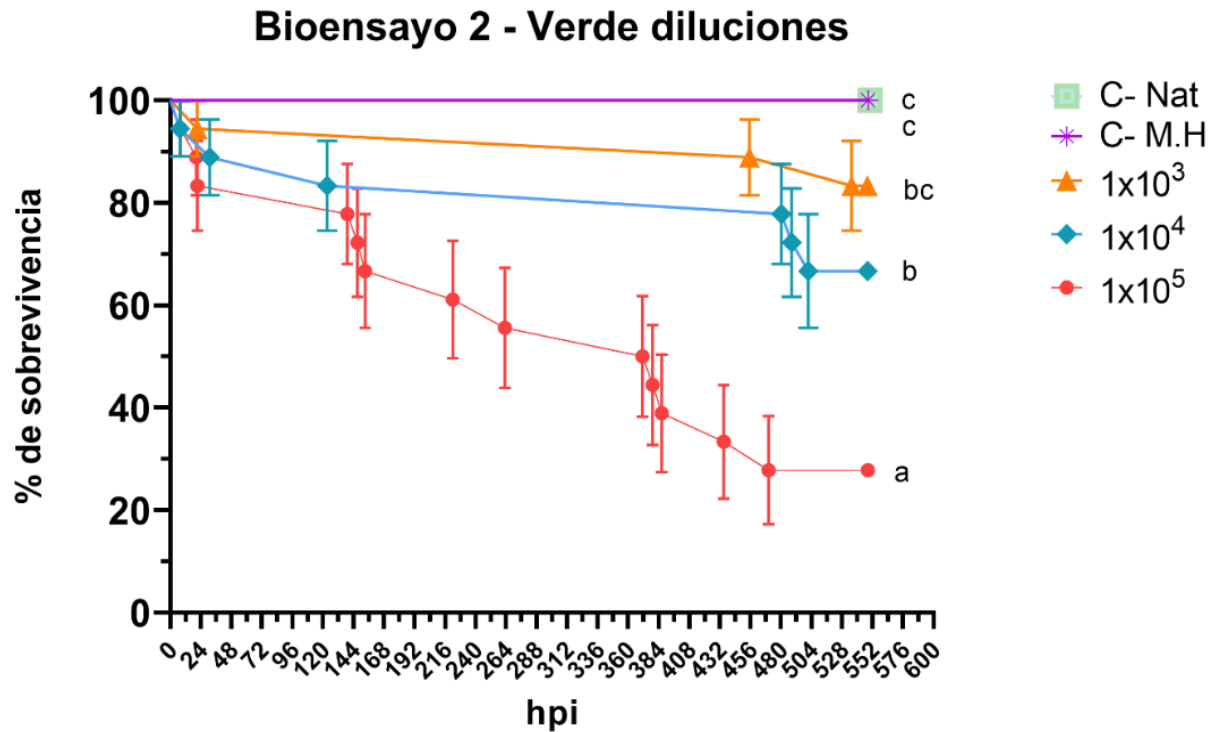


Figura 19. Curva de sobrevivencia de *P. vannamei* desafiado con la cepa de *Vibrio* sp. a tres diferentes dosis infectivas. ^a, ^b, ^c - Las curvas que llevan superíndices diferentes representan diferencias significativas con prueba de pendientes ($p \leq 0.05$).

Tabla 8. Comparación de la enfermedad del AHPND y la vibriosis generada por la cepa verde en *Penaeus vannamei*.

	AHPND	Cepa verde
Especie	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. campbellii</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. owensii</i> y <i>V. punensis</i> . (Soto et. al., 2015)	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Tiempo de mortalidad	18 - 48 hpi (Soto et. al., 2015)	120 – 600 hpi
% de mortalidad	100 (Soto et. al., 2015)	80
Daño externo	Músculo opaco Nado errático Cambio de forma y color del HP (Soto et. al., 2015)	Melanización y necrosis de maxilas, pleópodos, pereiópodos y quelípodos con coloración rosa y nado errático
Color del cuerpo	Rosa o café	Azul-verde / Blanco – rosa
Daño interno	Intrusiones hemocíticas, daño en túbulos de HP con pérdida de su estructura, órgano linfoide y estómago. (Soto et. al., 2015)	No se desprende en su totalidad el epitelio de los túbulos HP, intrusiones hemocíticas y daño en HP, aunque mantiene su estructura.
Hepatopáncreas	Melanización y necrosis de túbulos, desprendimiento epitelial masivo y perdida de estructura e integridad de los túbulos, (Soto et. al., 2015)	Melanización y necrosis multifocal de los túbulos, con desprendimiento epitelial, sin pérdida de la integridad del órgano
Color de corazón	No reportado	Negro (70% del órgano se tornó oscuro)
Genoma, plásmidos Pir A, B	Si	No detectado

HP: Hepatopáncreas.

VIII. Discusión

Las muestras de agua de mar al ser procesadas e inoculadas con base en el protocolo mencionado en la sección 6.1 (párrafo 1 y 2), resultó adecuado para la **obtención y aislamiento de bacterias** del género *Vibrio* con potencial patogénico (Hug et. al., 2012). La variación total en la comunidad bacteriana específica, de las muestras de agua de mar durante los 3 días en que se realizaron los análisis fue replicable, por la presencia y abundancia de colonias moradas, azules y verdes sobre el medio de cultivo cromogénico HardyCHROM™ (HC). Además, se relacionó el color de colonia a una especie presuntiva que indicó la guía del fabricante (Hardy Diagnostic, 2011). Por otra parte, las colonias que presentaron color crema/perla, anaranjado y rosa, durante los muestreos del agua de mar con medio HC, se descartaron debido al poco crecimiento y dominancia que presentaron en HC y a la poca información sobre las posibles especies. La presencia de colonias de diferentes colores en los medios cromogénicos, es un claro indicativo de la gran variedad y abundancia de bacterias del género *Vibrio*. Estas se presentan de forma natural en el agua de mar y pueden ser aisladas efectivamente, ya que estos son medios selectivos para *Vibrio* (Canal et al. 2017; Galaviz et al., 2018).

Los **medios de cultivo selectivos cromogénicos** HardyCHROM™ (HC), CHROMagar™ *Vibrio* (CAV), *Vibrio* Chromogenic Agar (VCA) y *Vibrio* Chromo Select Agar (VCSA) se han implementado para la detección y aislamiento específico de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*, ya que logran la diferenciación y aislamiento entre especies, basada en una reacción cromogénica patentada (Cano et. al., 2010). Y esto se debe a que cada cepa tiene una acción enzimática específica que genera el color de la colonia por la reacción de la enzima beta-galactosidasa del medio de cultivo (Canal et al., 2017; Galaviz et al., 2018; Hong et al., 2020).

