

**EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO
VIBRIO EN LARVAS DE MOLUSCOS BIVALVOS**

**JESSICA ALEXANDRA JIMÉNEZ RIVERA
DANIEL ALEJANDRO LAGOS IBARRA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2018**

**EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO
VIBRIO EN LARVAS DE MOLUSCOS BIVALVOS**

**JESSICA ALEXANDRA JIMÉNEZ RIVERA
DANIEL ALEJANDRO LAGOS IBARRA**

**Informe final de trabajo de grado presentado como requisito parcial para
optar al título de Ingeniero en Producción Acuícola**

**Directora
LEDA CAROLINA RESTREPO CARDONA
Bióloga, MSc., PhD (c)**

**Codirectora
CAROL YOVANNA ROSERO GALINDO
Bióloga, MSc, PhD.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2018**

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del Acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Leda Carolina Restrepo Cardona
Bióloga, MSc., PhD (c)
Directora

Carol Yovanna Rosero Galindo
Bióloga, MSc, PhD.
Codirector

Vilma Yolanda Gómez Nieves
Bióloga, MSc (c)
Jurado delegado

Álvaro Javier Burgos Arcos
Zootecnista, Esp, MSc, PhD.
Jurado delegado

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por cumplir esta meta y porque con sus bendiciones ha puesto en nuestro camino seres humanos como ustedes para acompañarnos en esta formación.

Este trabajo de Tesis realizado en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL), es un esfuerzo en el cual directa o indirectamente participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniendo paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y también en los momentos de felicidad. Este trabajo nos ha permitido aprovechar al máximo la competencia y experiencia de muchas personas a las cuales deseamos agradecerles en este apartado.

En primer lugar, a nuestra directora de tesis Leda Restrepo Cardona en Ecuador, el mayor agradecimiento por haber confiado este trabajo en nuestras manos y a nuestra codirectora Carol Rosero Galindo en Colombia por guiarnos en este proceso. Estamos eternamente agradecidos con ustedes por su paciencia ante momentos de inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de investigación y llegar a la culminación del mismo; cuya experiencia y educación ha sido fuente de motivación.

A los Master Adrián Márquez y Jormil Revilla un especial agradecimiento, primero por habernos recibido en su grupo de investigación de moluscos bivalvos. Segundo por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, consejos, sabiduría, apoyo y motivación; durante nuestra estancia tuvimos la oportunidad de aprender y construir gran parte de nuestra investigación gracias a su talento humano.

Sinceros agradecimientos a la colaboración del equipo de Biología Molecular y microbiología de CENAIM, por poner a nuestra disponibilidad los laboratorios y sus conocimientos; especialmente a Leandro Bajaña y Cristobal Domínguez por su apoyo incondicional.

Desde luego nuestros agradecimientos a la Dra. Bonny Bayot por la gestión que realizo para que este trabajo sea posible.

A todo el personal que conforma la familia CENAIM por el respaldo y la amistad durante nuestra estancia y el desarrollo de esta investigación, todos aportaron un granito de arena para que todo esto sea posible y merecen muy buenas palabras. De igual manera los agradecimientos al amparo incondicional de nuestras familias, que nos han otorgado el cariño y los valores para inspirarnos a cumplir nuestras metas. Y a nuestra honorable Universidad de Nariño por todos los años de formación académica. Las palabras nunca serán suficientes para testimoniar nuestro aprecio y agradecimiento.

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) en el marco del proyecto PIC-14-CENAIM-003: "Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura y repoblación".

DEDICATORIA

Principalmente dedico esta obra Dios por ser sustento en mi vida y acompañarme en cada paso dándome la fuerza y coraje para hacer de este sueño realidad, sé que gracias a sus bendiciones hoy puedo culminar este proceso a lado de las personas que amo.

Dedico este triunfo a mi familia, especialmente a mi madre Nancy Rivera por su apoyo incondicional y esfuerzo diario durante todo este largo proceso de formación, me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño con una gran dosis de amor. Gracias a ella por creer en mí sinceramente, por darme el valor y alas para ir en buscar mis metas, soy la obra que ha hecho Dios en sus manos como muestra y recompensa a todos sus sacrificios.

A mi Hermano Maicol Jiménez por su gran amor y comprensión, gracias a él por cuidar de mi madre cuando he salido en busca de mis sueños, por ser mi principal fuente de felicidad, de inspiración y porque él es el motor que me conduce a ser mejor ser humano y profesional.

Esto es solo un poco de la felicidad y el orgullo que planeo brindarles. Los amo infinitamente este triunfo es nuestro!

“Per aspera ad astra”

Jessica Alexandra Jiménez Rivera

DEDICATORIA

Dedico todo el esfuerzo de este proyecto de grado y esta nueva meta cumplida a Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento y por guiar mi camino dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten.

Le agradezco a mi hermosa familia, mi madre Nelly Ibarra y mis hermanos Diana moreno y Diego Lagos ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, fueron los que me dieron ese cariño y apoyo en los momentos más difíciles, son los que han velado por mis estudios, mi educación, mi formación como profesional y ser humano. Son a ellos a quien les debo todo, horas de consejos, de regaños, de reprimendas de tristezas y de alegrías de las cuales estoy completamente seguro que las han hecho con todo el amor del mundo para formarme como un ser integral y de las cuales me siento extremadamente orgulloso.

Mi Hermosa Madre por ser la persona que me ha dado todo su amor, paciencia y dedicación, por ser mi inspiración para dar cada día un paso más. Mis hermanos que han estado siempre a mi lado siendo mi gran apoyo, son mi inspiración para superarme.

Gracias por brindarme su aliento y cariño, sinceros agradecimientos a mi grandiosa familia.

Esta obra les dedico con todo mi amor.

Daniel Alejandro Lagos Ibarra

RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado el interés sobre bacterias del género *Vibrio*, principalmente por las enfermedades que causan en especies marinas. En el cultivo de moluscos bivalvos, las especies pertenecientes a éste género han provocado un gran impacto en la industria, ya que afectan de forma crítica la etapa de larvicultura. Al trabajar con estos organismos, se requiere conocer los patógenos que circulan en cada región, ya que las bacterias pueden tener características genómicas únicas que varían de acuerdo a las condiciones en las que se desarrollan y pueden influir sobre la patogenicidad que presentan. En los últimos años se han implementado técnicas moleculares, como la tipificación de secuencias multilocus (MLST), para la identificación de estos microorganismos, debido a que el uso de métodos tradicionales no resulta completamente certero.

El presente estudio evaluó la susceptibilidad de larvas de *Nodipecten subnodosus*, *Spondylus crassisquama* y *Crassostrea gigas*, bajo condiciones de desafío con dos especies de *Vibrios*, que fueron aislados en etapas críticas del cultivo de moluscos en Ecuador; el análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de doble vía con 6 tratamientos y 4 réplicas. Se encontró que uno de los aislados estaba estrechamente relacionado con *V. brasiliensis* (cepa Bspr 16001), especie que fue reportada recientemente como un potencial patógeno para moluscos bivalvos, perteneciente al clado Orientalis. En pruebas de desafío se encontró que provocaba mortalidad para las larvas de *C. gigas* y *N. subnodosus* a las 48 horas post-infección a la concentración más alta. La cepa Bspr 17002 pertenece al clado Harveyi, relacionado con *V. alginolyticus* ha sido catalogado con alto grado de patogenicidad en bivalvos, puesto que generó alta susceptibilidad en larvas de *S. crassisquama* donde la supervivencia a las 48 post-infección disminuyó drásticamente a cero con la mayor concentración de infección, por lo cual se pudo evidenciar que cada cepa tiene preferencia por un hospedero, en este caso, especies de pectinidos de gran importancia para el desarrollo de la acuicultura en Ecuador.

Este estudio abordó un reto importante ante la propagación de enfermedades causadas por estas cepas bacterianas, que requieren un método de detección oportuno en especies endémicas de la costa ecuatoriana, haciendo uso de un método de diagnóstico molecular como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante cebadores VCPA y VTB417 específicos para genes de toxina presentes en los agentes patógenos de estudio, principalmente en etapas previas a la infección que permitan tomar medidas preventivas ante una contaminación masivas provocada por estos *vibrios*.

Palabras clave: susceptibilidad, bivalvos, *Vibrios*, MLST, genes house-keeping, diagnóstico molecular, PCR.

ABSTRACT

In recent years, interest in research into *vibrios* has increased due to the high pathogenicity they cause in marine species, mainly in bivalve molluscs. This has caused a great impact and importance in the aquaculture industry because they occur in one of the most critical stages, such as larviculture. The present study evaluates susceptibility in early umbral stage larvae of *Nodipecten subnodosus*, *Spondylus crassisquama* and *Crassostrea gigas*, high value species in marine aquaculture and repopulation. These species of bivalves were retained to attack vibrios at concentrations of 1.5×10^2 , 1.5×10^4 and 1.5×10^6 CFU / ml; A certainty of a fatal relationship between *Striostrea prismatic* and symptoms related to vibriosis.

The pathogenicity of *vibrios* in bivalves has been established and, therefore, it is necessary to know the pathogens that surround them in a specific region, since bacteria are characterized by having a high mutation rate that adapts to environmental conditions in which they develop; For this reason, molecular techniques have been implemented for the identification of these microorganisms, because the use of traditional methods is not completely accurate, why Multilocus Sequence Typing (MLST) has been used using four maintenance genes (*recA*, *gyrB*, *rpoB* and *16s*) to determine the phylogeny of the strains under study. One of the two has recently been reported as a potential pathogen for bivalve molluscs, corresponded to the eastern clade and was closely related to *V. brasiliensis* (strain Bspr 16001) that showed lethality for larvae of *C. gigas* and *N. subnodosus* at 48 hours later - infection at the highest concentration and strain Bspr 17002 linked to clade Harveyi associated with *V. alginolyticus* that has been cataloged with a high degree of pathogenicity in the bivalves, generating high susceptibility in *S. crassisquama* larvae where the survival to 48 publications -infection decreased to zero in the highest concentration that shows that each strain has a preference for a host, in this case pectinid species of great importance for the development of aquaculture in Ecuador.

This study addressed an important challenge to the propagation of diseases caused by these bacterial strains, which requires a method of timely detection in endemic species of the Ecuadorian coast, making use of a molecular diagnostic method as the chain reaction technique. The polymerase (PCR) uses primers VCPA and VTB417 specific for genes of toxins present in the pathogens of the study, mainly in stages prior to infection, which means taking preventive measures against the massive contamination caused by these *vibrios*.

Key words: susceptibility, bivalves, *vibrios*, MLST, maintenance genes, molecular diagnosis, PCR.

CONTENIDO

	Pág.
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MARCO REFERENCIAL.....	23
3.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE	23
3.1.1. Distribución geográfica y hábitat	25
3.1.2. Hábitos alimenticios	25
3.2. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE.	26
3.2.1. Anatomía externa	26
3.2.2. Anatomía interna	26
3.2.3. Ciclo Vital	27
3.3. SISTEMA INMUNE DE MOLUSCOS BIVALVOS	29
3.4. MÉTODOS PARA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS	29
3.4.1. Métodos fenotípicos	29
3.4.2. Caracterización bioquímica	30
3.4.3. Métodos moleculares	31
3.4.4. Métodos de reconstrucción filogenética	31
3.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	33
4.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	33
4.2. INSTALACIONES.....	33
4.3. EQUIPOS, MATERIALES E INSUMOS	34
4.3.1. Equipos	34
4.3.2. Insumos.....	35
4.3.3. Materiales.....	35
4.4. PLAN DE MANEJO.....	36
4.4.1. Cepas patogénicas.....	36

4.4.2. Obtención de larvas	37
4.4.3. Pruebas de desafío	38
4.4.4. Muestreos.....	38
4.4.5. Descarte de material biológico	38
4.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
4.5.1. Formulación de hipótesis.....	40
4.5.2. Variables evaluadas	40
4.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.	41
4.6.1. Pruebas bioquímicas	41
4.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS	44
4.7.1. Extracción de ADN de aislados bacterianos.....	44
4.7.2. Electroforesis en gel de agarosa	44
4.7.3. Purificación de ADN	45
4.7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa	45
4.7.5. Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST)	46
4.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	46
4.9. MÉTODO DE DIAGNÓSTICO VTB417 Y VCPA.....	48
5. RESULTADOS.....	50
5.1. SUPERVIVENCIA EN LARVAS.	50
5.1.1. Síntomas de la infección	52
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.	54
5.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	57
5.4. IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECCIÓN DE AISLADOS BACTERIANO.	59
6. DISCUSIÓN.	60
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	65
7.1. CONCLUSIONES.....	65
7.2. RECOMENDACIONES.	66
8. BIBLIOGRAFÍA	67
9. Anexos	72

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resumen del diseño experimental con la definición de los tratamientos utilizados en las tres pruebas de desafío en moluscos bivalvos. ...	40
Tabla 2. Condiciones para PCR	45
Tabla 3. Cebadores usados para secuenciación y amplificación por MLST	46
Tabla 4. Número de secuencias para cada género y especie empleados en el análisis filogenético (se incluye outgroup).....	47
Tabla 5. Secuencias de cebadores VTB417 y VCPA para método de diagnóstico.....	48
Tabla 6. Condiciones de PCR para método de diagnóstico	49
Tabla 7. Supervivencia (promedio \pm desviación estándar) de larvas de <i>C. gigas</i> , <i>N. subnodosus</i> y <i>S. crassisquama</i> a las 48 horas post infección	50
Tabla 8. Síntomas de infección en larvas de <i>C. gigas</i> , <i>N. subnodosus</i> y <i>S. crassisquama</i>	53
Tabla 9. Reacciones Positivas y negativas de las pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas Bspr 16001 y Bspr 17002.	55
Tabla 10. Antibiograma a antibióticos comerciales (discos).	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Moluscos bivalvos (a) <i>Crassostrea gigas</i> , (b) <i>Nodipecten subnodosus</i> , (c) <i>Spondylus crassisquama</i>	23
Figura 2. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM. ...	33
Figura 3. Instalaciones para las pruebas desafío.....	34
Figura 4. Crecimiento en placa en medio de cultivo TSA de las bacterias.....	36
Figura 5. Inducción al desove de moluscos bivalvos.	37
Figura 6. Obtención de larvas	38
Figura 7. Incubación de bacterias a 28°C durante 24 horas	41
Figura 8. Supervivencia a las 48 horas de larvas en etapa umbonada temprana <i>C. gigas</i> , <i>N. subnodosus</i> , <i>S. crassisquama</i> infectados.....	51
Figura 9. Supervivencia a las 48 horas de larvas en etapa umbonada temprana <i>C. gigas</i> , <i>N. subnodosus</i> , <i>S. crassisquama</i> infectados.....	52
Figura 10. Síntomas de infección en larvas de <i>C. gigas</i> , <i>N. subnodosus</i> y <i>S. crassisquama</i>	53
Figura 11. Cepas patogénicas identificadas	57
Figura 12. Árbol filogenético basado en el Análisis de Secuencias Multilocus (MLST).....	58
Figura 13. Prueba de amplificación utilizando los cebadores VcpaF-VcpaR.	59

LISTA ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Curva de crecimiento para la cepa Bspr 16001 durante 10 horas, con densidad óptica de 620 nm.	72
Anexo B. Curva de crecimiento para la cepa Bspr 17002 durante 10 horas, con densidad óptica de 620 nm.	73
Anexo C. Concentración mínima inhibitoria a Oxitetraciclina (ppm).....	74
Anexo D. Síntomas de infección evaluados para larvas de <i>S. crassisquama</i> , <i>N. subnodosus</i> y <i>C. gigas</i>	75

GLOSARIO

BACTERIAS: organismo microscópico unicelular, carente de núcleo, que se multiplica por división celular sencilla o por esporas.

CARACTERIZACIÓN: comprende todas las actividades asociadas con la identificación, descripción cuantitativa y cualitativa, documentación de las poblaciones, así como su hábitat natural y los sistemas de producción a los que están o no adaptadas.

CEBADORES: es la secuencia de inicio en la replicación de la cadena. Cada cebador está formado por nucleótidos de ácido ribonucleico (ARN), que permite que el ADN polimerasa III comience la síntesis de la nueva cadena de ADN en la replicación del ADN; mientras que muchas técnicas de laboratorio como la secuenciación de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cebadores usados usualmente son moléculas de ADN cortas y sintetizadas de forma química, de aproximadamente veinte bases de longitud.

CEPA: en microbiología, población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

dNTP: deoxinucleósido trifosfato, se distinguen el dATP, dCTP, dTTP y dGTP. El grupo trifosfato se encuentra siempre localizado en posición 5'. Son los precursores utilizados en reacciones de polimerización de DNA. Por ejemplo, en replicación de DNA y ensayos de PCR.

EPIZOOTIA: es una enfermedad contagiosa que ataca a un número elevado e inusual de animales al mismo tiempo y lugar y se propaga con rapidez. Su término equivalente en medicina es epidemia.

ESPECIE NATIVA: individuo propio del espacio donde se encuentra distribuido de modo natural, sin intervención humana, también denominada autóctona.

ESTADIO: es el término adecuado para referirse a la etapa o período determinado en la evolución de una enfermedad.

ETIOLOGÍA: etiología Es el estudio de las causas de una enfermedad.

GENES HOUSE-KEEPING: son típicamente genes constitutivos que se requieren para el mantenimiento de la función celular básica y se expresan en todas las células de un organismo en condiciones normales. Se expresan a tasas relativamente constantes en la mayoría de las situaciones no patológicas.

HIBRIDACIÓN: se trata de un proceso de unión de dos cadenas complementarias de ADN, ARN o de ADN y ARN para formar una molécula de ácido nucleico de doble cadena. Es un método muy versátil que permite estudiar el grado de relación genética entre dos ácidos nucleicos.

IDENTIFICACIÓN: la identificación es un conjunto de técnicas y procedimientos empleados para establecer la identidad de un microorganismo. Suele basarse en la combinación de varios métodos.