Con base en la guía de los fabricantes de los medios de cultivo, la bacteria verde en medio HC y VCSA fue positivo para *V. parahaemolyticus*, en medio específico TCBS indicó que es un *Vibrio* sacarosa positivo, el medio de cultivo CA fue positivo para *V. alginolyticus*. Por último, en el medio de cultivo VCA la bacteria verde presentó colonias incoloras con el centro de color azul claro, en base a la guía del fabricante se trata de *V. alginolyticus*, pero cabe resaltar que la presencia de tonalidades azules en las colonias de esta bacteria, podría interpretarse como positivo para *V. parahaemolyticus*. Por otra parte, la bacteria azul en medio de cultivo HC y VCSA no fue referida a ninguna especie que presente colonias azules, pero si las colonias color moradas (ya que cambian de coloración azul a

morada a las 48 horas de incubación). Estas serían indicativas de *V. cholerae*, en TCBS indica que es otro *Vibrio* sacarosa positivo, en CA resultó positivo para *V. parahaemolyticus* y en VCA no fue referida a ninguna especie con el color de colonias que presentó. Finalmente, la bacteria morada en el medio HC resultó *V. vulnificus*. El medio de cultivo TCBS fue indicativo de que se trata de otro *Vibrio* sacarosa positivo. En el medio de cultivo VCSA, CA y VCA el color que presentaron las colonias fue distinto en cada uno y sin ningún indicio de la especie en la guía del fabricante (Ver síntesis de resultados en la tabla IV).

Una característica particular de la bacteria verde es que presentó iridiscencia en el medio de cultivo TSA al 2% de NaCl, aunque se ha reportado muy poco sobre la iridiscencia y la función que cumple en las bacterias. Algunos autores sugieren que la iridiscencia tipo arcoíris difusa en bacterias, se presenta generalmente en las colonias del mucus, encapsulados y de bacterias patógenas (Kientz et. al., 2012). En distintas especies, la importancia biológica de la coloración estructural o iridiscencia se relaciona a diferentes aspectos como, por ejemplo; la regulación térmica y la señalización intra-especies, entre otras (Johansen et. al., 2018). La única especie reportada de *Vibrio* que presenta iridiscencia es una cepa de *V. cholerae*, esta característica se asoció a un arreglo celular que presentan las colonias de esta especie (CDC, 2010). Cabe resaltar que esta propiedad es de interés biotecnológico, para la elaboración de materiales ópticos vivos como pinturas y sensores vivos, que pueden ser aplicados para cambiar de coloración bajo estímulos externos e interactuar con otros tejidos vivos, además de que pueden ser aplicados como fotoprotección (Johansen et. al., 2018).

Otra diferencia notable de la cepa verde fue el crecimiento poco descrito y clasificado como tipo enjambre rápido (Bottcher et. al., 2016). Este no se presentó en la cepa azul ni la cepa morada, este crecimiento se ha asociado a la migración rápida y de forma coordinada de las células bacterianas a través de las superficies, lo que le permite una mayor colonización en lapsos de tiempo más cortos. Además, este crecimiento se ha relacionado a mecanismos de virulencia, la resistencia a los antibióticos y ha sido descrito previamente en diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Bottcher et. al., 2016).

La cepa verde presentó colonias incoloras en los medios CA y VCA, excepto por el medio HC y VCSA en el cual obtuvo colonias de color verde claro o azul-verde. Esta discrepancia en el color de colonias, se puede deber a que presenta una asimilación de los nutrientes del medio de cultivo similar a *V. parahaemolyticus* y debido a estas características los medios cromogénicos no pueden diferenciar de manera correcta y precisa. Existe la posibilidad de registrar

falsos positivos, si solo se hace un análisis fenotípico y microbiológico de las colonias aisladas, por lo que se recomienda complementar estos resultados con análisis más específicos. Fenotípicamente se ha caracterizado e identificado diferentes especies del género *Vibrio* utilizando el medio de cultivo específico TCBS y medios de cultivo cromogénicos. Las colonias aisladas e identificadas como cepas pertenecientes a *V. alginolyticus* presentaron colonias amarillas en TCBS (Galaviz et. al., 2018) e incoloras en la mayoría de los medios cromogénicos (Canal et. al., 2017).

La cepa azul que generó colonias color malva en medio de cultivo CAV y colonias amarillas en medio TCBS, coinciden con la caracterización microbiológica que reportan Goulden et. al. (2012) y Liu et al. (2018). Estos últimos estudiaron una cepa de *V. owensii* con los genes virulentos del AHPND y con un alto índice de mortalidad, en el medio cromogénico que utilizaron (CAV) la bacteria presentó colonias de color malva y en TCBS obtuvieron colonias de color amarillas. Se considera que fenotípicamente estas dos cepas son similares, sin embargo, genotípicamente estas cepas podrían ser diferentes por los genes de virulencia que presentan y el impacto negativo que pueden ocasionan en los sistemas de cultivo (Hai et. al., 2013; Paul et. al., 1992). La principal desventaja de los medios de cultivo selectivos cromogénicos, es que no tienen la capacidad de distinguir en base a las características morfológicas, las bacterias con potencial patogénico y las bacterias no patógenas, por lo que sigue siendo necesaria la identificación genética.

Respecto a la **cinética de crecimiento** de las tres cepas aisladas en este trabajo, presentaron la fase exponencial en un lapso de tiempo de 91, 105.7 y 131.4 minutos (1.5 - 2.2 horas) de incubación. La cepa verde presentó un tiempo de duplicación de 105.7 minutos; sin embargo, no fue el más rápido a pesar de la acelerada colonización de los medios de cultivo. En cambio, la cepa azul se duplica más rápido en 91 minutos, a diferencia de la cepa morada que lo hizo en 131.4 minutos siendo la más lenta. Se tiene registro del tiempo de duplicación de una cepa de *V. natrigens* y *V. cholerae* que es de aproximadamente 10 a 20 minutos y se considera que están dentro de las bacterias con un tiempo de duplicación más rápido conocidas (Soler, 2018). Por otra parte, se tiene registró de una cepa tipo de *V. alginolyticus* ATCC® 33787 que presentó la fase exponencial en un tiempo de 6 horas de incubación (Fernández et. al., 2017). Las diferencias se pueden dar debido a que se trata de diferentes eco tipos de especie (misma especie, pero diferente origen geográfico), o por la diferencia de temperatura de tres grados Celsius entre estos trabajos. Por otra parte, se han reportado diferentes cepas de *Vibrio* sp que alcanzan su fase exponencial en un tiempo de 6 a 12 horas de incubación normalmente (López, 2015); mientras que las bacterias

aisladas en este trabajo presentaron su fase exponencial en un tiempo más corto. Por otra parte, se tiene registro del tiempo de duplicación de una cepa de *V. natrigens* y *V. cholerae* que es de aproximadamente 10 a 20 minutos y se considera que están dentro de las bacterias con un tiempo de duplicación más rápido conocidas (Soler, 2018).

Respecto a los **perfiles bioquímicos** de las tres cepas, la cepa verde presentó una asimilación positiva de manitol, lisina y ornitina, también en las concentraciones de NaCl del 1 al 8% presentó un resultado positivo; sin embargo, a una concentración de 0% de NaCl resultó negativa al igual que la asimilación de la arginina y urea, este perfil bioquímico coincide con los resultados obtenidos por Muñoz et. al. (2012). Las características fenotípicas y bioquímicas del aislamiento de la cepa verde resultaron similares a las características descritas para *V. alginolyticus* (Abdul et. al., 2019; Lie et. al., 2004). Sin embargo, se consideró que la probabilidad es media-baja y se puede deber a la sensibilidad o datos de las pruebas. El perfil bioquímico de la cepa azul resultó positivo para la asimilación del compuesto D -manitol, D -manosa, D -sacarosa, D -manitol, pero fue negativo para la asimilación del citrato, lo cual coincide con lo reportado por Cano et. al. (2010) que describieron el perfil bioquímico de una cepa de *V. owensii*. El perfil bioquímico difirió al resultado sugerido por la biblioteca de Biolog; al sugerir una probabilidad baja de *V. harveyi*. Con base a la huella fenotípica y el perfil bioquímico las tres cepas se clasificaron como bacterias pertenecientes al género *Vibrio* (Abdul et. al., 2019; Nelapati et al., 2012).

La cepa verde aislada del agua de mar, fue **identificada molecularmente** con la secuenciación parcial del gen 16S ARNr como *V. alginolyticus*, esto coincide con lo reportado por Canal et al. (2017) y Galaviz et. al. (2018), los cuales aislaron diferentes cepas de esta especie, las identificaron molecularmente y enfatizan en que es común encontrar *V. alginolyticus* a lo largo del mundo en los ambientes marinos y en el estómago de camarones de forma natural. La cepa azul identificada molecularmente como *V. owensii* en este trabajo no presentó luminiscencia, plásmidos, ni una mortalidad considerable en los camarones infectados experimentalmente, lo que difiere con lo reportado con Goulden et. al. (2012).

La cepa morada identificada molecularmente como *Vibrio* sp, presentó un 100% de similitud con una cepa de *V. alginolyticus*, *V. owensii* y *V. harveyi*, esto se puede deber a que la identificación parcial de las cepas se realizó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr (Abdul et. al., 2019). Algunos autores como Cano et al., (2010 y 2011) y Tall et. al., (2013) mencionan que este gen no permite de manera confiable la discriminación entre especies a nivel cepa dentro del clado

de *V. harveyi* (Anexo 5), para eso recomiendan la secuenciación del gen *pyrH* (que codifica para la fosforilación de UMP que cataliza la quinasa, con efecto directo en la virulencia de la bacteria y este gen permite diferenciar de manera más confiable los diferentes clados dentro de este género) con un tamaño de 550 pb, utilizando los cebadores pyrH80F y pyrH530R (Sawabe et al., 2007).

De la misma forma Molina (2016), refiere a que los análisis de secuencias parciales no deben ser utilizadas para conclusiones taxonómicas. Al menos que se demuestre que tienen el mismo grado de similitud que los obtenidos con la secuencia genómica completa (Stackebrandt y Goebel, 1994). Sin embargo, los fragmentos que obtuvimos con las tres cepas fueron de tamaños diferentes (cobertura de cepa verde: 67%, cepa azul: 89% y cepa morada: 23.6%).

Por ello, se corre el riesgo de cometer errores en la identificación de la especie al secuenciar algún gen por medio del PCR, por lo que es necesario la secuenciación completa del gen y preferiblemente del genoma de cada cepa. Por lo que en un futuro se sugiere analizar la secuenciación de los genomas, particularmente el de la bacteria verde, debido a las características que presentó como la iridiscencia de las colonias, el crecimiento de tipo enjambre rápido, la signología causada en *P. vannamei* y falta de plásmidos en esta cepa. Sería de gran importancia conocer la presencia de genes de resistencia o de patogenicidad, si mantiene regiones conservadas o no conservadas, su evolución filogenética y los genes adquiridos.

El **efecto de la infección** causado por la cepa verde sobre la mortalidad del camarón blanco se demostró re-aislando el agente causal del hepatopáncreas y hemolinfa de organismos en estado moribundo infectados experimentalmente, comprobando de esta manera los postulados de Koch, así como lo describen Goulden et. al. (2012). En el mismo contexto Abdul et. al. (2019), hacen mención a que los aislamientos bacterianos que obtuvieron de *V. alginolyticus* presentaron un alto grado de virulencia por la alta mortalidad registrada en los camarones cultivados, lo que demuestra el potencial patogénico de esta especie de *Vibrio*.

Además, se tiene registró de camarones infectados de forma experimental con cepas de *V. alginolyticus* a diferentes concentraciones y por distintas vías de infección, corroborando el potencial patogénico de la especie y la capacidad de presentar mortalidades de más del 80% del cultivo, en pocas horas post infección en camarones juveniles y adultos, utilizando dosis de infección de 1×10^7 UFC/mL hasta 2×10^5 UFC/mL (Hsieh et. al., 2008; Xie et. al., 2016) Similar a las dosis de infección utilizadas en este trabajo en el rango de 1×10^3 a 1×10^6 UFC/mL. Por otra parte, la cepa azul y morada se descartaron para la comprobación de los

postulados de Koch, por la poca mortalidad y presencia de daños ocasionados en los camarones. Sin embargo, no descartamos un efecto sinérgico de estas bacterias o incluso antagónico (Alizon et. al., 2013).

La salinidad utilizada durante los desafíos de patogenicidad en este trabajo fue de 20 ups con una temperatura de 28 ± 0.5 °C. Esta salinidad no resultó perjudicial para los camarones, ya que no se presentó un estrés visible o mortandad durante la aclimatación (Piña et. al., 2015) o fluctuaciones en la concentración de amonio y la demanda de oxígeno (Ulaje, 2015). Por el contrario, el incremento del peso y talla de los camarones resultó favorable, lo cual se ha reportado previamente (Manosalva, 2007; Piña et al., 2015). Durante su engorda y experimentación no se presentaron epizootias o mortalidades atípicas. En cambio, a una salinidad normal de 34 ups con una temperatura 28 ± 0.5 °C; generalmente se presenta una mayor incidencia de bacterias *Vibrio* que afectan directamente a los camarones cultivados, ya que son un grupo con preferencia al agua de mar (Medina, 2017; Soto, 2015).

La cepa verde ocasionó un **cuadro de vibriosis** particular ya que la distribución de las lesiones y daños siguió un patrón definido y replicable. A nivel histológico la presencia de túbulos hepatopancreáticos atrofiados, con múltiples zonas de melanización y necrosis, se repitió constantemente. Además, las masas de bacterianas basofílicas rodeando los hemocitos fueron muy evidentes, con nódulos y encapsulamientos, similar a lo que reportan Varela y Peña (2016) con los daños caracterizados en hepatopáncreas de *P. vannamei* desafiados con una cepa de *V. parahaemolyticus*. En el mismo contexto Cuéllar (2013), menciona que los camarones juveniles o adultos afectados por una vibriosis pueden generar diferentes signos clínicos; dependiendo el grado de severidad de la infección y la especie (Hong et. al., 2020). Los síntomas externos más comunes son letargia, nado errático, pérdida del reflejo de huida, anorexia, intestino vacío, coloración rojiza, urópodos rojos, edema en los urópodos, opacidad del músculo, melanización del exoesqueleto y apéndices rojos (Cuéllar, 2013; Ananda et. al., 2017; Ayala, 2021).