INFECCIÓN: infección es la invasión de un anfitrión por un microorganismo patógeno, su multiplicación en los tejidos y la reacción del anfitrión a su presencia y a la de sus posibles toxinas. Las infecciones pueden deberse a bacterias, hongos, virus, protozoos o priones.

LARVA: las larvas son las fases juveniles de los animales con desarrollo indirecto (con metamorfosis) y que tienen una anatomía, fisiología y ecología diferente del adulto.

MLST: la Tipificación Multilocus de Secuencias (en inglés Multilocus Sequence Typing, MLST) es una técnica genética para la caracterización taxonómica de bacterias y microorganismos. El procedimiento caracteriza muestras de especies microbianas mediante la secuenciación de ADN de fragmentos internos de varios genes de mantenimiento.

MOLUSCOS BIVALVOS: son un conocido grupo al que pertenecen especies tan importantes como ostras, almejas y mejillones. Se caracterizan por tener el cuerpo aplanado lateralmente y tener dos conchas unidas en el dorso y que cubre por completo el cuerpo del animal.

NECROSIS: muerte de la mayoría o de todas las células de un órgano o tejido debido a una enfermedad.

PATOGENICIDAD: se define como su capacidad para producir enfermedad en huéspedes susceptibles.

PATÓGENO: un patógeno o agente biológico patógeno es aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en un huésped.

PATOLOGÍA: estudiar las enfermedades en su más amplia aceptación, como estados o procesos fuera de lo común que pueden surgir por motivos conocidos o desconocidos.

PCR: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica utilizada para hacer numerosas copias de un segmento específico de ADN de forma rápida y precisa. La reacción en cadena de la polimerasa permite a los investigadores

obtener las grandes cantidades de ADN que se requieren para diversos experimentos y procedimientos en biología molecular.

PECTINIDOS: conocidos vulgarmente como vieiras, son una familia de moluscos bivalvos, emparentados de cerca con las almejas y las ostras.

PRUEBAS DESAFÍO: se llevan a cabo generalmente en un ambiente controlado, es el conjunto de fenómenos observados en el laboratorio a partir de productos biológicos vivos.

SECUENCIA DE ADN: es una sucesión de letras que representan la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN.

SECUENCIACIÓN DE ADN: la secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable que forma la base de los programas de desarrollo de los seres vivos.

SUSCEPTIBILIDAD: referido al animal que no posee suficiente resistencia para protegerse contra un agente patógeno determinado y evitar la infección o la enfermedad producida por ese agente infeccioso.

TAXONOMÍA: ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación, generalmente científica; se aplica, en especial, dentro de la biología para la ordenación jerarquizada y sistemática de los grupos de animales y de vegetales.

UMBONADA: estadio larvario en el cual a medida que la larva crece su concha adquiere una forma más redondeada y pasa a denominarse larva veliger umbonada.

VIBRIOSIS: es una enfermedad bacteriana, causada por cepas patógenas extracelulares de varias especies pertenecientes al género *Vibrio*. Estas bacterias tienen en algunos casos una patogénesis desconocida.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Beaz¹ algunas especies del género *Vibrio* son importantes patógenos bacterianos que afectan el cultivo de moluscos bivalvos. Las patologías causadas por *Vibrios* en bivalvos se conoce desde los años 60, sin embargo son escasos los estudios sistemáticos y en profundidad en estas especies. Forrest *et al*² por su parte expone que los cultivos de moluscos principalmente ostras, mejillones y almejas sufren de graves mortalidades, entre las posibles causas está la ocurrencia de enfermedades, Guillard³ también afirma que se da debido a una amplia variedad de patógenos que se encuentran en los ambientes acuáticos, en su mayoría de origen bacteriano principalmente representantes del género *Vibrio*.

En América Latina, se han realizado estudios que han permitido detectar algunos agentes patógenos asociados a mortalidades larvarias. Nottage *et al*⁴ encontraron vibriosis o necrosis bacilar en los cultivos de larvas de moluscos bivalvos demostrando que 17 de 20 *Vibrio spp.* son patógenos, estas fueron cepas aisladas de moluscos enfermos productoras de toxinas ciliostáticas y proteasas causantes de infecciones. Otros investigadores como Escudero⁵ en un estudio de *Ostrea edulis* en Inglaterra, encontró *Vibrio sp.* y *Pseudomonas sp.* a los dos días del comienzo de los cultivos, iniciándose las mortandades a partir del cuarto y sexto día de haberlos aislado, es decir, a los 6 y 8 días de la emisión larvaria. Luna-González *et al*⁶ estudiaron la susceptibilidad comparativa en larvas veliger de cuatro especies de moluscos bivalvos a una cepa de *Vibrio alginolyticus*. Los resultados muestran una mayor susceptibilidad en larvas de catarina (*Argopecten ventricosus*) y mano de león (*Nodipecten subnodosus*) a la bacteria patógena que el resto de las especies del ensayo, mientras que los resultados de concentración letal 50 (CL50) para larvas de ostra del pacífico (*Crassostrea gigas*) mostró que esta especie era la menos susceptible a *V. alginolyticus* cepa APSA2 y los signos de enfermedad fueron similares a los de la vibriosis descrita en trabajos previos para las tres especies. Ante este escenario es necesario impulsar el estudio de patógenos y los problemas sanitarios asociados, que permita disminuir el impacto

¹ BEAZ HIDALGO, Roxana. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. Univ Santiago de Compostela, 2008.

² FORREST, Barrie M., et al. Bivalve aquaculture in estuaries: review and synthesis of oyster cultivation effects. *Aquaculture*, 2009, vol. 298, no 1, p. 1-15.

³ GUILLARD, Robert RL. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *The Biological Bulletin*, 1959, vol. 117, no 2, p. 258-266.

⁴ NOTTAGE, A. S.; BIRKBECK, T. H. Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. *Journal of invertebrate pathology*, 1990, vol. 56, no 1, p. 15-19.

⁵ ESCUDERO, Fundación Alfonso Martín (ed.). *Impulso, desarrollo y potenciación de la ostricultura en España*. Fundación Alfonso Martín Escudero, 2002.

⁶ LUNA GONZÁLEZ, Antonio. Susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus* y mecanismos de defensa en moluscos bivalvos. 2003.

causado por agentes patógenos tipo *Vibrio*, que generan altas pérdidas económicas y detienen el desarrollo de la industria acuícola.

Las dos especies de pectínidos objeto de estudio *N. subnodosus* y *S. crassisquama* por ser especies de importancia para el desarrollo de Ecuador, precisan investigaciones que permitan su cultivo en cautiverio y así contribuir al enriquecimiento de técnicas de producción para dichos organismos. Annika K. Mackensen *et al*⁷ estudiaron el bivalvo *Spondylus crassisquama* y su relevancia para la biodiversidad macro bentónica, en la costa norte ecuatoriana. Descubrieron que las conchas grandes y pesadas del bivalvo ofrecen un sustrato exclusivo para numerosas especies de epibiontes y especies de endobiontes. Por tal motivo, es una especie de importancia para repoblamiento de las costas ecuatorianas, lo cual contribuye a la estabilidad y biodiversidad de los ecosistemas acuáticos marinos. Sin embargo, la producción de esta especie es una limitante debido a la escases de información para la producción en cautiverio que permita desarrollar paquetes tecnológicos para el cultivo de *S. crassisquama*, ya que se caracteriza por ser una especie con alta sensibilidad a cambios ambientales generando susceptibilidad ante agentes patógenos tipo oportunistas. De la misma forma, *Nodipecten subnodosus* presente en diferentes zonas ecuatorianas, genera gran interés por su alto valor comercial y como alternativa productiva para la seguridad alimentaria de la región. De acuerdo con Pérez de León *et al*⁸ existe un gran interés en desarrollar métodos de cultivo para esta especie debido a su alto potencial para acuicultura. No obstante, las producciones de este pectínido son frecuentemente afectadas por enfermedades bacterianas, provocando sustancialmente cultivos con baja supervivencia en los estadios larvarios. Este hecho ha sido corroborado por Thompson *et al*⁹, quienes obtuvieron seis aislados del pectínido *N. subnodosus*, en los cuales se determinó la presencia de *V. brasiliensis* a partir de características fenotípicas, secuenciación del gen 16S ARNr, contenido de G + C y DDH. En cuanto a la ostra japonesa *C. gigas* se hará un breve recuento, Vásquez¹⁰ menciona que a partir de 1998 se comenzaron a registrar mortalidades inusuales del ostión, alcanzando porcentajes mayores al 80% del total de la

⁷ MACKENSEN, Annika K., et al. *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819 as a microecosystem and the effects of associated macrofauna on its shell integrity: isles of biodiversity or sleeping with the enemy? *Marine Biodiversity*, 2012, vol. 42, no 4, p. 443-451.

⁸ PÉREZ DE LEÓN, Arellano-Martínez M, Ceballos-Vázquez BP. 2005. Reproduction of *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835) in suspended culture in the Guerrero Negro Lagoon, Baja California Sur, Mexico. Book of Abstracts, 15th International Pectinid Workshop, Mooloolaba, Australia, 21–26 April 2005.

⁹ ROMALDE, Jesús L., et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in microbiology*, 2014, vol. 4, p. 413.

¹⁰ VÁSQUEZ-YEOMANS, Rebeca; CÁCERES-MARTÍNEZ, Jorge; GARCÍA ORTEGA, Adrián Mauricio. Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología*, 2004, vol. 75, no 2.

producción. Estos episodios de mortalidad se han mantenido de forma más o menos regular y la hipótesis de un posible agente patógeno involucrado, como un virus, una bacteria o ambos. Sin embargo esta especie a pesar de ser un bivalvo introducido en diferentes zonas geográficas ha mostrado gran adaptación y alta resistencia a los cambios del medio en el que se desarrolla en los últimos años, catalogándose como una de las especies más resistentes de moluscos bivalvos, razón por la cual se tomó en este estudio como punto de control debido a que existen numerosas revisiones sobre esta especie.

Sandaa¹¹ expone que en los últimos años, con la aplicación de técnicas moleculares se ha logrado identificar la gran diversidad de especies bacterianas del género *Vibrio* que interactúan con moluscos bivalvos y la función ecológica que ellas cumplen en el crecimiento de estos recursos. Rodríguez-Herrera *et al*¹² menciona que la mayoría de las técnicas moleculares se basan en la hibridación de ADN, las técnicas basadas en PCR y Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST). El desarrollo de estas técnicas moleculares y otras técnicas basadas en la secuenciación de genes house-keeping para distintos patógenos mediante el uso de cebadores específicos, empleados para el estudio de bacterias características de una región que debido a su localización pueden presentar preferencias por un hospedero que por otro, requieren de un método de diagnóstico efectivo para la detección rápida de genes de toxina propios de bacterias patógenas. Avendaño *et al*¹³ argumenta que se da especialmente en una etapa previa a la infección cuando los patógenos se encuentran aún en bajas concentraciones para ser detectados, además la sensibilidad de las técnicas moleculares ofrece mayor confiabilidad para la realización de estudios en comunidades bacterianas asociadas a los cultivos de moluscos bivalvos.

¹¹ SANDAA, Ruth-Anne, et al. Characterisation of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*), using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, vol. 26, no 2, p. 302-311.

¹² RODRÍGUEZ-HERRERA, R., et al. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. *Acta Química Mexicana [Internet]*, 2009, vol. 1, no 1.

¹³ AVENDAÑO, RUBÉN E., et al. Sobrevivencia y crecimiento de post-larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en Bahía Inglesa, Chile: efectos del origen, distribución en la bahía y bacterioflora larval. *Revista chilena de historia natural*, 2001, vol. 74, no 3, p. 669-679.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la susceptibilidad de tres especies de larvas de moluscos bivalvos a dos cepas patógenas pertenecientes al género *Vibrio* en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM-ESPOL.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

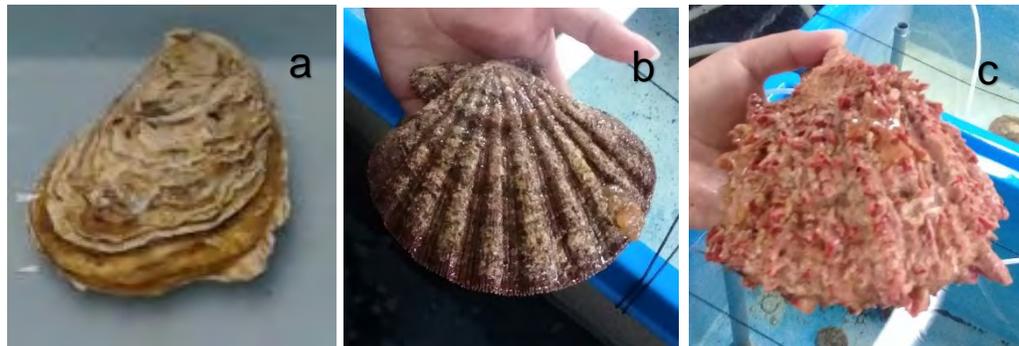
- Evaluar supervivencia larvaria de *Crassostrea gigas*, *Nodipecten subnodosus* y *Spondylus crassiquama* mediante pruebas de desafío con dos cepas patógenas.
- Caracterizar e identificar cepas patógenas de larvas de moluscos bivalvos, mediante microbiología clásica y análisis de secuencias multilocus con cuatro genes house-keeping.
- Evaluación de métodos diagnósticos para la detección temprana para las cepas patógenas en estudio.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE

Según Gosling¹⁴ afirma que el filo Mollusca es uno de los grupos más grandes, diversos e importantes del reino animal. Hay más de 50 000 especies descritas en el phylum y cerca de 30 000 de ellas se encuentran en el mar. El filo tiene ocho clases, una de las cuales es la de los lamelibranquios o Bivalvos (Figura 1). Helm y Bourne¹⁵ describen que estos animales están comprimidos lateralmente y las partes blandas del cuerpo están completa o parcialmente recubiertas por la concha, que está formada por dos valvas unidas por una charnela. Las branquias o ctenidios de los animales de esta clase son órganos bien desarrollados y especializados para la alimentación, así como para la respiración. Gosling¹⁶ dice que otra característica del phylum es un pie muscular grande que se utiliza generalmente para la locomoción.

Figura 1. Moluscos bivalvos (a) *Crassostrea gigas*, (b) *Nodipecten subnodosus*, (c) *Spondylus crassisquama*, laboratorio de moluscos CENAIM-ESPOL.



¹⁴ GOSLING, Elizabeth. *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley & Sons, 2008.

¹⁵ HELM, Michael M.; BOURNE, Neil. *Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico*. Food & Agriculture Org., 2006.

¹⁶ GOSLING, Elizabeth. Op. Cit., p. 21.

A continuación, se proporciona una explicación de la taxonomía actual de cada especie, modificado de Coan y Valentich-Scott¹⁷.

- Thunberg, 1793

Reino: Animalia
Filo: Mollusca
Clase: Bivalvia
Orden: Ostreoida
Familia: Ostreidae
Género: *Crassostrea*
Especie: *gigas*

- Sowerby, 1835

Phylum: Mollusca
Clase: Bivalvia
Subclase: Pteriomorpha
Superorden: Eupteriomorpha
Orden: Ostreoida
Suborden: Pectinina
Superfamilia: Pectinacea
Familia: Pectinidae
Subfamilia: Pectininae
Género: *Nodipecten*
Especie: *subnodosus*

- Linnaeus, 1758

Reino: Animalia
Filo: Moluscos
Clase: Bivalvia
Orden: Ostreoida
Suborden: Pectinina
Superfamilia: Pectinoidea
Familia: Spondylidae (Gray, 1826)
Género: *Spondylus*
Especie: *Crassisquama*

¹⁷ COAN, Eugene V.; VALENTICH-SCOTT, Paul. Bivalve seashells of tropical west America. *Marine bivalve mollusks from Baja California to northern Peru*, 2012, vol. 2.

3.1.1. Distribución geográfica y hábitat. Gosling¹⁸ expone que la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* es nativa de la región del Pacífico Indo-Occidental, pero debido a las introducciones exitosas en la costa del Pacífico de América del Norte, Europa Occidental y Australia, prácticamente tiene una distribución global. Mientras que las vieiras se encuentran en todas las aguas de los hemisferios norte y sur y muestran una distribución global más extensa. Sin embargo, los rangos de temperatura de especies individuales de pectinidos no son tan amplios como los de algunas especies de ostras y almejas. Rombouts¹⁹ describe que *N. subnodosus* se distribuye desde baja california a Paita (Perú) y según Lodeiros²⁰ *Spondylus crassisquama* se distribuye principalmente en las islas costeras de la provincia de Panamá: Roca Partida y otras de las Islas Revillagigedo, México (19.0° N); Isla del Coco, Costa Rica; L'Île Clipperton, Francia; Isla Jicarita, Panamá (7.2° N); Isla de Malpelo, Colombia; Isla San Salvador e Isla Pinta (0.6° S), Islas Galápagos, Ecuador; también en el Indo-Pacífico occidental en Hawai; presente en profundidades de 4 a 80 m.

3.1.2. Hábitos alimenticios. García²¹ sustenta que las especies de bivalvos ocupan diversos hábitats y se alimentan de diferentes maneras, predominando el hábito suspensívoro, aunque pueden utilizar distintas alternativas alimentarias y de relación con el entorno. Los bivalvos silvestres se alimentan de una variedad de partículas suspendidas (cestón) tales como bacterias, fitoplancton, microzooplancton, detritus, pero también sobre material orgánico disuelto (DOM), tales como aminoácidos y azúcares. Muller-Feuga²² expone que la disponibilidad de microalgas es un factor fundamental para el cultivo de moluscos bivalvos, ya que éstas son su fuente de alimento única o principal. Estrada *et al.*²³ plantea que entre los criterios de selección de las especies de microalgas que se utilizan para alimentar a estos organismos, están el tamaño, la digestibilidad, el valor nutricional y la facilidad para su producción masiva. Las microalgas más utilizadas en sistemas de cultivo son *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Pavlova lutheri* y *Tetraselmis* sp. entre otras.