Sin embargo, la secuencia de daño que desarrolla la cepa verde no ha sido reportada previamente, no es igual que AHPND ya que el cuadro clínico y análisis molecular no coinciden con esta enfermedad, aunque internamente la histología reveló daños en el hepatopáncreas muy similares a lo que se registra en camarones con AHPND (Tabla VIII). Además, La bacteria verde sobre las superficies de los acuarios y apéndices de los camarones generó una coloración rosa (maxilas, quelípodos, pleópodos y pereiópodos). Que al momento desconocemos si se trata de formación de biofilms o de un producto metabólicos

por la utilización del sustrato quitina (Bottcher et. al., 2016). Se tiene reportado que *Vibrio* spp tiene la capacidad de formar biopelículas como un mecanismo de supervivencia, patogenicidad y tolerancia al estrés (Freitas et. al., 2020; Yildiz y Visick, 2009).

La implementación de las pruebas microbiológicas, la generación de perfiles bioquímicos, de análisis moleculares y la verificación de los postulados de Koch con análisis histológico, se desempeñaron correctamente como herramientas muy útiles para generar una descripción detallada del potencial patogénico de las cepas bacterianas que se presentan en el agua de mar de forma natural, y en los sistemas de cultivo, para la identificación taxonómica más asertiva de cada una (Delgado et. al., 2017; Iglesias et. al., 2020). Las características que presenta la cepa de *Vibrio alginolyticus* aislada e identificada en este trabajo son a la vez preocupantes (debido a la patogenicidad y daño que puede causar en los cultivos de camarón) y a la vez merecedora de estudios a profundidad para elucidar su genoma y poder explotar su potencial biotecnológico.

IX. Conclusiones

- Se aislaron y caracterizaron tres cepas bacterianas a partir de muestras de agua de mar, en sistemas de acuicultura de recirculación cerrados en donde se reportaron eventos de vibriosis.
- Las cepas aisladas presentaron discrepancia entre la caracterización fenotípica, bioquímica y molecular. La cepa azul y morada solo se pueden asignar al género *Vibrio*. Mientras que la cepa verde se identificó bioquímica y molecularmente como *Vibrio alginolyticus* iridiscente con crecimiento tipo de enjambre o swarming rápido.
- Existen diferencias en la virulencia y patogenicidad de las tres cepas aisladas del agua de mar, únicamente la cepa verde (*V. alginolyticus*) resultó patógena para el camarón blanco.
- La vibriosis causada por la cepa verde identificada como *V. alginolyticus*, generó un porcentaje de mortalidad mayor al 80 % en los desafíos de patogenicidad en un periodo de 5 a 25 dpi. Los camarones manifestaron signos característicos de vibriosis y otros signos clínicos no reportados como: melanización y necrosis multifocal excesiva, coloración rosada de los apéndices y estómago, con daño externo e interno del hepatopáncreas y los camarones presentaron en algunos casos, coloración azul-verde externa y corazón negro.

X. Referencias

Abdul Hannan, M. D., Mahbubur Rahman, M. D., Nurunnabi Mondal, M. D., Suzan Chandra, D., Chowdhury, G., & Tofazzal, M. D. (2019). Molecular Identification of *Vibrio alginolyticus* Causing Vibriosis in Shrimp and Its Herbal Remedy. *Polish journal of microbiology*, 68(4), 429–438. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-042>

Aguirre, G., F. Ascencio, y D. Saulnier. (2005). Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *J. Dis. Aquat. Org.* 67, 201-207.

Alizon, S., de Roode, J. C., & Michalakis, Y. (2013). Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology letters*, 16(4), 556–567. <https://doi.org/10.1111/ele.12076>

Amatul-Samahah, Wan., Omar., Mohd, Ikhsan., Amal, Azmai., Zamri-Saad, M. y Ina-Salwany, M. (2020). Ensayos de vacunación contra la vibriosis en camarones: una revisión. *Aquac. Rep.* 18, 100471.

Amin, A. K., Feng, G., Al-Saari, N., Meirelles, P. M., Yamazaki, Y., Mino, S., Thompson, F. L., Sawabe, T., & Sawabe, T. (2016). The First Temporal and Spatial Assessment of *Vibrio* Diversity of the Surrounding Seawater of Coral Reefs in Ishigaki, Japan. *Frontiers in microbiology*, 7, 1185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01185>

Ananda R., Sridhar, R., Balachandran, C., Palanisammi, A., Ramesh, S., Nagarajan, K. (2017). Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 368-381.

Aranguren, L. F., Hung N., Noble, B., & Dhar, A. (2020). School of Animal and Comparative Biomedical Sciences, The University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA. 621-4438.

Ayala-García, J.C. (2021). Efecto inhibitorio de dos especies de diatomeas contra *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. [Tesis de Maestría]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3596/1/Tesis%20JCA%20200821.pdf>

Briggs, M., Smith, S., Subasinghe, R. y Phillips, M. (2004). Introduction and movement of *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 79.

Böttcher, T., Elliott, H. L., & Clardy, J. (2016). Dynamics of Snake-like Swarming Behavior of *Vibrio alginolyticus*. *Biophysical journal*, 110(4), 981–992. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.12.037>

Canal, B., Cruz, S., Valle, V., Agurto, T. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias del género *VIBRIO* en muestras de AULACOMYA ATRA “choro” procedentes del terminal pesquero de Villa María del Triunfo, Lima, Perú. *Rev. Biotempo*. 14(1), 1-5. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v14i1.833>

Cano, G.A., Goulden, E.F., Owens, L., Høj, L. (2010). *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from Cultured crustaceans in Australia. *FEMS Microbiol. Lett.* 302(1), 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01850.x>

Cano G.A., Høj, L., Owens, L., y Andreakis, N. (2011). El análisis de secuencias multilocus proporciona la base para la identificación rápida y confiable de especies relacionadas con *Vibrio harveyi* y revela una identificación errónea previa de patógenos marinos importantes. *Sist. aplicación Microbiol.* 34, 561-565. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.09.001>

Casariego, O., Jhuniór, X. (2014). Identificación y caracterización molecular del género *Vibrio* en la hemolinfa y hepatopancreas de *Litopenaeus vannamei* en cultivo semi-intensivo en Tumbes. 21 de febrero del 2021, de Universidad Nacional de Tumbes Sitio web: <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/206>

Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2010). Laboratory Identification of *Vibrio Cholerae*. [Archivo PDF]. <https://www.cdc.gov/cholera/pdf/laboratory-methods-for-the-diagnosis-of-vibrio-cholerae-chapter-6.pdf>

Chimetto, L., Cleenwerck, I., Alves, N., Silva, B., Brocchi, M., Willems, A., De vos, P. and Thompson, F., (2001). *Vibrio communis* sp. Nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, 1-7.

Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California (noviembre del 2010). Protocolo de prevención y contingencias para el cultivo de camarón blanco en Baja California. http://www.cesaibc.org/sitio/archivos/Protocolodecontingenciacamaron_200313153207.pdf

CONAPESCA. (2012). Anuario estadístico de acuicultura y pesca [Monografía en internet]. México, D.F. Comisión nacional de acuicultura y pesca. [Consultado en enero 2021]. Sitio web: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012

Cordero, H., Esteban, M.A., Cuesta, A. (2014). Use of probiotics bacteria against bacterial and viral infections in shellfish and fish aquaculture. *Sustainable Aquaculture Techniques*. 3, 239-265.