¹⁸ GOSLING, Elizabeth. Op. Cit., p. 21.

¹⁹ Rombouts, A. 1991. Guidebook of Pecten shells. Universal Book Services. Oegstgeest. 157 p.

²⁰ LODEIROS, César, et al. Spondylids of Eastern Pacific Ocean. Journal of shellfish research, 2016, vol. 35, no 2, p. 279-293.

²¹ GARCÍA-CUBAS, Antonio; REGUERO, Martha. *Catálogo ilustrado de moluscos del Golfo de México y Mar Caribe*. UNAM, 2007.

²² MULLER-FEUGA, Arnaud; MOAL, Jeanne; KAAS, Raymond. The microalgae of aquaculture. *Live feeds in marine aquaculture*, 2003, p. 206-252.

²³ ESTRADA, N., et al. Biología y cultivo de los moluscos pectinidos del género nodipecten: 1st, Chapter: 4. 2011.

3.2. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE.

3.2.1. Anatomía externa. Helm argumenta que:

El rasgo más destacado de los bivalvos es la existencia de dos valvas de igual o diferente tamaño y que pueden o no cerrarse completamente sobre las partes blandas del interior. Tienen un sin fin de formas y colores según la especie de la que se trate. Las valvas están formadas principalmente de carbonato cálcico y tienen tres capas; la capa interna o nacarada, la capa intermedia o brillante que forma la práctica totalidad de la concha, y la capa externa o periostraco, una capa pardusca y áspera que los animales más viejos suelen perder debido a la abrasión o al desgaste.

Los bivalvos no tienen cabeza ni cola bien definidas, aunque se emplean los mismos términos anatómicos que se usan para describir estas partes en otros animales. El umbo o zona de la charnela, donde se unen las valvas, es la parte dorsal del animal, y la región en el lado opuesto es el margen ventral. En especies que cuentan con sifones (almejas), el pie se encuentra en posición anterior-ventral y los sifones en la zona posterior. En las ostras la zona anterior está en la charnela y en las vieiras se encuentra dónde están localizados la boca y el pie rudimentarios²⁴.

3.2.2. Anatomía interna. El mismo autor afirma que:

Las partes blandas están recubiertas por el manto, que está compuesto de unas finas fundas de tejido de bordes más gruesos. Las dos mitades del manto están unidas a la concha por la charnela en posición ventral respecto de la línea paleal, pero sueltas en los bordes. Los bordes engrosados pueden o no estar pigmentados y tienen tres pliegues. El borde del manto suele tener tentáculos, que en la almeja se encuentran localizados en las puntas del sifón. En especies como la vieira, el borde del manto no sólo tiene tentáculos, sino que también tiene numerosos órganos fotosensibles como los ojos, la función principal del manto es segregar la concha, pero también cumple otros propósitos, ya que posee una función sensorial y puede iniciar el cierre de las valvas como respuesta a condiciones desfavorables en el entorno. También puede controlar la entrada de agua en la cavidad corporal y además tiene función respiratoria. En especies como las vieiras, regula la entrada y salida de agua en la cavidad corporal y el movimiento del animal cuando nada²⁵.

3.2.2.1. Músculo aductor. Radiarta expone que:

Al retirar el manto se pueden ver las partes blandas del cuerpo, los músculos aductores en las especies dimiarias (almejas y mejillón) o un único músculo en las especies monomiarias (ostras y vieiras). En las almejas y mejillones los dos músculos aductores se encuentran cerca de los márgenes anterior y posterior de las valvas de la concha. En las ostras y vieiras el gran músculo único está ubicado en el centro. Los músculos cierran las valvas y actúan contra el ligamento y resilio, que activan el

²⁴ HELM, Michael M.; BOURNE, Neil. Op. Cit., p. 22

²⁵ HELM, Michael M.; BOURNE, Neil, Op. Cit., p. 22

mecanismo de apertura de las valvas cuando el músculo se relaja. En las especies monomiarías se ven claramente las divisiones del músculo aductor. La gran porción anterior (estriada) del músculo se denomina «músculo rápido» y se contrae para cerrar las valvas; la porción más pequeña, la parte lisa, conocida como «músculo de cierre», mantiene las valvas en posición cuando se han cerrado o están parcialmente cerradas. Algunas especies que viven enterradas en el sustrato (p. ej. almejas) necesitan una presión externa para mantener las valvas cerradas ya que los músculos se debilitan y las valvas se abren si se mantiene a las almejas fuera del sustrato en el tanque²⁶.

3.2.2.2. Branquias. Según Radiarta *et al* “la prominencia de las branquias o ctenidios es una de las características importantes de los lamelibranquios. Se trata de órganos grandes en forma de hoja que se utilizan en parte para la respiración y en parte para filtrar el alimento del agua. Hay dos pares de branquias colocados a ambos lados del cuerpo. En el extremo anterior, hay dos pares de lenguas, llamados palpos labiales, que rodean la boca y facilitan la introducción de alimentos”²⁷.

3.2.2.3. Pie. El pie se encuentra en la base de la masa visceral. En la almeja se trata de un órgano bien desarrollado que el animal utiliza para excavar en el sustrato y sujetarse. En las vieiras y el mejillón, el pie es bastante reducido y tiene escasa función en los adultos, pero en las etapas de larva y juveniles es importante y se utiliza para la locomoción (en las ostras es un órgano rudimentario). En la parte central del pie hay una abertura desde la glándula bisal a través de la cual el animal segrega una sustancia filamentosas y elástica llamada «biso» con la que se puede adherir al sustrato. Esto es importante en especies como el mejillón y en algunas vieiras pues permite al animal sujetarse y mantener su posición²⁸.

3.2.3. Ciclo Vital. Se describe el ciclo biológico de moluscos bivalvos en cuatro fases que comprenden desde el desarrollo gonadal hasta el desarrollo postlarval.

3.2.3.1. Desarrollo gonadal y desove. Helm expone que:

En la mayoría de los bivalvos, la madurez sexual depende del tamaño del animal más que de su edad, y el tamaño que alcanzan en la madurez sexual varía de una especie a otra y según la distribución geográfica. La producción de óvulos y esperma es un proceso denominado gametogénesis, cuyo inicio depende de varios factores, como el tamaño del bivalvo, la temperatura y la cantidad y calidad de alimento que

²⁶ RADIARTA, I. Nyoman; SAITOH, Sei-Ichi; MIYAZONO, Akira. GIS-based multi-criteria evaluation models for identifying suitable sites for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) aquaculture in Funka Bay, southwestern Hokkaido, Japan. *Aquaculture*, 2008, vol. 284, no 1-4, p. 127-135.

²⁷ *Ibid.*, p. 251

²⁸ Kraeuter, J.N. & Castagna, M. (eds). 2001. *Biology of the Hard Clam*. Elsevier. *Devel. Aquaculture Fish. Sci.* 51: 751 pp.

recibe. La gónada está compuesta por conductos ciliados ramificados desde donde se abren numerosos sacos o folículos. La proliferación de las células germinales que recubren la pared del folículo da lugar a los gametos. Aunque el desarrollo de la gónada es un proceso continuo, se pueden distinguir varias fases descriptivas; descanso, desarrollo, madurez, desove parcial y desove completo. Cuando las gónadas o el tejido gonadal han alcanzado la plena madurez, son fáciles de ver y ocupan gran parte del cuerpo blando del animal. Los conductos que transportan los gametos hasta la cavidad corporal se desarrollan, aumentan de tamaño y se pueden observar a simple vista en la gónada²⁹.

3.2.3.2. Desarrollo embrionario. Según Argüello-Guevara “Cuando ocurre la fertilización y los gametos entran en contacto, se observa la formación del fi cuerpo polar RST. Las segmentaciones de células posteriores en 2 células desiguales iniciadas. La segunda división celular ocurre después de 1 hora, los blastómeros se dividen en 4 células. Divisiones posteriores dan como resultado la formación de mórula y blástula, después de 6-8 horas; la etapa de gástrula, seguido por la formación de larvas”³⁰.

3.2.3.2. Desarrollo larvario. Helm expresa que:

La formación de larvas inicia en una trocófora con motilidad a las 18 horas y con un tamaño de 60-80 µm. La fase larvaria inicial es conocida como la fase de charnela recta, «D» o Prodisoconcha I. La longitud de la concha en la fase inicial de la charnela recta, varía según la especie, pero generalmente mide 80-100 µm (más en ostras larvíparas). A las 26 horas se desarrolla una larva veliger en forma de D calcificada³¹. En siete días desarrollan unas protuberancias, llamadas umbos, en la concha cerca de la charnela. Conforme crecen las larvas, los umbos sobresalen más aún, encontrándose ya las larvas en la fase umbonada o Prodisoconcha II. En esta fase, las larvas tienen formas diferenciadas y con práctica es posible identificar las distintas especies de bivalvos entre el plancton³².

3.2.3.4. Desarrollo postlarval. Según Helm “(post-larva sementada o fijada, juvenil, adulto) la metamorfosis es un momento crítico en el desarrollo de los bivalvos, pues el animal deja su actividad natatoria y planctónica para llevar una existencia sedentaria y bentónica. Puede haber mortalidades importantes en este tiempo, tanto en la naturaleza como en el criadero”³³.

²⁹ HELM, Michael M.; BOURNE, Neil. Op. Cit., p. 22

³⁰ ARGÜELLO-GUEVARA, Wilfrido; LOOR, Alfredo; SONNENHOLZNER, Stanislaus. Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the Tropical rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray 1825). *Journal of Shellfish Research*, 2013, vol. 32, no 3, p. 665-670.

³¹ LOOR, Alfredo, et al. Early life cycle and effects of microalgal diets on larval development of the spiny rock-scallop, *Spondylus limbatus* (Sowerby II, 1847). *Aquaculture*, 2016, vol. 450, p. 328-334.

³² HELM, Michael M.; BOURNE, Neil. Op. Cit., p. 22

³³ HELM, Michael M.; BOURNE, Neil. Op. Cit., p. 22

3.3. SISTEMA INMUNE DE MOLUSCOS BIVALVOS.

Vargas y Barracco³⁴ expresa que los moluscos, como todos los invertebrados, poseen un sistema de defensa llamado inmunidad innata o natural que los protege contra patógenos. Por su parte, los vertebrados cuentan, además de la inmunidad innata, con un sistema inmune adquirido (también llamado adaptativo), el cual se caracteriza por su alta especificidad y memoria inmunológica. La especificidad se debe a la capacidad de producir una variedad de anticuerpos, cada uno de ellos dirigidos contra un epítotope (sitio antigénico) específico. Sin embargo, la memoria inmunológica se observa cuando, después del primer contacto con el antígeno, las clonas específicas quedan sensibilizadas y, en contactos posteriores, se expanden (expansión clonal) rápidamente, ofreciendo una respuesta.

De acuerdo con Allam³⁵ el sistema inmune de los moluscos está representado principalmente por hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos tipos de componentes, celular y humoral. Debido a que los moluscos bivalvos tienen un sistema circulatorio abierto compuesto por senos, la hemolinfa baña todos los tejidos y permite que los hemocitos y los componentes humorales se distribuyan uniformemente, favoreciendo el encuentro con las partículas (bióticas y abióticas).

3.4. MÉTODOS PARA CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.

3.4.1. Métodos fenotípicos. Bou *et al* afirma que:

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, se elige una batería viable para las pruebas, con el fin de darle fiabilidad a la caracterización de la especie bacteriana que se pretende identificar. Los laboratorios deben elaborar y realizar un proceso de identificación normalizado en su actividad diaria, que utilice de forma secuencial o simultánea un conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel de género y especie, y que incluya la mayoría de las bacterias desde el punto de vista infeccioso³⁶.

³⁴ VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. *Los moluscos pectinidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura*, 2001, p. 127-146.

³⁵ ALLAM, Bassem; PAILLARD, Christine. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Diseases of aquatic organisms*, 1998, vol. 33, no 2, p. 123-128.

³⁶ BOU, Germán, et al. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2011, vol. 29, no 8, p. 601-608.

3.4.1.1 Caracterización fenotípica. Según Iseberg “la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles”³⁷.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características “observables” de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación³⁸.

3.4.2. Caracterización bioquímica. Según Bou *et al* “para identificar una bacteria no basta solamente considerar sus características morfológicas, sino también hay que tener en cuenta ciertas reacciones enzimáticas que se producen en la célula bacteriana frente a un sustrato determinado (Medios de cultivo y requisitos de crecimiento en relación a atmósfera), temperatura y nutrición”³⁹.

3.4.2.1 Pruebas Bioquímicas. Mac Fadding⁴⁰ expresa que se debe realizar una serie de análisis para determinar la actividad metabólica de las cepas en estudio.

- Pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa
- Pruebas rápidas con lectura en menos de 6 h tal y como la hidrólisis del hipurato, la -galactosidasa (ONPG), las aminopeptidasas, la ureasa y el indol.
- Pruebas lentas, con lectura de 18 a 48 h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, Agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, descarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato.
- Pruebas basadas en caracteres de resistencia a ciertas sustancias tal y como optoquina, bacitracina, solubilidad en bilis, y crecimiento en caldo

³⁷ ISEBERG, Henry D. *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society of Microbiology, 1992.

³⁸ BOU, Germán, et al. *Op. cit.*, p. 601-608.

³⁹ BOU, Germán, et al. *Op. cit.*, p. 601-608.

⁴⁰ MAC FADDIN, Jean F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Williams & Wilkins Co., 2000.

hipersalino.

3.4.3. Métodos moleculares. Clarridge⁴¹ menciona que los métodos microbiológicos clásicos permiten caracterizar las reacciones enzimáticas de los aislados en estudio y eran implementados como un método de identificación en el pasado. Sin embargo, existen problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica en cepas de una misma especie o estrechamente relacionadas; por ejemplo, una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos y las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente, entre otros, han impuesto a los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos.

Restrepo Cardona⁴² señala que considerando la importancia de los métodos moleculares, se emplean para realizar una identificación de patógenos del género *Vibrio*; se realiza un Análisis de Secuencias Multilocus (MLST), técnica genética empleada para la caracterización taxonómica. Este enfoque se basa en el análisis de secuencias de nucleótidos para la caracterizar de forma más certera los aislamientos de éstas especies de bacterias. El objetivo de los MLST es proporcionar un sistema preciso y altamente discriminatorio que puede ser utilizado para la mayoría de las bacterias y algunos otros organismos y es particularmente útil para la tipificación de patógenos bacterianos.

3.4.4. Métodos de reconstrucción filogenética. Johnson *et al*⁴³ describe que se han propuesto varios modelos de Markov de evolución de secuencias de ADN. Estos modelos de sustitución difieren en términos de los parámetros utilizados para describir las tasas a las que un nucleótido reemplaza a otro durante la evolución. Estos modelos se utilizan con frecuencia en análisis filogenéticos moleculares. En particular, se usan durante el cálculo de la probabilidad de un árbol (en enfoques bayesianos y de máxima verosimilitud para la estimación de la reconstrucción) y se usan para estimar la distancia evolutiva entre secuencias a partir de las diferencias observadas entre las secuencias.

Los métodos de reconstrucción filogenética permiten hacer uso de la información contenida en el genoma de las especies actuales para inferir su historia evolutiva (el árbol filogenético). Hablamos de inferencia porque la reconstrucción filogenética se basa necesariamente en una información incompleta, puesto que solo tenemos acceso a la información genética de organismos actuales. Estamos, por tanto, ante

⁴¹ CLARRIDGE, Jill E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 2004, vol. 17, no 4, p. 840-862.

⁴² RESTREPO CARDONA, Leda Carolina Amparo. First record of the invasive tunicate *Didemnum vexillum* in tropical oyster cultures. 2014.

⁴³ JOHNSON, Jerald B.; OMLAND, Kristian S. Model selection in ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 2004, vol. 19, no 2, p. 101-108.

un problema de encontrar la hipótesis más probable. Por eso, la estadística juega un papel muy importante en el análisis evolutivo⁴⁴.

3.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

El concepto de “diagnóstico molecular” es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular en beneficio de la salud, detectando y/o cuantificando secuencias genéticas específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o proteínas⁴⁵.

Según Spy *et al*⁴⁶ la principal explicación a este desarrollo se debe a la dificultad de detectar un patógeno mediante la microbiología clásica. Los largos periodos de crecimiento, las condiciones de cultivo y la obtención de una muestra adecuada son los mayores factores que afectan el diagnóstico microbiológico tradicional. Considerando que las técnicas de biología molecular se basan en la detección de segmentos de ADN, no es necesaria la presencia de un microorganismo viable en la muestra, sino que solo su material genético. Los altos valores de sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico molecular, junto con la rapidez con la que se pueden obtener los resultados las han transformado en las técnicas de elección para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

⁴⁴ *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 2007.

⁴⁵ FARFÁN, BQ MAURICIO J. Biología Molecular Aplicada Al Diagnóstico Clínico. Revista Médica Clínica Las Condes, 2015, vol. 26, no 6, p. 788-793.

⁴⁶ ESPY, M. J., et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, 2006, vol. 19, no 1, p. 165-256.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. ÁREA DE ESTUDIO.

La presente investigación se realizó entre los meses de febrero a agosto del 2017, en los laboratorios del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), ubicado en la parroquia de San Pedro de Manglaralto (Santa Elena, Ecuador) (Figura 2).

Figura 2. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM.



Fuente. http://www.cenaim.espol.edu.ec/org_div_c_ls

4.2. INSTALACIONES.

El set experimental fue acondicionado con un sistema compuesto por 35 acuarios de 4 litros cada uno, usados al 50% de la capacidad; provisto de un sistema de aireación constante con regulación de aire por llaves para cada unidad experimental (Figura 3).

Figura 3. Instalaciones para las pruebas desafío.



4.3. EQUIPOS, MATERIALES E INSUMOS

4.3.1. Equipos

- Balanza de precisión 3200 g x 0,01 g. Marca Ohaus, modelo PA3202.
- Cámara digital Sony, DSC – W120.
- Blower TCG 50/60Hz
- Computador Dell inspiron cuarta generación
- Termostato enchufe de la UE 300 watts
- Microscopio con micrómetro Primo Star HAL/LED microscope, fixed-Köhler, stage L, FOV 18
- Cámara Sedgwick Rafter 50 x 20 x 1 mm (= 1 cm³)
- Calibrador Lcd 6 Pulgadas Micrómetro Digital Pie De Rey
- Filtro uv Viqua (1 a 54 GPM- 230nm)
- Filtros de cartucho PURIKOR de 5 y 0,45 micras
- Cámara de flujo laminar PP Systems
- Incubadora JP Selecta 80 Litros
- Variuscam
- Multiescam
- Cámara de electroforesis
- Microondas MIDEA MM720CTB 360w
- Centrifuga LMC-4200R
- Refrigeradora -20°C INDURAMA RI-399 CROMADA 272 L NO FROST 220V

- Autoclave Bestran BT-60A
- Termociclador VERITI APPLIED BIOSYSTEMS
- Baño María Grant, modelo GLS AQUA 12 PLUS EURO

4.3.2. Insumos

- TSA (Trypticase Soy Agar)
- TSB (Tryptic Soy Broth)
- TSBC (Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa)
- Bacto Agar
- LB (Luria Bertani LB)
- NaCl 2%
- Medio para congelar (TSB + glicerol)
- Etanol 70 y 100%
- Oxitetraciclina
- Cloro comercial
- Glicerol
- Syber safe
- Loading dye
- TBE (Tris Borato EDTA)

4.3.3. Materiales

- Tamiz de 30, 60, 80, 100, 120 y 150 μm
- Piedras difusoras
- Manguera de aireación 5 mm
- Puntas de 1 ml
- Beakers de 1 L
- Cajas Petri
- Recipientes de vidrio 4 L de capacidad
- Tanque plástico de 50 L
- Jarras de 2 litros
- Pipeta de 10 y 20 ml
- Frascos de 500 y 1000 ml
- Erlenmeyer de 2 L
- Tanques cilindro cónicos de 500 L y 1000 L
- Carboys de 30 L
- Micropipetas 10, 20, 200, 1000 μL
- Puntas 10, 20, 200, 1000 μL
- Tubos eppendorf 1,5 ml
- Tubos falcon de 15 y 50 ml
- Tubos de ensayo

- Gradillas
- Piceta

4.4. PLAN DE MANEJO.

4.4.1. Cepas patogénicas. En los años 2016 y 2017 ocurrieron dos eventos de mortalidades masivas en el área de moluscos del CENAIM, del 100% en cultivos de larvas de *Striostrea prismática*. De dichos eventos, se aislaron las bacterias causantes de las patologías, obteniendo dos especies de bacterias diferentes en cada evento. Las bacterias fueron aisladas y congeladas en medio de cultivo Tripteina Soya Agar (TSA) y glicerina a -80°C.

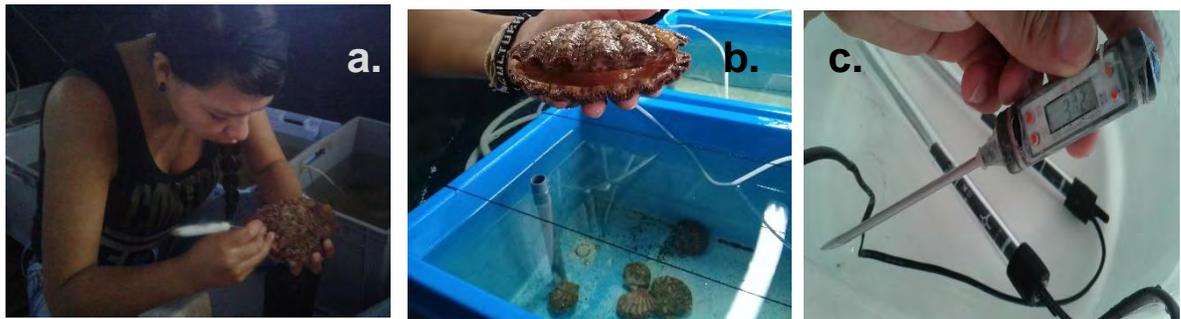
Se realizó curva de crecimiento para cada cepa bacteriana. Se activaron las cepas bacterianas en medio enriquecido LB (Luria Bertani) incubadas a 28 °C durante 24 horas. Posteriormente se replicó las bacterias en agar TSA por técnica de barrido y se comprobó la pureza de cada cepa (Figura 4). Seguido a esto se evaluó el crecimiento durante un periodo de 8 horas cada hora, en el que se hizo lectura del inoculo en medio liquido por el método de espectrofotometría en un Varioskan™ LUX multimode microplate reader y además se realizó el conteo de colonias de la siembra en agar a las 24 horas de incubación; analizando la relación entre lectura de densidad óptica y el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) para determinar el crecimiento de las cepas patogénicas (se representan en Anexo A y B).

Figura 4. Crecimiento en placa en medio de cultivo TSA de las bacterias Bspr 17002 y Bspr 16001.



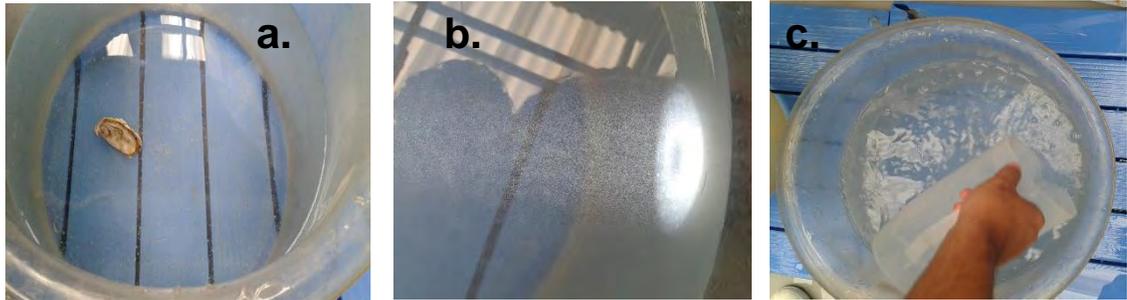
4.4.2. Obtención de larvas. Los adultos de *Nodipecten subnodosus*, *Spondylus crassisquama*, se extrajeron del medio natural y se adaptaron a condiciones de laboratorio con una temperatura aproximada de 27°C y un oxígeno disuelto igual o mayor a 4 mg/l, mientras que los adultos de *Crassostrea gigas* se obtuvieron de cultivos del CENAIM. Los reproductores de las tres especies se depuraron durante 48 horas. Se realizó inducción al desove, previa limpieza y desinfección de las instalaciones con una solución de hipoclorito al 10%. Los organismos se sometieron a choque por desecación durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó choque térmico, donde se mantuvo los reproductores en agua de mar fría (20°C) durante un periodo de 45 minutos y luego con agua de mar caliente (30°C) durante 45 minutos (Figura 5). El agua utilizada se filtró con filtro de cartucho de 5 y 0,45 micras e irradiada con luz ultravioleta.

Figura 5. Inducción al desove de moluscos bivalvos (a) limpieza, (b) depuración, (c) choque térmico.



Los gametos obtenidos se separaron de los reproductores para evitar la autofecundación y la contaminación cruzada por microorganismos presentes en las heces de los adultos, realizando así una fertilización controlada libre de patógenos (Figura 6), en una relación 10:1 (espermatozoide: ovocito). Se mantuvieron las larvas en tanques cilindro cónicos con aireación constante, recambio diario del 100% y una alimentación de 15.000 cel/ml de *Isocrisis galbana*, las larvas de *N. subnodosus* y *S. crassisquama* durante 7 días, mientras que las larvas de *C. gigas* se mantuvieron durante 5 días (ya que *C. gigas* presenta crecimiento más acelerado con respecto a las otras especies). En este periodo todas las larvas de las especies de moluscos bivalvos se encuentran en etapa umbonada temprana. Durante esta fase se presenta el primer punto crítico, debido a que su sistema inmune no está completamente desarrollado y ocurre la mayor tasa de mortalidad debido a que son más susceptibles a ataques bacterianos, por lo que se empleó oxitetraciclina a 4 ppm desde las 48 horas del primer recambio del 100% hasta 2 días antes de la etapa experimental (véase anexo C).

Figura 6. Obtención de larvas (a) desove de *C. gigas*, (b) gametos, (c) fertilización



4.4.3. Pruebas de desafío. El éxito del bioensayo depende de realizar la desinfección del set experimental, materiales e insumos como primer paso, empleando hipoclorito de sodio a concentración 10 ppm. Posteriormente, se realizaron las pruebas de desafío en larvas de etapa umbonada temprana para cada especie por separado. Inicialmente se sembraron las larvas en acuarios de 4 litros utilizables al 50 % de su capacidad, la densidad fue de 1 larva por mililitro. Las larvas de moluscos fueron sometidas a las dos cepas patógenas en estudio empleando 3 concentraciones diferentes con cada agente patógeno $1,5 \times 10^2$, $1,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^6$ UFC/ml, previo a esto se realizó la lectura de densidad óptica con la que se determinó las UFC para la infección de las unidades experimentales.

4.4.4. Muestreos. Se llevaron a cabo muestreos por triplicado de 10 ml de larvas infectadas de cada replica y se tomaron cada dos horas con el fin de determinar la prevalencia de la infección, mediante los efectos y síntomas que generan estos patógenos como disminución en la tasa de alimentación, nado errático u otros síntomas característicos de necrosis basilar o vibriosis sobre las larvas de moluscos en la etapa umbonada temprana. Este seguimiento se lo realizó durante las 12 horas, 24 y 48 horas post-infección. Al finalizar el bioensayo se determinó la supervivencia generada de cada bacteria a las tres concentraciones mencionadas.

4.4.5. Descarte de material biológico. Las bacterias en medio líquido y larvas infectadas fueron inactivadas durante 12 horas con hipoclorito antes de ser descartadas y las bacterias sembradas en medio sólido fueron incineradas.

4.5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó una prueba de desafío para cada una de las especies de moluscos estudiadas. Cada prueba de desafío se realizó por separado, pero utilizando el mismo diseño experimental, donde se evaluó el efecto de dos cepas bacterianas (Bspr16001 y Bspr17002) y tres concentraciones bacterianas ($1,5 \times 10^2$, $1,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^6$ UFC/ml) sobre la supervivencia de larvas (umbonada temprana) de las tres especies. En cada prueba de desafío se utilizó un diseño completamente

aleatorizado, conformado por dos factores (cepas bacterianas y concentración bacterianas), para un total de 6 tratamientos (Tabla 1). Cada tratamiento tuvo cuatro réplicas, para un total de 24 unidades experimentales para cada bioensayo. Las unidades experimentales fueron recipientes de 4 litros, utilizado al 50% de la capacidad efectiva. Cada recipiente fue sembrado con larvas, a una densidad de 1 larva/ml, totalizando 2000 larvas por unidad experimental. Cada desafío duró 48 horas, determinando la supervivencia acumulada al finalizar los bioensayos.

La supervivencia acumulada a las 48 horas post infección fue analizada mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un nivel de confianza de 95%, para determinar diferencias entre tratamientos. Previamente, se verificó las asunciones de normalidad (análisis de residuales) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene). Se utilizaron los métodos de comparaciones múltiples de Tukey para determinar diferencias estadísticas entre las medias de los distintos tratamientos cuando el análisis de ANOVA fue significativo.

Este diseño está representado por el siguiente modelo matemático⁴⁷.

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + u_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b$$

Dónde:

- y_{ij} : representa la observación correspondiente al nivel (i) del factor A y al nivel (j) del factor B.
- μ : efecto constante denominado media global.
- τ_i : efecto producido por el nivel i -ésimo del factor A, ($\sum_i \tau_i = 0$).
- β_j : efecto producido por el nivel j -ésimo del factor B, ($\sum_j \beta_j = 0$).
- $(\tau\beta)_{ij}$: efecto producido por la interacción entre $A \times B$, ($\sum_i (\tau\beta)_{ij} = \sum_j (\tau\beta)_{ij} = 0$).
- u_{ij} : son va independientes con distribución $N(0, \sigma)$.

⁴⁷ SÁNCHEZ-VILLEGAS, Almudena. *Bioestadística amigable*. Elsevier, 2014.

Tabla 1. Resumen del diseño experimental con la definición de los tratamientos utilizados en las tres pruebas de desafío en moluscos bivalvos *Crassostrea gigas*, *Nodipecten subnodosus* y *Spondylus crassisquama*. Cada tratamiento tuvo 4 réplicas.

Tratamientos	Patógeno	Concentración bacteriana (UFC/ml)
T1	Bspr 16001	1.5×10^2
T2	Bspr 16001	1.5×10^4
T3	Bspr 16001	1.5×10^6
T4	Bspr 17002	1.5×10^2
T5	Bspr 17002	1.5×10^4
T6	Bspr 17002	1.5×10^6

4.5.1. Formulación de hipótesis. Se plantea las siguientes hipótesis estadísticas para el análisis de la patogenicidad del patógeno en cada especie de molusco bivalvo:

H₀: hipótesis nula: Las dos cepas patógenas causan supervivencias estadísticamente iguales en las tres especies en estudio de tal manera que, no existen diferencias significativas:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

H₁: hipótesis alterna: una de las dos cepas patógenas causará bajas supervivencias en al menos una de las especies de moluscos de este estudio de tal manera que presenta diferencias estadísticas significativas:

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

4.5.2. Variables evaluadas. En este estudio se evaluó una variable que representa la susceptibilidad de las especies que corresponde a supervivencia.

4.7.2.1 Tasa de supervivencia. Porcentaje de individuos vivos en un periodo determinado; se define como la relación entre el número final y número inicial de animales.

$$TS = \frac{N^\circ Ai - N^\circ Am}{N^\circ Ai} \times 100$$

Dónde:

TS: Tasa de Supervivencia.

N^o Am: Número de Animales muertos.

N^o Ai: Número de Animales iniciales.

4.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.

4.6.1. Pruebas bioquímicas. Para realizar estas pruebas se debe tener un cultivo bacteriano cuidadosamente purificado y fresco de 24 horas de incubación (Figura 7).

Figura 7. Incubación de bacterias a 28°C durante 24 horas.



- Tinción de Gram: siguiendo la metodología de Gálvez Escobar⁴⁸ se detectó la forma de la bacteria y la respuesta a la coloración de Gram según la estructura de la pared celular, esto es si son Gram (+) o Gram (-). Para ello se tomó una pequeña cantidad de bacteria en un porta objetos con una gota de agua destilada o agua de mar estéril, se mezcló bien y se secó al aire libre, se pasó la placa 3 veces sobre una flama para el proceso de fijación de la bacteria. Luego se cubre el frotis con Cristal Violeta por un minuto, se enjuagó muy suavemente bajo un chorro fino de agua, se cubrió el frotis con lugol por 30 a 60 segundos; se enjuagó bajo un chorro fino de agua. Se decolora con etanol (95%) hasta que ya no eliminó ninguna coloración azul. Se enjuagó suavemente y cubrió el frotis con safranina por 30 segundos, se enjuagó y dejó secar. Finalmente se observó en el microscopio usando aceite de inmersión en el objetivo de 100X. La coloración azul o violeta indica que la bacteria es Gram (-).

Adicionalmente, se realizó el método de Ryus, para ello se colocó 1 gota de solución de NaOH al 3% en un porta objetivo estéril. Con un asa estéril se tomó el

⁴⁸ GÁLVEZ ESCOBAR, José Roberto, et al. Efecto antibacteriano in vitro del plasma rico en plaquetas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. 2014.

inóculo y se mezcló con una gota de NaOH. Si se observa una especie de masa elástica en el inóculo, indica que la bacteria es Gram (-).

- Catalasa: para determinar la capacidad de producir reacción de catálisis del peróxido de hidrógeno; se puso en contacto el inóculo bacteriano con una gota de peróxido de hidrógeno, observando una producción de burbujas (oxígeno liberado).
- Oxidasa: con esta prueba se detectó la presencia de la enzima citocromo-oxidasa. Para esta prueba se impregnó papel con el reactivo, se tomó el inóculo bacteriano y frotándolo sobre el papel reactivo.
- OF: la prueba del OF nos permitió determinar el tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo de la bacteria al utilizar la glucosa como sustrato, seis tubos conteniendo el medio OF para cada bacteria, fueron inoculados con una asa; en tres de los tubos, se adicionó aceite mineral, esta capa (5 mm) evitó el contacto con el aire, proporcionando un ambiente de anaerobiosis a la bacteria, mientras que los otros tubo para prueba de metabolismo oxidativo, siempre estará en contacto con el aire. Se incubaron a 28°C por 24 horas.
- Oxidación de glucosa: la formación de ácido en ambos tubos indica una reacción fermentativa. Si no se produce ninguna reacción ácida, significa que la bacteria no utiliza la glucosa por ningún método.
- Ureasa: cuando la bacteria contiene esta enzima, la ureasa liberará amonio a partir de la urea que contiene el medio, produciendo un cambio de color (rosado) del indicador del pH (rojo fenol). Se inoculó el medio con un asa estéril.
- Lisina y Ornitina Descarboxilasa: se inoculó el medio con la bacteria a identificar y se cubrió con una capa (5 mm) de aceite mineral estéril, se incubó a 28°C por 48 horas. Cuando la reacción es positiva es indicada por una reacción alcalina (violeta). El medio se vuelve amarillo debido a la producción de ácido a partir de la glucosa, dependiendo de la actividad enzimática de las bacterias.
- Arginina Deshidrolasa: en esta reacción la arginina es transformada en ornitina, amonio y dióxido de carbono. Se inoculó el caldo con la bacteria a identificar y se cubrió con una capa (5 mm) de aceite mineral estéril y se incubó a 28°C por 48 horas. La reacción positiva se indica por una reacción alcalina (violeta). El medio se vuelve amarillo debido a la producción de ácido a partir de la glucosa. La reacción es negativa si permanece ácida (amarillo)⁴⁹.