Cuéllar-Anjel, J. (2013). Vibriosis. *The Center for Food Security and Public Health*. 1, 1-5. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>

Cuéllar-Anjel, J., y Brock, J. A. (2018). Clinical case report: EMS/AHPND outbreak in Latin America. *Global Aquaculture Advocate*, <https://www.globalseafood.org/advocate/clinical-case-report-ems-ahpnd-outbreak-in-latin-america/>

Dahlberg, C., Bergstrom, M., Andreasen, M., Bak, C.B., Molin, S. and Hermansson, M. (1998). Interspecies bacterial conjugation by plasmids from marine environments visualized by gfp expression. *Mol. Biol. Evol.* 15(4), 385-390. [10.1038/s41467-021-22849-y](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22849-y)

De la Rosa, V. J. (2006). La camaronicultura: Panorámica del desarrollo de una industria millonaria en México y el mundo. *Revista Universitaria*. UABC.

Delgado, Y., Umaña, R., Solano, S., Iglesias, M.V., Ortiz, E., Álvarez, C., & Lugioyo, G.M. (2017). Phenotypic characterization and molecular identification of a luminescent marine bacterium isolated from the NW shelf of Cuba. *Biotechnia*, 19(3), 3-10.

FAO. (2017). Major bacterial diseases affecting aquaculture. Mangalore, India.

FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.

Fernández, E.C., Flores, D.V. y Medina, M.M. (2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista peruana de Biología*. 24(1), 93-100. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103>

Fletcher, R. (03 de noviembre de 2021). Se ha demostrado que FeedKind protege los camarones contra EMS. The Fish Site. <https://thefishsite.com/articles/feedkind-shown-to-protect-shrimp-against-ems>

Freitas, C., Glatter, T. & Ringgaard, S. (2020) The release of a distinct cell type from swarm colonies facilitates dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* in the environment. *ISME J.* 14, 230–244. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0521-x>

Galaviz, L., Robles, A., Sánchez, R., Ibarra, J., Gómez, B., Molina, Z. (2018). Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que causan necrosis hepatopancreática aguda en camarón cultivado de Sonora, México y su resistencia a antibióticos. *Hidrobiológica*, 31(2), 111-123. <file:///C:/Users/HP/Downloads/1396-Texto%20del%20art%C3%ADculo-9622-2-10-20220315.pdf>

Giffard, M.I., González, B.R., Arredondo, G.M., Lafarga, C.F., Granados, M. C., López, A.L. y David, T.C. (2014). La acuicultura en el valle de Mexicali: Especies y áreas de cultivo. Universidad Autónoma de Baja California.

Goulden, E.F., Hall, M.R., Bourne, D.G., Pereg, L.L., Høj, L. (2012). Pathogenicity and Infection Cycle of *Vibrio owensii* in Larviculture of the Ornate Spiny Lobster (*Panulirus ornatus*). *Appl Environ Microbiol*, 78(8), 2841-2849. <https://doi.org/10.1128/AEM.07274-11>

Gómez, G. B., Tron, M. L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V. y Guerra, A. L. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163, 1-9.

Guzmán-Hormazábal, L. (2019). Nuevas enfermedades amenazan la acuicultura. <https://www.scidev.net/americ-latina/news/nuevas-enfermedades-amenazan-la-acuicultura/>

Hardy Diagnostic. (31 de agosto del 2011). *Hardy CHROM Vibrio*. https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/product/g319-hardychrom-vibrio-15x100mm-plate-order-by-the-package-of-10-by-hardy-diagnostics-media-prepared

Haws, M., Boyd, C., Green, B. (2001). Buenas prácticas de manejo en el cultivo de camarón en Honduras. Asociación Nacional de Acuicultores de Honduras (ANDAH). Centro de Recursos Costeros de la Universidad de Rhode Island. Honduras. 101.

Hai-Hong, H., L. Xia-Lin, X. Jian-Hai, W. Ping. (2013). Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harvey*. *Aquacult.* 406, pp. 115-120.

Hong, To T., Yanagawa, H., Khanh, T.N., Hiep, D.M., Cuong, D.V., Khai, L., Taniguchi, T., Kubo, R., Hayashidani, H. (2020). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease of shrimp in shrimp, molluscan shellfish and water samples in the Mekong delta, Vietnam. *Biology*, 9(10), 312.

Hsieh, T.J., Wang, J.C., Hu, C.Y., Li, C.T., Kuo, C.M., Hsieh, S.L. (2008). Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish and shellfish Immunology*. 25(5), 581-588. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.014>

Hug, A., Bradd, J.H., Taviani, E., Chen, A., Hasan, N.A., Colwell, R.R. (2012). Detection, Isolation, and Identification of *Vibrio cholerae* from the Enviroment. *Current Protocols in Microbiology*, 26(1): 6A.5.1 – 6A.5.51.

Ibarra, J., González, J., Galavíz, L., Molina, Z., y Luna, C. (2007). Vibriosis asociadas al cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*. *Rev. de Facult. Salud Públ. y Nutr. (RESPYN)*. 12(1): 426-431.

Ibarra, J.C., J. Reyes, L. Galavíz, Z. Molina, y C. Luna. (2003). Vibriosis asociadas al cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*. En: IX Congreso de ciencia de los alimentos y V Foro de ciencia y tecnología los alimentos. 426-430.

Iglesias Rodríguez, M., Umaña Castro, R., García Mesa, L., Ortiz Guilarte, E., Núñez Moreira, R., Álvarez Valcárcel, C., & Lugioyo Gallardo, G. M. (2020).

Phenotypic and molecular characterization, and influence of culture media, on the growth and light emission of bacteria from the coast of Havana, Cuba. *Revista De Biología Tropical*, 68(4), 1298-1310. <https://doi.org/10.15517/rbt.v68i4.41269>

INAPESCA. (2018). Acuicultura | Camarón blanco del Pacífico. 16 de enero del 2021, de Instituto Nacional de Pesca Sitio web: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico9>

INAPESCA. (2021). Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la carta nacional acuícola. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5615929&fecha=15/04/2021

Johansen, E.V., Catón, L., Hamidjaja, R., Oosterink, E., Wilts, D.B., Solbeck, R.T., Sherlock, M.M., Ingham, J.C. and Vignolini. (2018). Genetic manipulation of structural color in bacterial colonies. *PNAS*. 115(11), 2652-2657. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716214115>

Jones, J.L. (2017). Foodborne Diseases (Third Edition), chapter 11 - *Vibrio*. *Science Direct*. 243-252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00011-5>

Kientz, B., Vukusic, P., Luke, S., & Rosenfeld, E. (2012). Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. *Applied and environmental microbiology*, 78(7), 2092–2099. <https://doi.org/10.1128/AEM.07339-11>

Krishna, B., Kumar, V., Mohan, J., Mallappa, B., Karunasagar, I. (2014). Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease Outbreak among Cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in india. *Aquacult*. 433, 247-251.