⁴⁹ PÉREZ, Raquel Granados; PERIS, María del Carmen Villaverde. Microbiología. Editorial Paraninfo, 1997.

- MR-VP: el caldo MR-VP es utilizado simultáneamente para dos pruebas: Rojo de Metilo y Voges Proskauer. Se inoculó tres tubos para cada bacteria conteniendo caldo MR-VP, con la bacteria a identificar, se incubó a 28 °C por 48 horas.
- Citrato: se inoculó el medio y se Incubó a 28°C por 48 horas. Cuando la reacción es positiva es indicada por el cambio de color del medio (verde) a azul intenso; resultado negativo si no hay cambio de color. La prueba positiva indica que la bacteria utiliza el Citrato como única fuente de Carbono.
- Indol: se inoculó un tubo que contiene agua de triptona al 1% estéril, con la bacteria; incubar a 28°C por 48 horas. Se adiciono 0.2 a 0.3 ml del reactivo de Kovac. Al observar un color rojo fuerte en la capa de la superficie, se dice que el resultado es positivo de lo contrario es negativo.
- Pruebas de fermentación de carbohidratos: para esta prueba, se preparó tubos con medio base OF con los diferentes tipos de carbohidratos en una concentración al 1%: Dextrosa, Manosa, Manitol, Mioinositol, Sucrosa. Se inoculó los tubos mediante siembra por picadura, se incubó a 28 °C hasta 48 horas. Si la reacción desarrolla un cambio de color a amarillo indica que la bacteria ha fermentado el carbohidrato que contiene el medio⁵⁰.

Cada ensayo se hizo por triplicado y se revisó cada 12 horas hasta las 48 horas. Es importante indicar que para la identificación de una bacteria hay que considerar cada uno de los resultados de cada una de las pruebas mencionadas y finalmente comparar cuidadosamente los resultados con las tablas para identificación tomadas del Manual de Bergey⁵¹.

⁵⁰ KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, Stephen. *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana, 2008.

⁵¹ HOLT, John G., et al. *The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition.*, 1977.

4.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS.

4.7.1. Extracción de ADN de aislados bacterianos. La extracción del ADN se realizó utilizando el método clásico fenol-cloroformo⁵². Se tomó una pequeña cantidad de muestra (10 µL) para cultivos en caja, se colocó en tubos eppendorf y se agregó 500 µL de buffer I (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) y 75 µL de SDS 10%, agitando con vortex. La muestra se calentó a baño María a 55°C durante 2 horas. Una vez transcurrido este período, se adicionó un volumen de 600 µL de fenol, se agitó y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos.

Para la precipitación del ADN, se transfirió el sobrenadante y se añadió un volumen (500 µL) de cloroformo-isoamil 24:1. Se agitó y centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos. Según lo recuperado (400 µL) se agregó 2,5 volúmenes (1.000 µL) de etanol frío al 100% y 0,5 volúmenes (200 µL) de acetato de amonio 5M. Se agitó suavemente y se dejó a -20°C durante 4 horas. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante, cuidando de no arrastrar el ADN. El precipitado se lavó con 300 µL de etanol frío al 70% y se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min; se repitió este procedimiento. Finalmente, se secó en estufa a 45°C por 3 horas y se agregó 50 µL de agua mili-Q, dejando en refrigeración a -20 °C⁵³.

4.7.2. Electroforesis en gel de agarosa. Se realizó la preparación del gel de agarosa al 1,5% en 50ml de buffer de disolución tampón TBE (formada por tris, borato y EDTA), posteriormente se llevó la mezcla al horno microondas durante 3 minutos y se agito levemente, nuevamente se lleva la mezcla a microondas por un minuto, se adiciono 12 microlitros de sybr-safe como colorante agitando y dejando reposar durante 15 minutos en oscuridad total. En cada pocillo de gel se adiciona 1 µL de DNA Gel Loading Dye (6X) y 5 µL de la muestra de ADN, finalmente se adiciona 3 µL de escalera de 100pb (Thermo Scientific). Finalmente, la condición de corrida de la cámara de electroforesis fue de 15 minutos a 100 voltios.

⁵² RESTREPO CARDONA, Leda Carolina. *Estandarización y optimización de los protocolos para la extracción de ADN y amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, a partir de heces de ocelote (Leopardus pardalis)*. 2010. Tesis de Licenciatura.

⁵³ RESTREPO CARDONA, Leda Carolina. Op. cit., p. 45.

4.7.3. Purificación de ADN. La purificación del ADN se realizó por el método de purificación con etanol, se tomó 25 μ L del producto amplificado por PCR, se llevó a un tubo eppendorf 1,5 ml donde se adicionó 2,5 volúmenes de acetato de amonio 5M y 50 μ L etanol frio al 100%. Se mezcló por inmersión y se centrifugó los tubos a 15.000 rpm durante 20 minutos, posterior a este procedimiento se descartó el sobrenadante, luego se agregó 150 μ L de etanol al 70% se mezcló por inmersión y se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 minutos, este proceso se repitió dos veces. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se centrifugó por un minuto para descartar el etanol y se procedió a secar los tubos para eliminar en la centrifuga de vacío o estufa; una vez seco se re suspendió el pellet en 15-20 μ L de agua mili-Q y se llevó a refrigeración -20 °C.

4.7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando las condiciones que se muestran en la tabla 2, para la amplificación de los fragmentos de interés:

Tabla 2. Condiciones para PCR y stock para amplificación.

Stock		Reacción	Unidad de medida
H ₂ O		-	
Buffer		1x	
MgCl ₂		2,5	μ M
dNTP		0,2	μ M
Cebador 1		0,3	μ M
Cebador 2		0,3	μ M
Taq		0,08	Unidades
ADN		10	μ l
Programa de amplificación			
Desnaturalización	94°C	5 min	
Alineamiento	94°C	40 seg	40 Ciclos
Elongación	72°C	40 seg	
Elongación final	72°C	10 min	30 Ciclos
Conservación	20°C	∞	
Agarosa 1.5%			

4.7.5. Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST). Para realizar análisis por MLST método para caracterizar aislamientos bacterianos utilizando secuencias de fragmentos de genes para cuatro genes house-keeping (recA, gyrB, rpoB, 16S) se amplificaron 4 genes house-keeping de longitud variable entre 500-800 pb. Cada gen es considerado como un alelo distinto, para cada aislado. La mayoría de las especies bacterianas tienen suficiente variación dentro de estos genes para proporcionar perfiles alélicos distintos entre las cepas estudiadas⁵⁴.

Se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de fragmentos internos de los siguientes genes house-keeping (los productos proteicos que se muestran entre paréntesis): recA (proteína bacteriana de recombinación de ADN), gyrB (ADN girasa, subunidad β), 16S (ARN ribosomal 16S) y rpoB (subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana) como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores usados para secuenciación y amplificación por MLST.

Cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')	Amplicon pb
recA R	CAGGAAACAGCTATGACCCCATTGTAGCTGTACCAAGCACCC	773
recA F	TGTA AACGACGGCCAGTGA AACCATTTCAACGGGTTCT	
gyrB R	CAGGAAACAGCTATGACCGAGTCACCCTCCACWATGTA	629
gyrB F	TGTA AACGACGGCCAGTGA AAGGBGGTATTCAAGC	
rpoB R	TCRTCRTAIGGCATRRCYTC	485
rpoB F	GCITTYATGCCITGGAAYGG	
16S R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	500
16S F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	

4.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación de los genes house-keeping, se realizó un BLAST de nucleótidos (Basic Local Alignment Search Tool) a las secuencias de las cepas en estudio.

Se realizaron la concatenación de los 4 genes y la limpieza de secuencias de los fragmentos amplificados en Bioedit⁵⁵, para los dos aislados bacterianos en estudio. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos de fragmentos internos de los genes house-keeping, incluyendo 642 secuencias de 14 especies de vibrios reportadas en GenBank (Tabla 4). Las

⁵⁴ JOLLEY, Keith A.; CHAN, Man-Suen; MAIDEN, Martin CJ. mlstdbNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC bioinformatics*, 2004, vol. 5, no 1, p. 86.

⁵⁵ HALL, Tom A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. En *Nucleic acids symposium series*. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

reconstrucciones filogenéticas fueron realizadas con MEGA⁵⁶ y MrBayes⁵⁷. Existen dos tipos principales de métodos de reconstrucción filogenética: los que utilizan distancias genéticas, siendo los más conocidos el método de vecino más cercano o neighbor-joining (NJ) y el de mínima evolución (ME); y los basados en caracteres, como los métodos de máxima parsimonia (MP), de máxima verosimilitud (MV) y de inferencia Bayesiana (IB). Dentro de los métodos basados en caracteres, MV e IB (a diferencia de MP) son métodos probabilísticos que tratan la inferencia filogenética como un problema estadístico, y utilizan modelos explícitos de evolución molecular para el cálculo de probabilidades⁵⁸; para este estudio se seleccionaron los modelos evolutivos de Parsimonia, Vecino más cercano y Bayesiano para la reconstrucción.

Tabla 4. Número de secuencias para cada género y especie empleados en el análisis filogenético (se incluye outgroup).

Numero	Genero	Especie	N. secuencias
1	<i>Vibrio</i>	<i>Estuarinus</i>	34
2	<i>Vibrio</i>	<i>alginolitycus</i>	4
3	<i>Vibrio</i>	<i>Anguillarum</i>	78
4	<i>Vibrio</i>	<i>Bivalvicida</i>	4
5	<i>Vibrio</i>	<i>Campbelli</i>	81
6	<i>Vibrio</i>	<i>crassostreae</i>	53
7	<i>Vibrio</i>	<i>Europaeus</i>	2
8	<i>Vibrio</i>	<i>Harveyi</i>	71
9	<i>Vibrio</i>	<i>Neptunius</i>	37
10	<i>Vibrio</i>	<i>Ostreicida</i>	4
11	<i>Vibrio</i>	<i>Splendidus</i>	99
12	<i>Vibrio</i>	<i>tasmaniensis</i>	51
13	<i>Vibrio</i>	<i>Tubiashii</i>	78
14	<i>Vibrio</i>	<i>corallinyticus</i>	46
	<i>Photobacterium</i>	<i>damselae</i>	1
	Total		643

⁵⁶ KUMAR, Sudhir; TAMURA, Koichiro; NEI, Masatoshi. *Mega*. *Bioinformatics*, 1994, vol. 10, no 2, p. 189-191.

⁵⁷ RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, vol. 19, no 12, p. 1572-1574.

⁵⁸ ABASCAL, Federico; IRISARRI, Iker; ZARDOY, Rafael. Capítulo 3 Filogenia y evolución molecular.

4.9. MÉTODO DE DIAGNÓSTICO VTB417 Y VCPA

Los métodos de diagnóstico molecular fueron probados, para la detección temprana de enfermedades causadas por agentes infecciosos tipo *Vibrio*. La detección rápida del patógeno que permita tomar medidas correctivas aun cuando el patógeno se encuentra a bajas concentraciones, con el fin de aplicar un control preventivo que evite la propagación del agente bacteriano.

Para ello se tomaron muestras correspondientes a los desafíos con la cepa Bspr 16001 y la cepa Bspr 17002 para el laboratorio de biología molecular a las cuales se les realizó extracción y purificación de ADN con los métodos descritos en los ítems 4.9.1 y 4.9.3 y se utilizó como método de diagnóstico la reacción en cadena de la polimerasa para la cual se empleó dos cebadores VTB417y VCPA diseñados por Restrepo Cardona (Tabla 5), se preparó una concentración de reactivos, la cual permitió amplificar los fragmentos de interés para la detección de genes de toxina (Tabla 6). Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%, para la detección de los productos de PCR amplificados con un estándar de peso molecular de 1000pb.

Tabla 5. Secuencias de cebadores VTB417 y VCPA para método de diagnóstico.

Cebador	Secuencia del cebador (5' - 3')	Amplicon pb
VTB417 R	GAACGGAGCATCAGAAGCCCCAAGAGA	350
VTB417 F	ATGAAACAACGTCAAATGCTTTG	280
VCPA R	CCCTTTCACTTACGATGTTGTG	270
VCPA F	ATGAAACAACGTCAAATGCTTTG	250

Tabla 6. Condiciones de PCR para método de diagnóstico.

Stock		Reacción	Unidad de medida
H₂O		4.8	μl
Buffer		1x	
MgCl₂		0,6	μl
dNTP		0,5	μl
VTB417 R – VTB417 F		0,5	μl
VCPA R – VCPA F		0,5	μl
Taq		0,1	Unidades
ADN		10	μl
Condiciones del ciclado			
Inicio	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg	30 Ciclos
Alineamiento	58°C	30 seg	30 Ciclos
Elongación	72°C	60 seg	30 Ciclos
Elongación final	72°C	5 min	
Conservación	4°C	∞	
Gel de Agarosa 1,5 %			

5. RESULTADOS.

5.1. SUPERVIVENCIA EN LARVAS.

Se encontró un efecto significativo por la interacción entre cepas Bspr 16001 y Bspr 17002 y concentraciones 1.5×10^2 , 1.5×10^4 y 1.5×10^6 UFC/ml ($p < 0.001$) para *C. gigas*, *N. subnodosus* y *S. crassisquama*. Para *C. gigas* la supervivencia obtenida a partir de la infección con la cepa Bspr 16001 fue significativamente distinta entre las 3 concentraciones ($p < 0.003$). Mientras que para *N. subnodosus* con la misma cepa bacteriana, las larvas infectadas a la concentración de 1.5×10^2 UFC/ml fue significativamente mayor comparada con la reportada a 1.5×10^4 y 1.5×10^6 UFC/ml ($p < 0.001$). Sin embargo, la supervivencia registrada a la concentración de 1.5×10^4 y 1.5×10^6 UFC/ml no tuvo diferencias significativas ($p=0.662$). Al contrario *S. crassisquama* en la cual la supervivencia obtenida para la cepa Bspr 16001 fue significativamente igual entre las 3 concentraciones ($p < 0.192$) (Tabla 7).

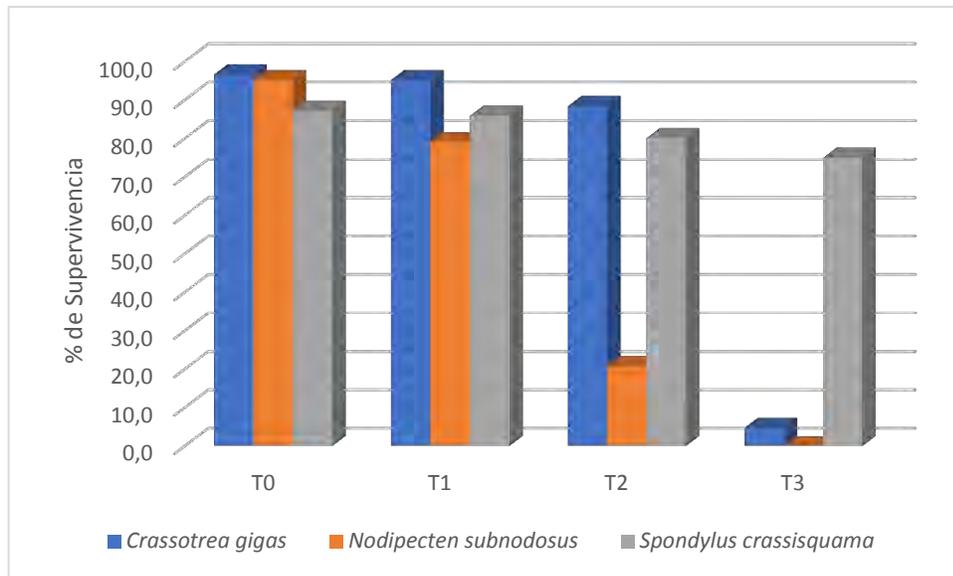
Tabla 7. Supervivencia (promedio \pm desviación estándar) de larvas de *C. gigas*, *N. subnodosus* y *S. crassisquama* a las 48 horas post infección en función de los factores cepas de *Vibrios* y concentraciones bacterianas. En cada factor, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes a $p < 0.05$, basado en análisis de ANOVA de dos vías.

		Supervivencia (%)		
Cepa	Concentración UFC/ml	<i>C. gigas</i>	<i>N. subnodosus</i>	<i>S. crassisquama</i>
Bspr16001	1.5×10^2	93.2 \pm 2.1 a	80.4 \pm 6.0 a, b	84.1 \pm 3.5 a
	1.5×10^4	83.1 \pm 0.8 b	4.1 \pm 5.8 d	78.7 \pm 3.5 a, b
	1.5×10^6	2.5 \pm 1.9 e	0 \pm 0.0 d	75.3 \pm 0.4 b
Bspr17002	1.5×10^2	81.8 \pm 2.9 b, c	86.4 \pm 1.2 a	76.0 \pm 1.5 b
	1.5×10^4	75.7 \pm 3.7 c, d	75.0 \pm 2.3 b	35.3 \pm 2.3 c
	1.5×10^6	69.0 \pm 4.0 d	62.8 \pm 1.0 c	7.5 \pm 3.8 d

La supervivencia de las tres especies de moluscos *N. subnodosus*, *S. crassisquama* y *C. gigas* infectadas a diferentes concentraciones con la cepa Bspr 16001 se pueden observar en la Figura 8; donde el tratamiento uno (T1) corresponde a la infección con una concentración de 1.5×10^2 UFC/ml en la que se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre las 3 especies en cuanto a porcentajes de supervivencia, mientras que en el tratamiento dos (T2) infectado a una concentración de 1.5×10^4 UFC/ml se observa que la cepa Bspr

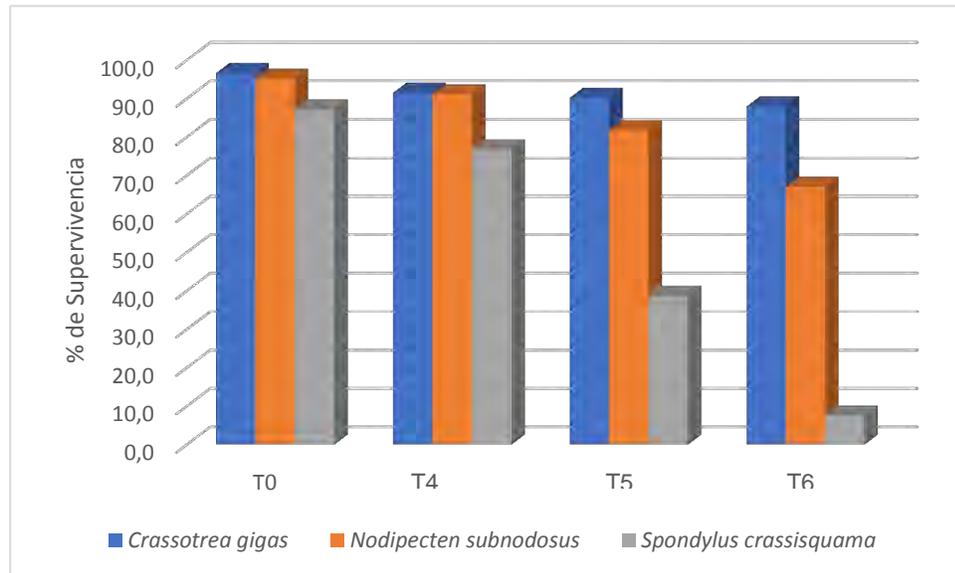
16001 causo mayor afección en la supervivencia de las larvas de *N.subnodosus*, por otra parte el tratamiento tres (T3) infectado con la mayor concentración 1.5×10^6 UFC/ml se registró la letalidad del patógeno para las especies *C.gigas* y *N.subnodosus* generando supervivencias del 0% a las 48 horas post infección; en cuanto a la especie *S.crassisquama* infectada a la misma letalidad, la supervivencia se mantuvo en un rango aceptable por lo cual se puede deducir que esta especie no es tan susceptible ante esta cepa patogénica.

Figura 8. Supervivencia a las 48 horas de larvas en etapa umbonada temprana *C. gigas*, *N. subnodosus*, *S. crassisquama* infectados con cepa Bspr 16001, los tratamientos corresponden a las concentraciones bacterianas utilizadas para las pruebas desafío T0: control negativo, T1: 1.5×10^2 UFC/ml, T2: 1.5×10^4 UFC/ml y T3: 1.5×10^6 UFC/ml.



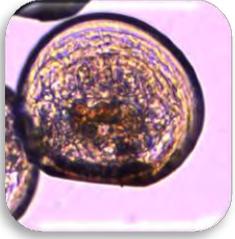
Las larvas fueron infectadas con las mismas concentraciones bacterianas para la cepa Bspr 16001 como para la cepa Bspr 17002. En la figura 9 se observa resultados inversos a partir de la infección realizada con la cepa Bspr 17002, puesto que en el tratamiento cuatro (T4) no se aprecian diferencias significativas en porcentajes de supervivencias entre *N. subnodosus*, *S. crassisquama* y *C. gigas* para el tratamiento cinco (T5) *S. crassisquama* presentó una supervivencia menor del 38.7% en comparación con *C. gigas* y *N. subnodosus*; finalmente en el tratamiento seis (T6) se pudo apreciar la letalidad de este patógeno sobre *S. crassisquama* mientras que para *C. gigas* y *N. subnodosus* no generó mortalidades significativas por lo cual se deduce que estas dos especies no presentan alta susceptibilidad a la cepa Bspr 17002.

Figura 9. Supervivencia a las 48 horas de larvas en etapa umbonada temprana *C. gigas*, *N. subnodosus*, *S. crassisquama* infectados con cepa Bspr 17002, los tratamientos corresponden a las concentraciones bacterianas utilizadas para las pruebas desafío T0: control negativo, T4: 1.5×10^2 UFC/ml, T5: 1.5×10^4 UFC/ml y T6: 1.5×10^6 UFC/ml.



5.1.1. Síntomas de la infección. La patogénesis de las cepas Bspr 16001 y Bspr 17002 demostraron síntomas relacionados con vibriosis o necrosis bacilar. En este estudio se observaron diferentes niveles de afecciones y se evaluaron en una escala de 0 a 5, siendo 5 el más severo (Anexo D). Los síntomas causados por las dos cepas en estudio iniciaron a las 8 horas post-infección en *C. gigas*, *N. subnodosus* y *S. crassisquama* cuando se vio una disminución en la actividad de las larvas en un leve grado (movimiento intervalvar), la extensión y alteraciones en el velum mostraron un nivel progresivo de la infección causando parálisis ciliar hasta llegar al desprendimiento del mismo. Al igual que nado errático característico por el movimiento en círculos de las larvas, con una disminución en la tasa de ingestión observando los tractos digestivos vacíos, descrito en el nivel severo de la infección principalmente por parte de Bspr 16001 en las larvas de *C. gigas* y *N. subnodosus* y la cepa Bspr 17002 en larvas de *S. crassisquama*. También encontramos que una de las características finales de letalidad en las larvas fue cuando se produjo una alta colonización bacteriana e invasión de los tejidos (Figura 10) que conllevó a la mortalidad masiva de las unidades de experimentación entre las 24 y 48 horas post-infección de las tres especies con su respectiva susceptibilidad a las cepas en estudio.

Figura 10. Síntomas de infección en larvas de *C. gigas*, *N. subnodosus* y *S. crassisquama*.

	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Nodipecten subnodosus</i>	<i>Spondylus crassisquama</i>
Larva sana			
Desprendimiento del velo			
Tracto digestivo vacío			
Colonización bacteriana			

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS.

Las dos cepas patogénicas usadas en el presente estudio, denominadas Bspr 16001 y Bspr 17002, fueron aisladas del cultivo de larvas con problemas de mortalidades de *Striostrea prismática* en el CENAIM. La caracterización fenotípica por medio de pruebas bioquímicas demostraron de acuerdo con el manual propuesto por Bergey⁵⁹ que: la cepa Bspr 16001 tiene una colonia con talla de 0.85 milímetros lo cual corresponde al grupo de bacterias pequeñas, posee margen filamentososa, forma de filamento con elevación plana, textura mucosa con un color crema que se visualiza opaco. Mientras que la cepa Bspr 17002 tiene una colonia con talla de 9 milímetros conformando al grupo de bacterias grandes, posee forma circular con márgenes enteras y elevación convexa, su textura es mucosa y se observa traslucida sin pigmento. Con la tinción de Gram las dos cepas bacterianas se tornaron violeta. Al igual que por la prueba de KOH que mostró consistencia elástica para ambas, evidenciando ser bacterias Gram negativas. Los aislados fueron positivos para catalasa comprobando que son bacterias aerobias y positivas para oxidasa, lo cual indica que las bacterias poseen citocromo C oxidasa, por lo que puede usar oxígeno en la producción de energía con una cadena de transporte de electrones. Para Bspr 16001 y Bspr 17002 las pruebas de fermentación de carbohidratos sucrosa, manitol, glucoronato y manosa fueron positivas menos para galactosa que fue negativa para Bspr 16001 y positiva para Bspr 17002; los dos aislados fueron negativos para citrato, arabinosa y NB; VP resulto positivo para ambas y OF determinó que las dos cepas bacterianas tienen metabolismo fermentativo y en cuanto a gluconato, argenina, celobiosa y ornitina fueron positivas para 16001 mientras que para 17002 negativas (Tabla 9).

En los resultados del antibiograma se puede observar que la cepa Bspr 16001 fue sensible para los discos de antibióticos comerciales de furazolidona, ciprofloxacina, ácido nalidixico, norfloxacina, cloranfenico, florfenicol, oxitetraciclina, enrofloxacina y resistente para penicilina y fosfomicin (Tabla 10). Por otra parte, la cepa Bspr 17002 mostró sensibilidad ante ciprofloxacina, ácido nalidixico, norfloxacina, cloranfenico, florfenicol y fosfomicin y resulto ser levemente sensible en presencia de oxitetraciclina y enrofloxacina, a diferencia de los discos de furazolidona y penicilina donde la cepa fue resistente a estos antibióticos.

⁵⁹ HOLT, John G., et al. Op. cit., p. 44.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas para las cepas bacterianas Bspr 16001 y Bspr 17002. +: positivo, -: negativo.

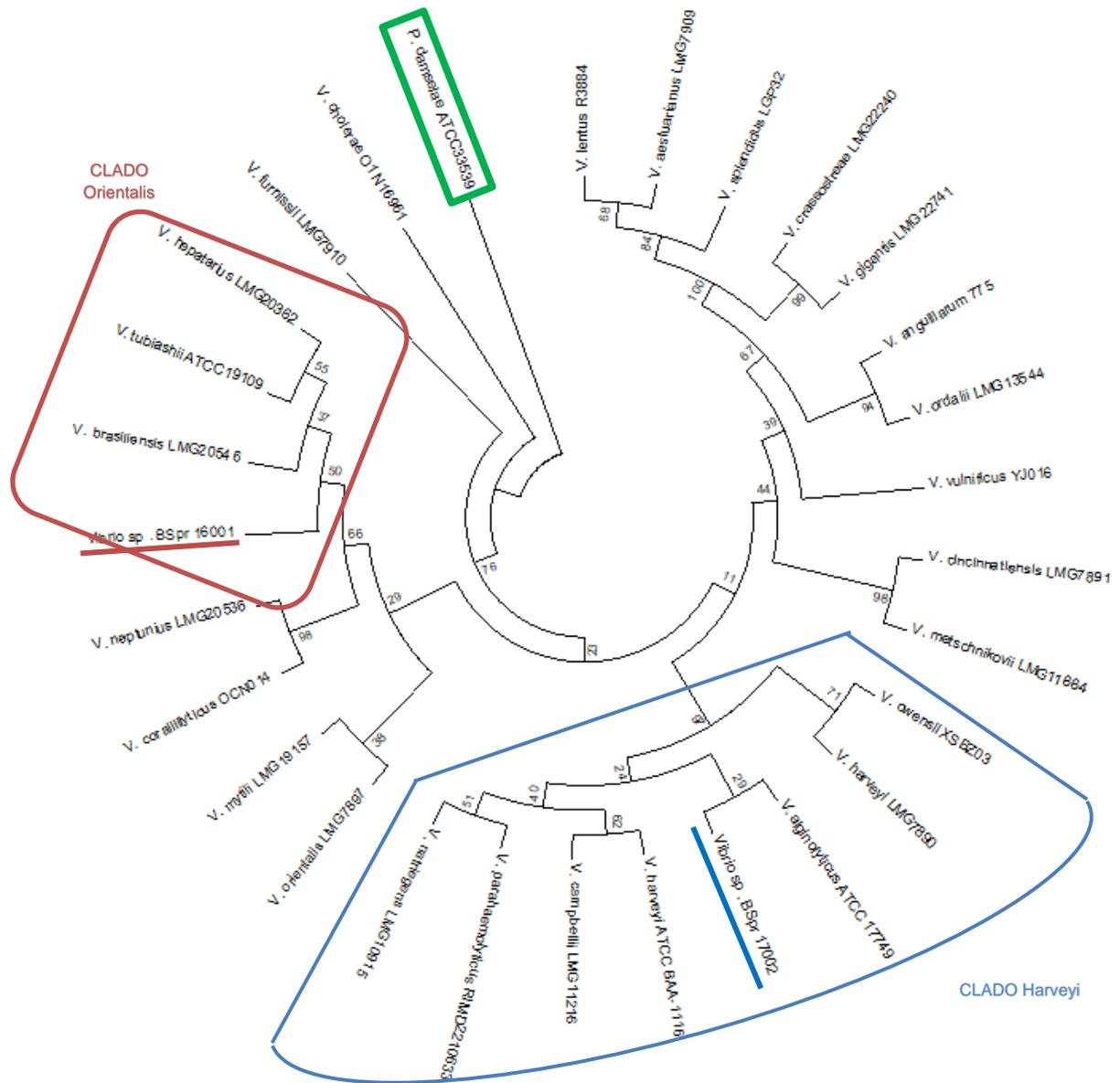
Características	BSPR 16001	BSPR 17002
Tamaño	Grande	Pequeño
Talla	9 milímetros	0,85 milímetros
Márgenes	Filamentosa	Entera
Forma	Filamento	Circular
Elevación	Plano	Convexa
P. visuales	Opaca	Translúcida
Color	Crema	Transparente
Textura	Mucosa	Mucosa
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Gram (KOH)	-	-
Gram	-	-
Citrato	-	-
Gluconato	+	-
Arasinoso	-	-
Sucrosa	+	+
Galactosa	-	+
Manitol	+	+
OF	+	+
Argenina	+	-
NB	-	-
Glucoronato	+	+
Celobiosa	+	-
Ornitina	+	-
Indol	+	+
Lisina	+	+
VP	+	+
Manosa	+	+
OF (Aceite Mineral)	+	+

Tabla 10. Antibiograma a antibióticos comerciales (discos).

Antibiótico		Bspr 16001	Bspr17002
FURAZOLIDONA (FX) 100 mg	R (17) S (18)	S	R
CIPROFLOXACINA 5 mg	R (15) I (16-20) S (21)	S	S
ACIDO NALIDIXICO (NA) 30mg	R (13) I (14-18) S (19)	S	S
NORLFLOXACINA 10mg	R (12) I (13-16) S (17)	S	S
PENICILLINA 10 mg	R (11) I (12-21) S (22)	R	R
CLORANFENICOL (C)30mg	R (12) I (13-17) S (18)	S	S
FOSFOMICIN / (FF) 50 mg	R (14) I (15-16) S (17)	R	S
FLORFENICOL 30 ug	R (16) I (17-20) S (21)	S	S
OXITETRACICLINA (T) 30 ug	R (17) I (18-21) S (22)	S	I
ENROFLOXACINA 5 ug	R (16) I (17-20) S (21)	S	I

Dónde: S sensible al antibiótico, R resistente al antibiótico, I levemente sensible al antibiótico.

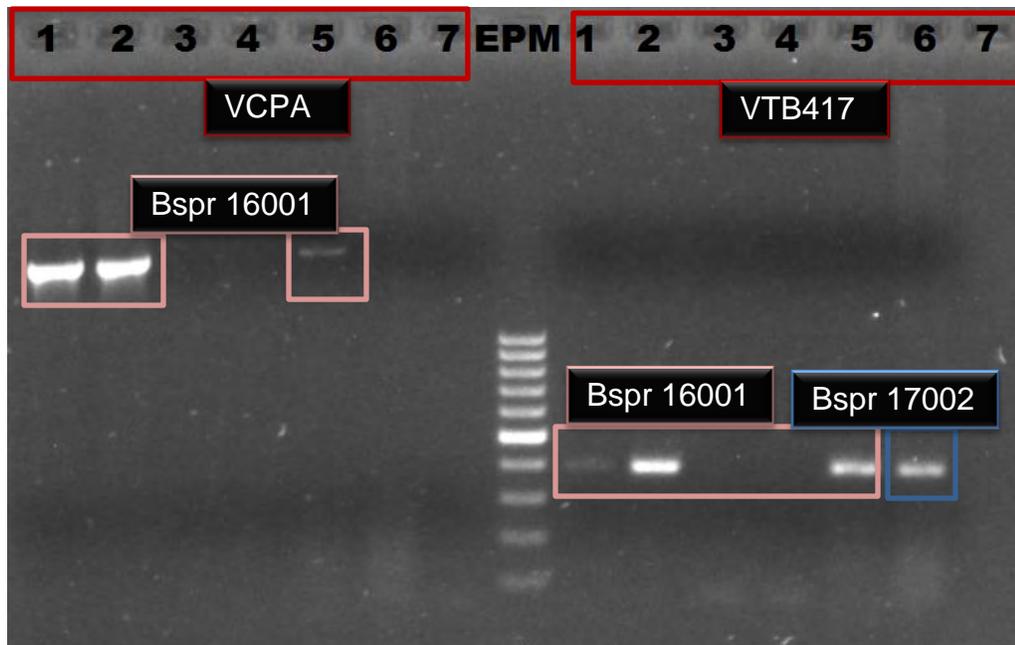
Figura 12. Árbol filogenético basado en el Análisis de Secuencias Multilocus (MLST) obtenido por los modelos evolutivos de Máxima Parsimonia, Inferencia Bayesiana y Neighbor-Joining que incluye las especies de *Vibrios* asociadas a moluscos bivalvos y el género *Photobacterium* como outgroup.



5.4. IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECCIÓN DE AISLADOS BACTERIANO.

La implementación de PCR como técnica molecular para la detección rápida de agentes patógenos de origen bacteriano, se realizó usando cebadores específicos desarrollados por Restrepo (material en preparación), para determinar la presencia de genes de toxina presentes en las bacterias Bspr 16001 y Bspr 17002. Las lecturas en gel de electroforesis nos permitieron realizar un diagnóstico cualitativo con la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores VTB417 y VCPA. En la figura 13, se observa al lado izquierdo con el cebador VCPA y al lado derecho con VTB417. Los pozos del 1, 2 y 5 corresponden a muestras de la cepa Bspr16001. Lo que nos muestra que los primers VCPA amplifican únicamente para la cepa Bspr 16001, con un tamaño de amplicon mayor a 1300 pb. En los pozos 3, 4 y 6 no se encuentra producto amplificado, ya que son muestras de la cepa BSpr 17001. Sin embargo, no se tuvieron resultados discriminatorios para el cebador VTB, ya que se obtuvo producto amplificado para la cepa Bspr 16001 (pozos 1, 2 y 5), así como también para la cepa Bspr 17001 en el pozo 6. En los dos casos el tamaño del amplicon fue de aproximadamente 400 pb. Los pozos 7 para los dos cebadores corresponden al control negativo en los cuales no se obtuvo amplificación.