Liu, CH., Cheng, W., Hsu, J.P., Chen, J.C. (2004). Infección por *Vibrio alginolyticus* en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* confirmada por reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación 16S rDNA. *Órgano Dis Aquat*. 61, (1-2), 169-174. [DOI:10.3354/dao061169](https://doi.org/10.3354/dao061169)

Lightner, D.V. (1996). A Handbook of shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rounge, Louisiana, USA.

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). (18 de enero del 2022). *Family Vibrionaceae*. <https://lpsn.dsmz.de/family/Vibrionaceae>. Recuperado el 02 de abril del 2022.

Liu, L., Xiao, J., Zhang, M., Zhu, W., Xia, X., Dai, X., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y. (2018). A *Vibrio owensii* strains as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 153, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.005>

Li, J., Zhou, L.R. and Woo, N.Y.S. (2003). Invasion route and pathogeni mechanisms of *Vibrio alginolyticus* to silver sea bream *Sparus sarba*. *J. Aquat. Anim. Health*. 15, 302-313. <https://doi.org/10.3390/ijms17010040>

López-León, P. (2015). Supervivencia, crecimiento y expresión de genes del sistema inmune, estrés y digestión del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado con *Vibrio parahaemolyticus* y tratado con ajo y *Bacillus licheniformis* BCR 4-3. [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional]. <http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/234/1/Paty%20tesis%20versio%CC%81n%20final%20diciembre.pdf>

Madigan, T. M., Martinko, M. J., Bender, S. K. y Stahl, A. D. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. Madrid: PEARSON.

Medina F., Diana. (2018). Evaluación de alimento enriquecido con *Dunaliella* sp. para incrementar la resistencia del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) a infecciones experimentales con *Vibrio parahaemolyticus*. 28 de enero del 2021, de CIBNOR Sitio web: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1457/1/medina_d%20TESIS.pdf

Manosalvas-Moreira, P.A., (2007). Tolerancia del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* a cambios de salinidad sin previa adaptación. Proyecto Especial Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 18. <https://bdigital.zamorano.edu/items/e9931775-3965-41f7-af3b-5005b6b0222a>

Molina-Viramontes, J.P. (2016). Evaluación de desechos marinos como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y

polihidroxicarboxilatos. [Tesis de Maestría, CICESE].
https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/382/1/molina_j.pdf

Morales M., Ruiz, A., Pereira, A., Solís, T. y Conroy, G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivados en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. 21(5), 434-446.

Muñoz, D., Graú de Marín, C., Marval, H., Martínez, C. (2012). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado Sucre, Venezuela. *Revista científica*, 22(5), 459-467.
<https://www.redalyc.org/pdf/959/95923384010.pdf>

Nelapati, S., Nelapati, K., Chinnam, B. (2012). *Vibrio parahaemolyticus*: un patógeno emergente transmitido por los alimentos. *Mundo Veterinario*. 5(1), 48-63. <http://DOI:10.5455/vetworld.2012.48-63>

Paul J.H., Thurmond, J.M., Frischer, M.E. and Cannon, J.P. (1992). Intergeneric natural plasmid transformation between *E. coli* and a marine *Vibrio* species. *Molecular Ecology*, 1(1), 37-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00153.x>

Peña, N., Vargas, R., y Varela, A. (2013). Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*. 24(1): 133-147.

Piña-Valdez, P., Arzola-Gonzales, J.F., Nieves-Soto, M., Medina-Jasso, M.A., (2015). Efecto combinado de temperatura y salinidad en el consumo de oxígeno en postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Bol. Inst. Pesca* 41, 89-101.
https://www.researchgate.net/publication/350365347_Influencia_da_precipitacao_e_a_temperatura_na_dieta_de_lontra_Lontra_longicaudis_Olfers_1818_em_area_de_influencia_de_reservatorio_hidreletrico_no_rio_Jari_Amapa_Brasil

Rajasekar, T., Usharani, J., Sakthivel, M., and Deivasigamani, B. (2011). Immunostimulatory Effects of *cardiospermum halicacubum* against *Vibrio parahaemolyticus* on tiger shrimp *Penaeus monodon*. *J. Chem. Pharm. Res.* 3(5), 501-513.

Reyes, L.D. (2017). La producción mundial de camarón se mantiene estancada o disminuye. 17 de febrero del 2021, de Industria acuícola Sitio web: https://www.industriaacuicola.com/nueva_version/index.php/blog/publicacion/13

Rodríguez, M., Linné, M., Rodríguez, G., Monroy, y Mata J. (2001). Manual de enfermedades de camarones peneidos en México. *Bol. del Pronasa y la Red de Diag.* 2(14), 6-12.

Stackebrandt, E., Goebel, M.B. (1994). Taxonomic Note: A place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 44, 846-849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>

Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. & Thompson, F.L. (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis, *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7932-7936. <http://doi:10.1128/JB.00693-07>

Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A., Mino, S., Nakagawa, S., Kumar, R. (2014). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. Nov. *Vibrio* ecology, pathogenesis and evolution. *Frontiers in microbiology*. 5, 7-20.

Soler-Bisute, A. (2018). Hacia la reprogramación de crecimiento bacteriano mediante edición genómica: la bioinformática puesta a prueba. *QuimicaViva*. 117(2), 13-22. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v17n2/E0124.pdf>

Soto-Rodríguez, S. A., Gómez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute Hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1689 -1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>

Soto-Rodríguez, S.A. (07-10 de noviembre de 2017). *Health Status in Mexico: the case of vibriosis and AHPND (Situación sanitaria en México: caso vibriosis y AHPND)* [Conferencia]. LAQUA 17 Reunión anual en Mazatlán, Sinaloa, México.

Tarazona, J.U., León, Q.J., Galindo, C.N., Vallejo, M., y Marguet, E. (2018). Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su actividad antagonista

frente a *Vibrio* sp. aislados de «langostino blanco» *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Rev. Inv. Vet. Perú*, 29(2), 676-691. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14999>

Tall, A., Hervio-Heath, D., Teillon, A., Boisset-Helbert, C., Delesmont, R., Bodilis, J. & Tournon-Bodilis, A. (2013). Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyrH sequencings, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 114(6), 1713-1724.

Tarr, C. L., Patel, J. S., Pühr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A. y Strockbine, N. A. (2007). Identification of *Vibrio* Isolates by a Multiplex PCR Assay and rpoB Sequence Determination. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 134-140.

Thompson, F., I, Tetsuya., S, Jean. (2004). Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431.

Trejo, Ramos, D. A. (2019). Histología sistémica de larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi* y su respuesta ante un evento de vibriosis. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Estudios Superiores de Ensenada] https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2813/1/tesis_Trejo_Ramos_Dora_09_ago_2019A.pdf

Trujillo, T. G., Aguirre G., Sánchez y Rabago, J. (2005). Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrios* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Cienc. Mar* IX. 27: 11-18.