Figura 13. Prueba de amplificación utilizando los cebadores VcpaF-VcpaR del lado izquierdo y Vtb417F-Vtb417R del lado derecho, las muestras pertenecen a genes de toxina presentes en las cepas bacterianas de estudio. En el gel se observa: 1 Bspr16001, 2 Bspr16001replica, 3 Bspr17002, 4 Bspr17002replica 5 Bspr16001original, 6 Bspr17002original, 7 Control negativo. EPM estándar de peso molecular.



6. DISCUSIÓN.

El enfoque de este trabajo de tesis permitió establecer cuál de las dos cepas evaluadas genera menores supervivencias en la etapa larvaria umbonada temprana de las especies de *N. subnodosus*, *S. crassiquama* y *C. gigas*. El parámetro empleado para definir la susceptibilidad fue la supervivencia, expresada en porcentaje tras 48 horas de realizado el desafío in vitro. La cepa Bspr 16001 relacionada con *V. brasiliensis* y la cepa Bspr 17002 asociada a *V. alginolyticus*; la supervivencia a las 48 horas post-infección fue el 75% para *S. crassiquama*, mientras que para *C. gigas* y *N. subnodosus* disminuyó drásticamente con valores menores al 5% al ataque de la cepa Bspr 16001. Resultados inversos se obtuvieron en las pruebas desafío con la cepa de Bspr 17002 en la cual se observó que *S. crassiquama* obtuvo una supervivencia del 7.5%, lo cual indica que la patogenicidad de este *Vibrio* es mayor para esta especie, contrario a esto los valores de supervivencia fueron mayores al 67% para *N. subnodosus* y *C. gigas*, siendo estas especies menos susceptibles. Resultados similares reporta Luna⁶¹ donde las larvas de 4 especies de moluscos son susceptibles al ataque de *V. alginolyticus* cepa APSA2. Sin embargo, las larvas de las dos especies de pectínidos y *A. maura* fueron más susceptibles a *V. alginolyticus* que las larvas de la ostra japonesa. Por lo cual se puede sugerir que hay cepas bacterianas que pueden ser más patógenas para una especie que para otras, lo cual podría ser ocasionado por la preferencia que tiene un patógeno por un hospedero en específico más que por otro o por la ocurrencia de un primer contacto del hospedero con el patógeno causando un mayor impacto en la especie en sí que las que han sido afectadas en ocasiones anteriores. Estas diferencias en la susceptibilidad se han reportado en el estudio de Burreson y Ragone⁶² en moluscos adultos, donde se observó que *C. virginica* es susceptible a *Perkinsus marinus*, mientras que *C. gigas* no lo es. Por otro lado, *O. edulis* es susceptible a *Bonamia ostreae*, mientras que *C. gigas* es más resistente; estas investigaciones han llevado a indagar sobre el sistema inmune de diferentes especies de bivalvos en distintas etapas del ciclo vital que permitan determinar los mecanismos de defensa que evidencien la susceptibilidad de las especies y a diferentes fases de cultivo.

La supervivencia reportada en este bioensayo para determinar la patogenicidad de los microorganismos se evidenció en los síntomas relacionados a necrosis bacilar también conocido como vibriosis, donde se apreciaron síntomas como disminución en la tasa de ingestión, desprendimiento del velo, disminución en la motilidad, parálisis ciliar, etc. Síntomas similares fueron reportados en el estudio de Beaz-

⁶¹ LUNA GONZÁLEZ, Antonio. Op. cit., p. 61

⁶² BURRESON, Eugene M., et al. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research*, 1996, vol. 15, no 1, p. 17-34.

Hidalgo *et al*⁶³ donde los signos encontrados fueron típicos de "necrosis bacilar" que incluyeron la extensión del velo, la reducción de la motilidad o movimientos erráticos en círculo que aparecieron después de 4 a 5 horas de exposición a *Vibrio spp.* En el presente estudio los signos de la patología fueron similares en las larvas de las tres especies, se evidencio que a las primeras 8 horas post-infección en las dos especies de *Vibrio*, con la concentración más alta de infección (1.5×10^6 UFC/ml) inicio una disminución en la tasa de ingestión, movimientos erráticos y letargia, hasta el final de la observación a las 48 horas, donde se observó la letalidad del patógeno con la colonización de los individuos. Nicolas *et al*⁶⁴ mencionan que los mecanismos de infección de los *vibrios* pueden ser una combinación de invasión y toxicidad. Por arriba de cierta concentración en el tracto digestivo de las larvas, los *vibrios* lisados por enzimas digestivas podrían liberar grandes cantidades de toxinas (endotoxinas ciliostáticas, proteasas, exotoxinas), las cuales podrían parar el tránsito digestivo e iniciar la degradación de tejidos.

Es muy relevante resaltar la importancia de la identificación bacteriana, para establecer y crear métodos de diagnóstico específicos para los patógenos circundantes, de tal manera que se pueda contrarrestar los efectos de patogenicidad asociados a mortalidades en moluscos bivalvos. Por lo cual se implementó en esta investigación un estudio de análisis de secuencias multilocus MLST, con cuatro genes housekeeping (recA, gyr B, Rpo, 16S ARN) para determinar la taxonomía de las bacterias en estudio. El análisis MLST permite la identificación de cepas que no han sido caracterizadas previamente a nivel de género y especie, dentro de este grupo los resultados a menudo dependen de la metodología utilizada, por lo tanto este representa un marco excelente para probar la solidez de MLST para inferir la filogenia⁶⁵; mediante esta técnica se obtuvo un análisis filogenético de las cepas, indicando que la cepa Bspr 16001 está más relacionada con *V. brasiliensis* el cual se encuentra dentro del clado Orientalis y ha sido reportado como patógeno en moluscos bivalvos demostrado por Romalde *et al*⁶⁶ en su estudio describe que a partir de la caracterización de aislados sobre la base de características fenotípicas, secuenciación del gen 16S rRNA, contenido de G + C y DDH, permitió la descripción de este *Vibrio* como una nueva especie dentro del clado Orientalis demostrando su potencial patogénico en desafíos

⁶³ BEAZ-HIDALGO, Roxana, et al. Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental microbiology reports*, 2010, vol. 2, no 1, p. 34-43.

⁶⁴ NICOLAS, J. L.; ROBIC, E.; ANSQUER, D. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 1989, vol. 83, no 3-4, p. 237-248.

⁶⁵ PASCUAL, Javier, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, vol. 60, no 1, p. 154-165.

⁶⁶ ROMALDE, Jesús L., et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in microbiology*, 2014, vol. 4, p. 413.

experimentales utilizando trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y nauplios de Artemia como modelos animales. Uno de los patógenos con mayor importancias en la en la acuicultura de moluscos bivalvos dentro del clado orientalis tenemos al *V.tubiashii* como lo reporta Gibson, Woodworth y George⁶⁷ que afirman que las larvas de ostra del Pacífico son altamente susceptibles al ataque de *V. tubiashii*. En el cual observaron las etapas previas a la muerte cuando las larvas dejaron de nadar y solo se observó una acción de bombeo débil dentro de la concha y el primer signo de muerte fue la aparición de un espacio entre el borde interior del caparazón y el tejido de la ostra. En la etapa final, el tejido fue completamente digerido dejando un caparazón vacío. De la misma forma en el estudio de Thompson *et al*⁶⁸ denominado *Vibrio neptunius sp. nov.*, *Vibrio brasiliensis sp. nov.* y *Vibrio xuii sp. nov.*, aislados de ambientes acuáticos marinos (bivalvos, peces, rotíferos y camarones) afirma que estas cepas de Vibrio constituyen patógenos graves para los mismos organismos.

La cepa Bspr 17002 tiene estrecha relación con *V. algynolyticus* que pertenece al clado Harveyi, el cual ha sido reportado como unos de los patógenos con mayor prevalencia en cultivos de moluscos bivalvos, Montilla *et al*; Arias *et al*; Pujalte *et al* citado por Baez⁶⁹ señalan que la mayoría de los estudios, las especies predominantes asociadas con mortalidades en bivalvos de diferentes lugares geográficos (España, Canadá, Italia o Brasil), todos de climas templados, fueron *V. splendidus* (clado Splendidus), *V. alginolyticus* y *V. harveyi* (clado harveyi), o cualquier combinación de estas especies, esto también lo demuestra el estudio realizado por Graü *et al*⁷⁰ denominado aislamiento de *Vibrio spp.* y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna* procedentes de la costa nororiental del estado Sucre, Venezuela; donde obtuvieron 192 muestras de moluscos bivalvos y se estudiaron para determinar la presencia de especies del género *Vibrio* asociadas a zonas de producción de bivalvos, en las muestras se identificaron siete especies pertenecientes al género *Vibrio*: *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii* y *V. hollisae*, observándose que la mayoría de las cepas correspondieron a *V. alginolyticus* representando el 57,4%, la presencia de *V. alginolyticus* como patógeno para bivalvos fue también demostrada por Luna-Gonzales⁷¹ que realizó

⁶⁷ GIBSON, L. F.; WOODWORTH, J.; GEORGE, A. M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, 1998, vol. 169, no 1-2, p. 111-120.

aquellas larvas a

⁶⁸ ⁶⁸ RIQUELME, rCarlos E., et al. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 2001, vol. 192, no 2-4, p. 111-119.

⁶⁹ BEAZ-HIDALGO, Roxana, et al. Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental microbiology reports*, 2010, vol. 2, no 1, p. 34-43.

⁷⁰ GRAÜ, Crucita, et al. Aislamiento de vibrio spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *arca zebra* y *perna* procedentes de la costa nororiental del Estado Sucre. Venezuela. *Revista Científica*, 2004, vol. 14, no 6.

⁷¹ LUNA GONZÁLEZ, Antonio. Op. cit., p. 61.

un estudio donde desafiaron larvas de moluscos bivalvos a diferentes concentraciones de *V. alginolitycus* cepa APSA2, reportando altos porcentajes de CL50 en todas las especies de estudio evidenciando que la cepa bacteriana es patógena.

La identificación de las cepas bacterianas Bspr 16001 y cepa 17002, demostradas anteriormente como altamente patógenas para especies de alto valor en acuicultura marina y de repoblamiento como *N. subnodosus*, *S. crassisquama* y *C. gigas* principalmente las especies de pectinidos donde los estudios se encuentran aún en pleno desarrollo de paquetes tecnológicos para el óptimo cultivo, requieren de métodos de diagnóstico sensibles que permitan la identificación temprana de los patógenos causantes de mortalidades masivas especialmente en etapas de cultivo críticas donde aumenta el riesgo de la población; sin embargo los métodos tradicionales tales como la microbiología clásica en este punto se convierte en un respaldo para técnicas moleculares, debido a que los largos periodos de crecimiento. Uno de los factores más relevantes que afectan los diagnósticos microbiológicos es el no poder tomar medidas preventivas o correctivas inmediatas ante una infección; por ello dada la gran especificidad y sensibilidad de la PCR, se utilizó esta técnica en esta investigación para evidenciar su utilidad como método de diagnóstico molecular en *vibrios*. Este estudio mostro resultados positivos para el uso de esta técnica ya que permitió detectar genes presentes en las cepas Bspr 16001 y Bspr 17002 anteriormente descritas con alto grado de parentesco con *V. brasiliensis* y *V. alginolitycus* señaladas como patogénicas para larvas de moluscos bivalvos, empleando cebadores VTB417 y VCPA diseñados por Restrepo para la región de interés en estos aislados, demostrando la presencia de toxinas o genes de virulencia que hacen que estas bacterias sean patógenos; el cebador VCPA amplificó para la cepa Bspr 16001 mientras que para la cepa Bspr 17002 fue negativa; caso contrario ocurrió con el cebador VTB417 que evidencio mayor sensibilidad ante la presencia de genes de toxina puesto que amplificó para las dos cepas en estudio, por lo cual se puede deducir que hay cebadores más sensibles para unos genes que para otros, para ello es necesario diseñar cebadores específicos para cada cepa en estudio. De acuerdo con Chuang⁷² quien afirma que la sensibilidad y especificidad de una reacción de PCR depende en buena medida de usar cebadores de calidad, que incluye que sean específicos para cada alelo del gen. Independiente de la sensibilidad de los cebadores se corroboró que el método molecular de PCR representa una herramienta de gran utilidad para la detección de toxinas causantes de infecciones bacterianas como necrosis bacilar de forma rápida que conlleve a contrarrestar la propagación de la infección en una población, también Madinier⁷³ en su estudio

⁷² CHUANG, Li-Yeh; CHENG, Yu-Huei; YANG, Cheng-Hong. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology letters*, 2013, vol. 35, no 10, p. 1541-1549.

⁷³ MADINIER, Isabelle M.; FOSSE, Thierry M.; MONTEIL, Roger A. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. *Journal of periodontology*, 1997, vol. 68, no 1, p. 2-6.

diagnosticó por PCR el bacilo gramnegativo *Helicobacter pylori* y expone que esta técnica tiene una sensibilidad y especificidad de 95 % y señala que su principal ventaja infiere en la detección del microorganismo sin importar la viabilidad de la bacteria en las muestras. De la misma forma Premoli⁷⁴ evidencio la especificidad de esta técnica argumentando que este método por medio del uso de oligonucleótidos sintéticos específicos hace posible detectar un gen, facilitando la amplificación de una secuencia nucleotídica, que a su vez es específica para el patógeno causante de la enfermedad.

⁷⁴ PREMOLI, Gloria, et al. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2004, vol. 56, no 2, p. 85-90.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

7.1. CONCLUSIONES.

Las larvas de *N. subnodosus*, *S. crassisquama* y *C. gigas* fueron susceptibles al menos al ataque de una de las dos cepas patógenas. Se apreció que la cepa Bspr 16001 asociada a *V. brasiliensis* provocó alto grado de patogenicidad en las larvas del pectínido *N. subnodosus* cuando se infectó con la concentración más alta (1.5×10^6 UFC/ml). La cepa Bspr 17002 estrechamente relacionada a *V. alginolyticus* provocó máxima letalidad en las larvas umbonadas de *S. crassisquama* y *C. gigas* reportando valores de supervivencia del 10% y 35% respectivamente, lo cual indica la alta susceptibilidad de la especie específicamente por esta cepa.

La patogenicidad de las cepas de *Vibrios* estudiadas en larvas de bivalvos produjeron signos clínicos típicos de vibriosis o necrosis bacilar, medidos por la actividad invasiva (colonización), movimiento ciliar, desprendimiento del velum, ausencia de alimento en el tracto digestivo, nado errático determinados por el comportamiento de las larvas 48 post-infección; estos signos de infección fueron observados durante el evento de mortalidad masiva en el centro experimental por lo cual se sugiere que estas cepas son el agente causante de las mortalidades masivas ocurridas en los cultivos larvarios de moluscos bivalvos en CENAIM.

El análisis de secuencias multilocus (MLST) es un método sólido para identificación de cepas bacterianas, siendo esta una de las técnicas mayormente utilizadas debido a que emplea genes house-keeping que disminuyen el error en la identificación taxonómica de las especies por la baja mutación de estos genes constitutivos. Puesto que las bacterias tipo *Vibrio* se caracterizan por tener altas tasas de mutación en el genoma que pueden ser provocadas por el entorno en el que se desarrollan generando cambios en el material genético.

La reconstrucción filogenética realizada a través de los modelos evolutivos de, inferencia bayesiana, máxima parsimonia y vecino más cercano permitieron determinar la estrecha relación de la cepa Bspr 16001 con *V. brasiliensis* reportado como nuevo *Vibrio* patógeno asociado a mortalidades en larvas de moluscos bivalvos y la cepa Bspr 17002 con alto grado de parentesco a *V. alginolyticus* descrito como una de las especies con mayor prevalencia en mortalidades masivas de larvas de bivalvos en todo el mundo.

La técnica molecular de PCR se consideró en este estudio como un método de diagnóstico eficaz para la detección rápida, con el uso de cebadores VTB417 y VCPA. Sin embargo, se necesita el desarrollo de cebadores específicos para cada cepa patogénica de estudio.

La PCR se catalogó como una herramienta sensible que permitirá tomar medidas preventivas ante la presencia de bacterias tipo *Vibrio* antes de que se provoque

una propagación de la infección en los cultivos de bivalvos. Principalmente en especies que se encuentran en el auge de la investigación para acuicultura marina y de repoblamiento que representan gran importancia para el desarrollo de las costas de Ecuador.

7.2. RECOMENDACIONES.

Realizar estudios posteriores relacionados con el efecto de la patogenicidad de *Vibrio brasiliensis* sobre larvas de moluscos bivalvos como *Crassostrea Gigas* y *Nodipecten subnodosus*.

Evaluar los mecanismos de defensa de *Spondylus crassiquama* sobre el efecto de la patogenicidad del *V. alginolyticus*.

Evaluar y cuantificar síntomas de vibriosis o necrosis bacilar en larvas de moluscos al efecto significativo de la patogenicidad de nuevas especies como *V. brasiliensis*.

Cuantificar la concentración letal 50 (CL 50) de *C. gigas*, *N. subnodosus* y *S. crassiquama* al ataque de *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio brasilliensis*.

Evaluar la patogenicidad de las cepas identificadas en otras especies y a diferentes etapas de desarrollo en moluscos bivalvos de importancia acuícola y repoblamiento

Realizar estudios que permitan comparar el efecto de la actividad patogénica de las cepas identificadas en diferentes condiciones ambientales.

Analizar cepas con características probióticas que permitan contrarrestar los efectos de la patogenicidad de los *Vibrios* identificados.

Diseñar un nuevo cebador de VTB que permitan detectar genes presentes en las dos cepas patógenas de estudio.

8. BIBLIOGRAFÍA

ABASCAL, Federico; IRISARRI, Iker; ZARDOY, Rafael. Capítulo 3 Filogenia y evolución molecular.

ALLAM, Bassem; PAILLARD, Christine. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Diseases of aquatic organisms*, 1998, vol. 33, no 2, p. 123-128.

ARGÜELLO-GUEVARA, Wilfrido; LOOR, Alfredo; SONNENHOLZNER, Stanislaus. Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the Tropical rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray 1825). *Journal of Shellfish Research*, 2013, vol. 32, no 3, p. 665-670.

ARIAS, C. R., et al. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *Journal of applied microbiology*, 1999, vol. 86, no 1, p. 125-134.

AVENDAÑO, RUBÉN E., et al. Sobrevivencia y crecimiento de post-larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en Bahía Inglesa, Chile: efectos del origen, distribución en la bahía y bacterioflora larval. *Revista chilena de historia natural*, 2001, vol. 74, no 3, p. 669-679.

BAYNE, B. L., et al. Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis*: responses to variations in quantity and organic content of the seston. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1993, vol. 73, no 4, p. 813-829.

BEAZ-HIDALGO, Roxana, et al. Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental microbiology reports*, 2010, vol. 2, no 1, p. 34-43.

BOU, Germán, et al. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2011, vol. 29, no 8, p. 601-608.

CARDENAS, Erik Baqueiro. Status of molluscan aquaculture on the Pacific coast of Mexico. *Aquaculture*, 1984, vol. 39, no 1-4, p. 83-93.

CLARRIDGE, Jill E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 2004, vol. 17, no 4, p. 840-862.

COAN, Eugene V.; VALENTICH-SCOTT, Paul. Bivalve seashells of tropical west America. *Marine bivalve mollusks from Baja California to northern Peru*, 2012, vol. 2.

Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, 2007.

ESPY, M. J., et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, 2006, vol. 19, no 1, p. 165-256.

FAO, IFAD. WFP (2015), The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. Food and Agriculture Organization Publications, Rome, 2016.

FARFÁN, BQ MAURICIO J. Biología Molecular Aplicada Al Diagnóstico Clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 2015, vol. 26, no 6, p. 788-793.

FILGUEIRA, R.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; LABARTA, U. Tasa de aclaramiento del mejillón *Mytilus galloprovincialis*. II. Respuesta a variables no correlacionadas del seston (cantidad, calidad y contenido de clorofila). *Ciencias marinas*, 2010, vol. 36, no 1, p. 15-28.

FORREST, Barrie M., et al. Bivalve aquaculture in estuaries: review and synthesis of oyster cultivation effects. *Aquaculture*, 2009, vol. 298, no 1, p. 1-15.

FREITES, L., et al. Vibriosis en larvas de la vieira tropical *Euvola* (Pecten) ziczac (L). *Caribbean Journal of Science*, 1993, vol. 29, no 1-2, p. 89-98.

GÁLVEZ ESCOBAR, José Roberto, et al. Efecto antibacteriano in vitro del plasma rico en plaquetas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. 2014.

GARCÍA-CUBAS, Antonio; REGUERO, Martha. *Catálogo ilustrado de moluscos del Golfo de México y Mar Caribe*. UNAM, 2007.

GOSLING, Elizabeth. *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley & Sons, 2008.

GRAÜ, Crucita, et al. Aislamiento de vibrio spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos arca zebra y perna procedentes de la costa nororiental del Estado Sucre. Venezuela. *Revista Científica*, 2004, vol. 14, no 6.

GUILLARD, Robert RL. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *The Biological Bulletin*, 1959, vol. 117, no 2, p. 258-266.

HALL, Tom A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. En *Nucleic acids symposium series*. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

HELM, Michael M.; BOURNE, Neil. Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico. Food & Agriculture Org., 2006.

HOLT, John G., et al. The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. *The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition.*, 1977.

ISENBERG, Henry D. *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society of Microbiology, 1992.

JARA JÁCOME, Juan, et al. Proyecto de Camaronera "In land", Ecuador, 2002, Trabajo de grado (Ciencias Económicas y Humanísticas) Escuela Superior Politécnica Del Litoral.

JOHNSON, Jerald B.; OMLAND, Kristian S. Model selection in ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 2004, vol. 19, no 2, p. 101-108.

JOLLEY, Keith A.; CHAN, Man-Suen; MAIDEN, Martin CJ. mlstdbNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC bioinformatics*, 2004, vol. 5, no 1, p. 86.

KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, Stephen. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana, 2008.

Kraeuter, J.N. & Castagna, M. (eds). 2001. Biology of the Hard Clam. Elsevier. Devel. Aquaculture Fish. Sci. 51: 751 pp.

KUMAR, Sudhir; TAMURA, Koichiro; NEI, Masatoshi. *Mega*. Bioinformatics, 1994, vol. 10, no 2, p. 189-191.

LOOR, Alfredo, et al. Early life cycle and effects of microalgal diets on larval development of the spiny rock-scallop, *Spondylus limbatus* (Sowerby II, 1847). *Aquaculture*, 2016, vol. 450, p. 328-334.

LUNA GONZÁLEZ, Antonio. Susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus* y mecanismos de defensa en moluscos bivalvos. 2003.

MAC FADDIN, Jean F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins Co., 2000.

MACKENSEN, Annika K., et al. *Spondylus crassisquama* Lamarck, 1819 as a microecosystem and the effects of associated macrofauna on its shell integrity: isles of biodiversity or sleeping with the enemy? *Marine Biodiversity*, 2012, vol. 42, no 4, p. 443-451.

MADINIER, Isabelle M.; FOSSE, Thierry M.; MONTEIL, Roger A. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. *Journal of periodontology*, 1997, vol. 68, no 1, p. 2-6.

PASCUAL, Javier, et al. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, vol. 60, no 1, p. 154-165.

Pérez de León E, Arellano–Martínez M, Ceballos–Vázquez BP. 2005. Reproduction of *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835) in suspended culture in the Guerrero Negro Lagoon, Baja California Sur, Mexico. Book of Abstracts, 15th International Pectinid Workshop, Mooloolaba, Australia, 21–26 April 2005.

PÉREZ, Raquel Granados; PERIS, María del Carmen Villaverde. Microbiología. Editorial Paraninfo, 1997.

PREMOLI, Gloria, et al. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2004, vol. 56, no 2, p. 85-90.

RADIARTA, I. Nyoman; SAITOH, Sei-Ichi; MIYAZONO, Akira. GIS-based multi-criteria evaluation models for identifying suitable sites for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) aquaculture in Funka Bay, southwestern Hokkaido, Japan. *Aquaculture*, 2008, vol. 284, no 1-4, p. 127-135.

RESTREPO CARDONA, Leda Carolina Amparo. First record of the invasive tunicate *Didemnum vexillum* in tropical oyster cultures. 2014.

RESTREPO CARDONA, Leda Carolina. *Estandarización y optimización de los protocolos para la extracción de ADN y amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, a partir de heces de ocelote (Leopardus pardalis)*. 2010. Tesis de Licenciatura.

RIQUELME, Carlos E., et al. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 2001, vol. 192, no 2-4, p. 111-119.

RODRÍGUEZ-HERRERA, R., et al. Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. *Acta Química Mexicana [Internet]*, 2009, vol. 1, no 1.

ROMALDE, Jesús L., et al. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in microbiology*, 2014, vol. 4, p. 413.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, vol. 19, no 12, p. 1572-1574.

SÁNCHEZ-VILLEGAS, Almudena. *Bioestadística amigable*. Elsevier, 2014.

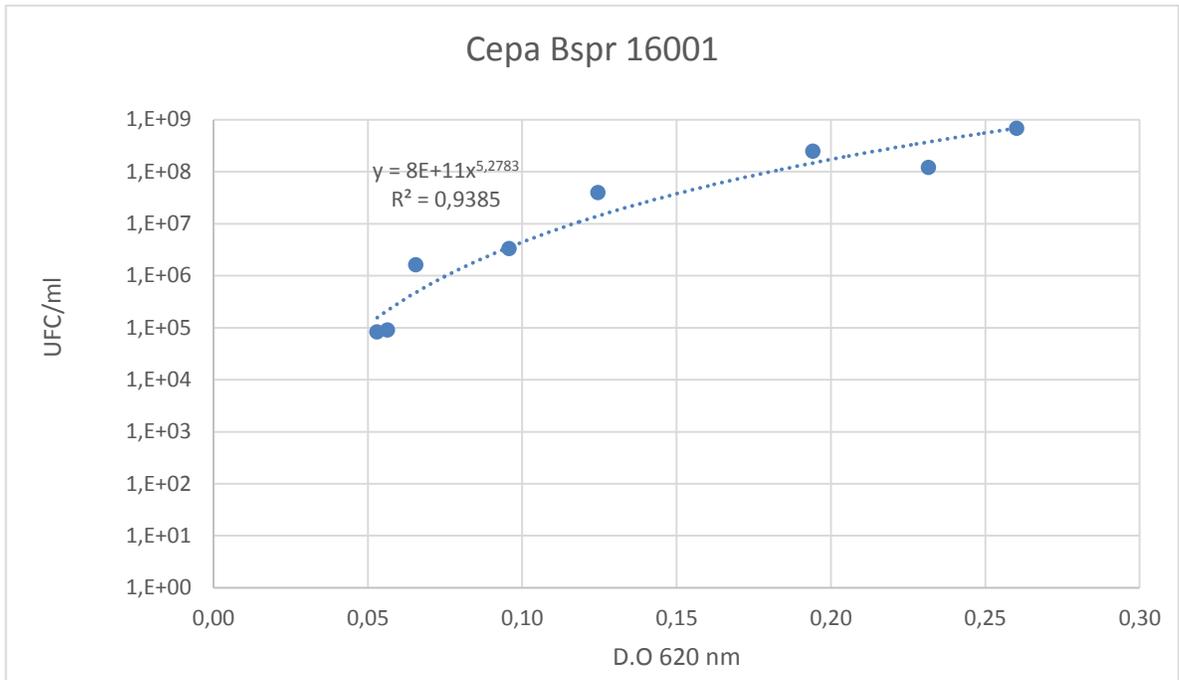
SANDAA, Ruth-Anne, et al. Characterisation of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*), using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, vol. 26, no 2, p. 302-311.

SHUMWAY, S. E.; SELVIN, RHONDA; SCHICK, D. F. Food resources related to habitat in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791): a qualitative study. *J. Shellfish Res*, 1987, vol. 6, no 2, p. 89-95.

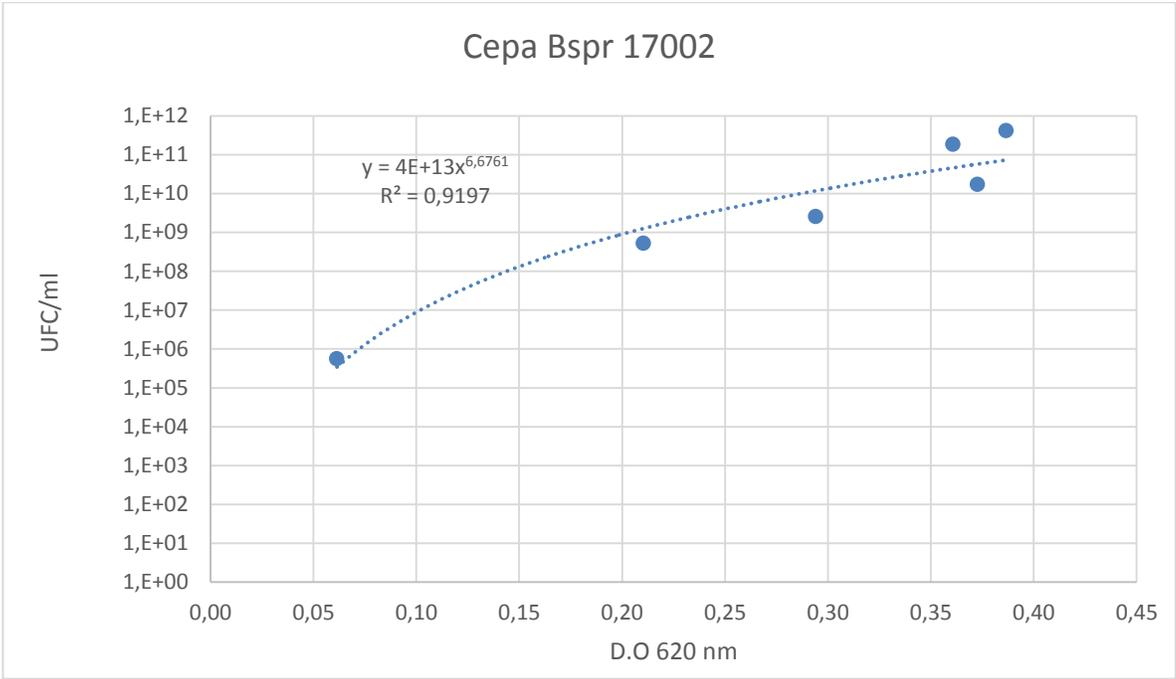
VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. *Los moluscos pectínidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura*, 2001, p. 127-146.

9. Anexos

Anexo A. Curva de crecimiento para la cepa Bspr 16001 durante 10 horas, con densidad óptica de 620 nm.



Anexo B. Curva de crecimiento para la cepa Bspr 17002 durante 10 horas, con densidad óptica de 620 nm.



Anexo C. Concentración mínima inhibitoria a Oxitetraciclina (ppm)

MIC (ppm)	CEPA	
	Bspr 16001	Bspr 17002
0.1	R	R
0,3	S	S
0,5	S	S
0,7	S	S
1	S	S
2	S	S
4	S	S
6	S	S
8	S	S
10	S	S
15	S	S
20	S	S
30	S	S
40	S	S
50	S	S
60	S	S
80	S	S
100	S	S
125	S	S
150	S	S
200	S	S
300	S	S

Dónde: S sensible al antibiótico, R resistente al antibiótico, I levemente sensible al antibiótico.

El antibiograma mostró que los aislados Bspr 16001 y 17002 fueron resistentes a penicilina. Siendo Bspr 17002 resistente también a furazolidona y medianamente sensible a oxitetraciclina y enrofloxacina.

Respecto al MIC mostró que la concentración inhibitoria para oxitetraciclina fue superior a 0.1 ppm para ambas cepas.

Anexo D. Síntomas de infección evaluados para larvas de *S. crassisquama*

AS	AT	AU	AV	AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE
24 Horas												
Cepa 16001				Cepa 17002				48 Horas				
T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3
0	1	5	2	3	5	0	1	3	5	3	3	5
4	3	5	3	3	5	0	4	4	5	3	3	5
4	4	5	3	4	5	2	4	4	5	3	4	5
2	2	4	2	2	3	1	3	3	4	2	2	3
2	2	4	2	2	3	0	3	3	4	2	2	3
3	3	5	3	5	5	2	5	5	5	3	5	5
2	2	4	2	2	3	0	3	3	4	2	2	3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48 Horas												
Cepa 16001				Cepa 17002				48 Horas				
T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3
1	2	2	0	0	3	0	1	1	2	1	2	4
1	2	2	0	0	4	0	1	2	2	1	2	5
1	2	0	0	0	2	0	1	2	0	1	2	4
0	0	0	0	2	3	1	0	0	0	2	4	5
0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	4
2	3	3	0	0	2	1	2	3	3	1	2	4
0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	2	4
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 Horas												
Cepa 16001				Cepa 17002				48 Horas				
T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3
2	3	4	3	4	5	1	2	3	4	3	3	5
2	3	3	4	4	5	1	2	3	4	4	4	5
3	3	3	4	4	4	1	3	3	4	4	4	5
0	2	2	2	3	4	0	2	2	2	2	3	5
1	1	2	3	3	3	1	1	1	2	3	4	5
2	3	3	3	4	4	1	2	3	3	3	4	5
2	2	2	3	3	4	0	2	2	2	2	3	5
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N. subnodosus y *C. gigas*.

AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR
Crassostrea gigas															
10 Horas															
Cepa 16001															
T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN
2	0	0	1	5	0	0	4	0	0	0	1	5	0	0	4
3	0	3	2	4	2	2	5	0	3	2	5	3	3	5	0
3	0	2	2	4	3	3	5	0	4	3	5	3	4	5	0
2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
2	0	2	3	5	3	4	5	2	2	3	5	3	5	5	2
2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 Horas															
Cepa 16001															
T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	3	2	4	2	2	5	0	3	2	5	3	3	5	0
3	0	2	2	4	3	3	5	0	4	3	5	3	4	5	0
2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
2	0	2	3	5	3	4	5	2	2	3	5	3	5	5	2
2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 Horas															
Cepa 17002															
T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN
0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	2	3	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pondylus Crassiquama															
10 Horas															
Cepa 16001															
T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	2	3	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 Horas															
Cepa 17002															
T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	2	2	3	2	2	3	1	2	2	3	2	2	3	4
0	0	1	1	2	2	2	4	1	1	1	2	2	2	4	1
0	0	1	1	1	2	3	3	0	2	1	1	2	2	3	1
0	0	0	0	1	2	2	4	0	0	2	2	2	3	4	0
0	0	1	1	2	2	2	3	0	1	1	2	2	2	3	0
1	0	2	3	3	3	4	4	1	2	3	3	3	4	4	1
0	0	1	2	2	2	3	3	0	2	2	2	2	3	3	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Iodipecten subnodosus															
10 Horas															
Cepa 16001															
T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN
1	0	2	2	3	2	2	3	1	2	2	3	2	2	3	4
0	0	1	1	2	2	2	4	1	1	1	2	2	2	4	1
0	0	1	1	1	2	3	3	0	2	1	1	2	2	3	1
0	0	0	0	1	2	2	4	0	0	2	2	2	3	4	0
0	0	1	1	2	2	2	3	0	1	1	2	2	2	3	0
1	0	2	3	3	3	4	4	1	2	3	3	3	4	4	1
0	0	1	2	2	2	3	3	0	2	2	2	2	3	3	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 Horas															
Cepa 17002															
T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	2	2	3	2	2	3	1	2	2	3	2	2	3	4
0	0	1	1	2	2	2	4	1	1	1	2	2	2	4	1
0	0	1	1	1	2	3	3	0	2	1	1	2	2	3	1
0	0	0	0	1	2	2	4	0	0	2	2	2	3	4	0
0	0	1	1	2	2	2	3	0	1	1	2	2	2	3	0
1	0	2	3	3	3	4	4	1	2	3	3	3	4	4	1
0	0	1	2	2	2	3	3	0	2	2	2	2	3	3	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