Ulaje-Fernández, S.A. (2015). Relación entre respuestas fisiológicas. contenido bioquímico y expresión del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia. [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, S.C.]. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/74/3/ulaje_s.pdf

Varela, A. (2018). Patologías de hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología. *AquaTIC. Revista Científica Internacional de Acuicultura*. 50, 13-30

Varela, A., y Choc Martínez, L. F. (2020). Artículo de revisión: Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 31(3): e18165

Varela, M.A., y Peña N.N. (2014). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/ AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico*: 25-30.

Varela, M.A. y Peña, N.N. (2016). Differential histopathology of three bacterial diseases that affect the hepatopancreas of penaeid shrimp. *Mesoamerican Journal of Agronomy*, 27(1), 73-80. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i1.21887>

Varela, M.A., Peña, N.N. (2017). Transfronterización de enfermedades infecciosas en la camaronicultura. *Rev. Rev. Repertorio Científico. Universidad Estatal a Distancia*. 20(1): 1-11.

Varela, M.A., Peña, N.N. y Aranguren L. (2017). Acute hepatopancreatic necrosis: a review of the disease in *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735-745. <https://dx.doi.org/10.15517/ma.v28i3.27788>

Valles, J. R., Cruz P., y Pérez, R. (2005). Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panamá: Microsatellite DNA Variation. *Marine Biotechnology*, 6, 475-484.

Xie, C.Y., Kong, J.R., Zhao, C.S., Xiao, Y.C., Peng, T., Lui, Y., Wang, W.N. (2016). Molecular characterization and function of a PTEN gene from *Litopenaeus vannamei* after *Vibrio alginolyticus* challenge. *Developmental and Comparative Immunology*. 59(1), 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.004>

Yang, F., Xu, L., Wanzhen, H. y Li, F. (2022). Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae. *Aquaculture*, 548(1), 737605. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737605>

Yildiz, F. H., & Visick, K. L. (2009). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in microbiology*, 17(3), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>

Zhang, K., W., W., L I, W., Zhang, Q. y Kong, K. (2014). Analysis of genetic diversity and differentiation of seven stocks of *Litopenaeus vannamei* using microsatellite markers. *Oceanic and Coaestel Sea Research*, 13(4), 647-656.

Zhi-Ying, J., Xiao-Wen, S., Li-Quin, L. y Qing-Quans, L. (2006). Isolation and characterization of microsatellite markers from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 1282-1284.

XI. Anexos

Anexo 1. Lista de sustratos analizados para la identificación bioquímica de tres cepas de bacterias marinas.

Clave	Sustrato	V. a	V. o	V. spp	Clave	Sustrato	V. a	V. o	V. spp
A1	Control negativo	(-)	(-)	(-)	E1	Gelatina	(-)	(-)	(-)
A2	Dextrina	(+)	(-)	(+)	E2	Glicilo-L-Prolina	(-)	(+)	(+)
A3	D-Maltosa	(-)	(+)	(-)	E3	L- Alanina	(+)	(+)	(+)
A4	D-Trehalosa	(+)	(+)	(+)	E4	L- Arginina	(-)	(+)	(+)
A5	D-Celobiosa	(+)	(+)	(+)	E5	Ácido - L- Aspártico	(+)	(+)	(+)
A6	Gentiobiosa	(-)	(-)	(+)	E6	Ácido - L- Glutámico	(+)	(+)	(+)
A7	Sacarosa	(+)	(+)	(+)	E7	L- Histidina	(+)	(+)	(+)
A8	D-Turanosa	(-)	(-)	(-)	E8	Ácido L- Piroglutámico	(-)	(-)	(-)
A9	Estaquiosa	(-)	(-)	(-)	E9	L- Serina	(-)	(+)	(+)
A10	Control positivo	(+)	(+)	(+)	E10	Lincomicina	(+)	(-)	(-)
A11	pH 6	(+)	(+)	(+)	E11	Guanidina HCl	(+)	(-)	(-)
A12	pH 5	(+)	(+)	(-)	E12	Niaproof 4	(-)	(+)	(+)
B1	D- Rafinosa	(-)	(-)	(-)	F1	Pectina	(-)	(+)	(+)
B2	Alfa D- Lactosa	(-)	(-)	(-)	F2	Ácido - D- Galacturónico	(-)	(-)	(-)
B3	D- Malibiosa	(-)	(-)	(-)	F3	Ácido lactona - L- Galactónico	(-)	(-)	(-)
B4	Beta-Metil-D- Glucósido	(-)	(-)	(-)	F4	Ácido - D- Glucónico	(+)	(+)	(+)
B5	D-Salicina	(+)	(+)	(+)	F5	Ácido - D- Glucorónico	(-)	(+)	(+)
B6	N-Acetil-D- Glucosamina	(-)	(+)	(+)	F6	Glucuronamida	(-)	(-)	(+)
B7	N-Acetil-Beta-D- Manosamina	(+)	(-)	(-)	F7	Ácido Múico	(-)	(-)	(-)
B8	N-Acetil-D- Galactosamina	(-)	(-)	(-)	F8	Ácido Quínico	(-)	(-)	(-)
B9	N-Acetil-Ácido Neuramínico	(-)	(-)	(-)	F9	Ácido D-Sacárico	(-)	(-)	(-)
B10	NaCl al 1%	(+)	(+)	(+)	F10	Vancomicina	(+)	(-)	(-)
B11	NaCl al 4%	(+)	(+)	(+)	F11	Violeta de tetrazolio	(+)	(-)	(-)
B12	NaCl al 8%	(+)	(+)	(+)	F12	Azul de tetrazolio	(+)	(+)	(+)
C1	Alfa-D-Glucosa	(+)	(+)	(+)	G1	Ácido P- hidroxifenilacético	(-)	(-)	(-)
C2	D-Manosa	(-)	(+)	(+)	G2	Piruvato de metilo	(-)	(+)	(+)
C3	D-Fructosa	(+)	(+)	(+)	G3	Ácido D-láctico Metilo de éster	(-)	(-)	(-)
C4	D-Galactosa	(-)	(-)	(+)	G4	Ácido L-Láctico	(+)	(+)	(+)
C5	3-Metil-Glucosa	(-)	(-)		G5	Ácido Cítrico	(+)	(-)	(-)
C6	D-Fucosa	(-)	(-)	(-)	G6	Ácido α -ceto-glutárico	(-)	(-)	(-)
C7	L-Fucosa	(-)	(+)	(-)	G7	Ácido D- Málico	(-)	(-)	(-)

C8	L-Ramposa	(-)	(-)	(-)	G8	Ácido L- Málico	(+)	(+)	(+)
C9	Inosina	(+)	(+)	(+)	G9	Ácido Bromo - Succínico	(-)	(-)	(-)
C10	Lactato de sodio al 1%	(+)	(+)	(+)	G10	Ácido Nalidíxico	(-)	(-)	(-)
C11	Ácido Fusídico	(+)	(+)	(+)	G11	Cloruro de Litio	(+)	(+)	(+)
C12	D-Serina	(-)	(-)	(-)	G12	Telurito de Potasio	(-)	(-)	(-)
D1	D-Sorbitol	(-)	(-)	(-)	H1	Polisorbato 40	(-)	(+)	(+)
D2	D-Manitol	(+)	(+)	(+)	H2	Ácido – sigma. amino – Butírico	(-)	(-)	(-)
D3	D-Arabitól	(+)	(-)	(-)	H3	Ácido – Alfa – Hidroxi - Butírico	(+)	(+)	(+)
D4	Mioinositol	(-)	(-)	(-)	H4	Ácido – Beta – Hidroxi – D, L - Butírico	(-)	(-)	(-)
D5	Glicerol	(+)	(+)	(+)	H5	Ácido - Alfa – Keto - Butírico	(+)	(-)	(-)
D6	D-Glucosa-6-PO4	(+)	(+)	(+)	H6	Ácido Acetoacético	(-)	(-)	(-)
D7	D-Fructosa-6-PO4	(+)	(-)	(-)	H7	Ácido Propiónico	(+)	(-)	(-)
D8	Ácido - D- Aspártico	(-)	(-)	(-)	H8	Ácido Acético	(+)	(+)	(+)
D9	D- Serina	(-)	(+)	(+)	H9	Ácido Fórmico	(+)	(-)	(-)
D10	Troleandomicina	(+)	(+)	(-)	H10	Aztreonam	(+)	(-)	(+)
D11	Rifamicina SV	(+)	(+)	(+)	H11	Butirato de Sodio	(+)	(-)	(+)
D12	Minociclina	(-)	(-)	(-)	H12	Bromato de Sodio	(+)	(-)	(+)

B.V: Bacteria Verde. **B.A:** Bacteria Azul. **B.M:** Bacteria Morada

Anexo 2.

Solución fijadora Davidson

Tabla #. Reactivos para la preparación de la solución Davidson en un litro

Reactivo	Volumen (mL)
Glicerina	100
Formaldehido al 37%	200
Etanol al 96%	300
Agua de mar filtrada	300

Ácido acético	100

Anexo 3.

El proceso de deshidratación de llevo a cabo en un procesador automático de tejidos (Leica – TP1040) con el siguiente protocolo.

Protocolo para deshidratación de tejidos.

Reactivo	Tiempo (h)
Etanol al 70%	1
Etanol al 96% - I	1
Etanol al 96% - II	1
Etanol al 100% - I	1
Etanol al 100% - II	1
Etanol al 100% - III	1
Xileno – I	0.5
Xileno – II	0.5
Parafina – I	0.5
Parafina – II	0.5

Finalmente, las muestras se embebieron en parafina.

Anexo 4.

Tinción de Hematoxilina-Eosina

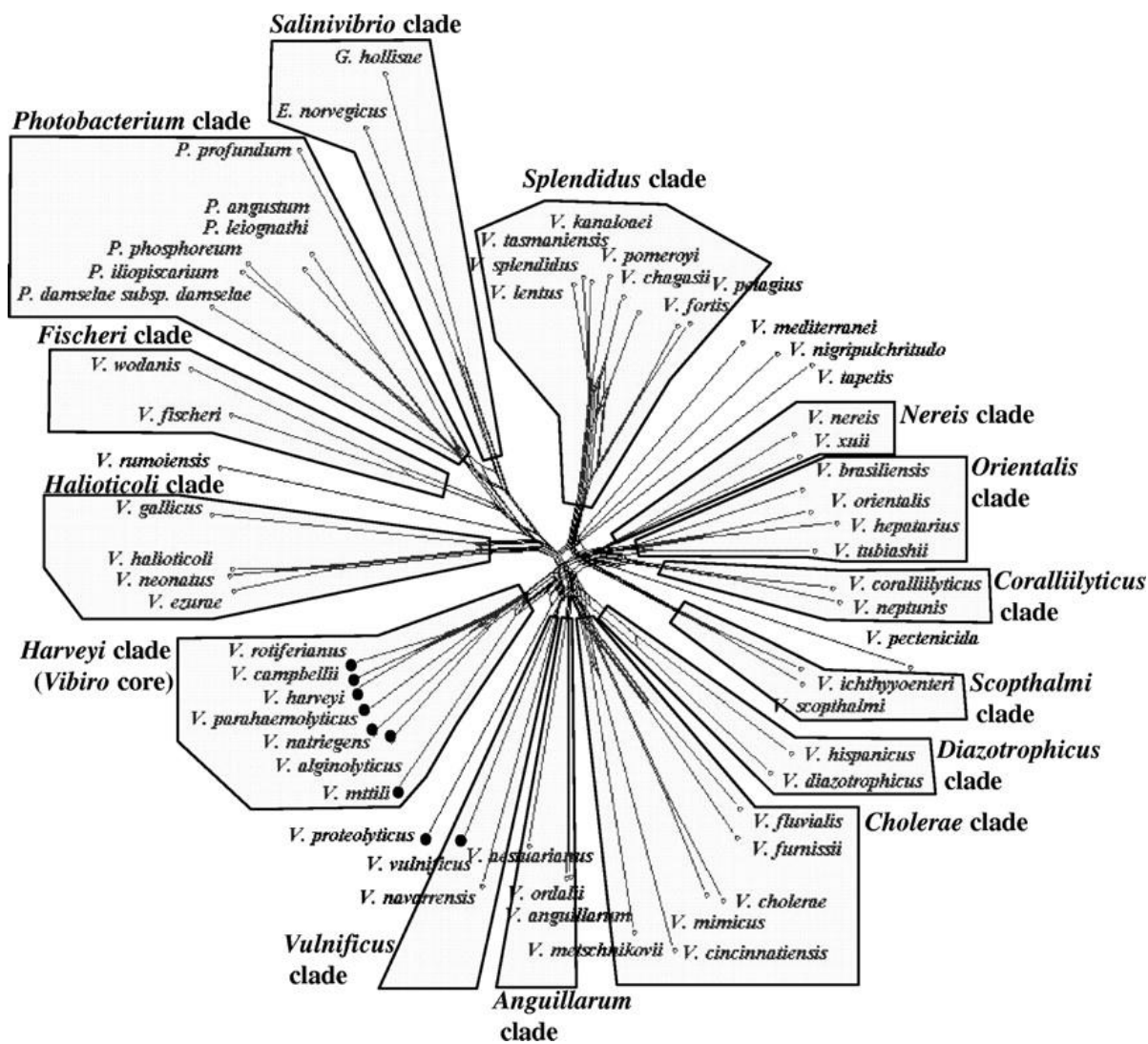
Antes de aplicar la tinción a los cortes histológicos, se deben desparafinar e hidratar.

Desparafinación	Tiempo (min)
Xileno I	7
Xileno II	7
Alcohol al 100%	3
Alcohol al 96%	2
Alcohol al 90%	2
Alcohol al 80%	2
Alcohol al 70%	2
Agua destilada	5
Tinción	
Hematoxilina	10
Agua corriente	2
Alcohol ácido	0.5

Agua corriente	0.5
Carbonato de litio	2
Agua	2
Alcohol al 96%	2
Eosina	5 sumergidas
Alcohol al 96% II	2
Alcohol al 96% III	2
Alcohol al 100% - I	5
Alcohol al 100% - II	5
Xileno	7

Anexo 5

Clasificación de Vibrio en clados



Obtenido de: Sawabe et. al., 2007