

# **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.**

## **Estudio taxonómico de bacterias del género *Vibrio* aisladas de ostión (*Crassostrea gigas*) de cultivo**

POR:

**RICARDO ÁLVAREZ VILLASEÑOR**

---

TESIS APROBADA POR LA

UNIDAD MAZATLÁN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MAZATLÁN, SINALOA

DICIEMBRE 2006

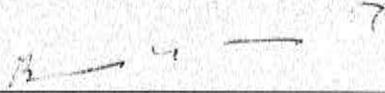
## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción total o parcial de esta tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del director de tesis.

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Ricardo Álvarez Villaseñor, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Acuicultura.

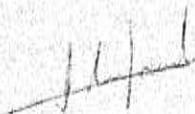


---

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
Director de tesis

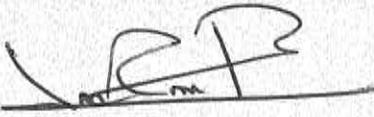
---

Dra. Ana Roque



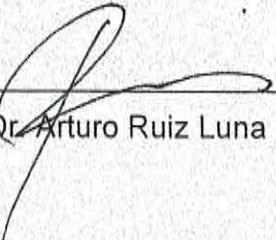
---

Dra. Silvia Alejandra García Gasca



---

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez



---

Dr. Arturo Ruiz Luna

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el crédito otorgado para la realización de mi maestría.

Al proyecto FOSEMARNAT-2004-01-33 "Estudio taxonómico de cepas bacterianas aisladas de sistemas y organismos marinos".

Al CIAD por la ayuda para la culminación de esta tesis.

Al IRTA-Acuicultura y por el apoyo y la disposición de sus instalaciones para realizar parte del trabajo de investigación de esta tesis, así como a todo su personal por las atenciones brindadas durante mi estancia en el centro.

Al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala por su amistad y confianza, así como por la acertada dirección de esta tesis.

A la Dra. Ana Roque, S. Alejandra García Gasca, Sonia A. Soto y el Dr. Arturo Ruiz Luna quienes formaron parte del comité tutorial, se agradece sus comentarios acertados que enriquecieron el presente trabajo.

A Dra. Dolors Furones Nozal directora del IRTA-Acuicultura por su amistad y por todas las facilidades prestadas durante mi estancia en San Carles de la Rápita.

A Carmen Bolan, Roxana Atondo, Gabriela Ramírez, Rubí Cornejo, Arnoldo Vásquez (centro de computo) y Noelia (IRTA) sin su valiosa ayuda simplemente esta tesis no hubiera sido posible, mil gracias.

A mis amigos y compañeros de maestría "Rafa, Bety, Pablo, Zohar y Edgar" por su valiosa amistad.

DEDICADA...

A mi esposa

*Amy Rodríguez Preciado*

y nuestro

*Bebe*

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos Particulares.....</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
<b><i>Crassostrea gigas</i>.....</b>	<b>4</b>
Biología.....	4
Distribución Geográfica.....	4
Cultivo de <i>C. gigas</i> .....	5
Estado actual.....	5
Técnicas de cultivo.....	6
Enfermedades.....	8
Vibriosis en <i>C. gigas</i> .....	10
Necrosis bacilar o vibriosis.....	10
Mortalidad de verano.....	11
Enfermedad del anillo café.....	12
<i>C. gigas</i> como Vector de Enfermedades en Humanos.....	12
<i>V. cholerae</i> .....	13
<i>V. parahaemolyticus</i> .....	13
<i>V. vulnificus</i> .....	14
<b>Taxonomía de Vibrios.....</b>	<b>15</b>
Familia Vibrionaceae.....	15
Género <i>Vibrio</i> .....	16
Aislamiento de Vibrios.....	16
Taxonomía de <i>Vibrio</i> sp.....	17
Concepto de Especie Procariótica.....	21
Técnicas Moleculares de Identificación Bacteriana.....	21
Hibridación ADN-ADN.....	24
Secuenciación del operón rARN.....	25
Ribotipificación.....	28
Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia.....	28
Técnicas Moleculares de Identificación Basadas en PCR.....	29
Amplificación al azar de polimorfismos en el ADN.....	29
Fragmentos de restricción polimórficos (RFLP).....	30
Electroforesis de múltiples loci de enzimas y análisis mediante secuencias de múltiples loci.....	30
Polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados.....	32
Amplificación de fragmentos repetitivos palíndromos.....	33
Vibrios Asociados a <i>C. gigas</i> .....	36
<b>Áreas de Estudio.....</b>	<b>37</b>
Noroeste Mexicano.....	37

Delta del Ebro, Cataluña, España .....	39
Legislación y situación actual .....	41
En México.....	42
En España.....	43
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>Obtención de los Aislados Bacterianos.....</b>	<b>45</b>
Recuperación de los Aislados Bacterianos del Noroeste Mexicano.....	45
Muestreo en el Delta del Ebro.....	47
Obtención de Aislados de <i>C. gigas</i> Cultivado en el Delta del Ebro.....	50
Purificación y Criopreservación de los Aislados .....	52
<b>Caracterización Genómica de los Aislados Bacterianos .....</b>	<b>53</b>
Caracterización por rep-PCR.....	53
Extracción de ADN .....	53
Reacción en Cadena de la Polimerasa de Elementos Palindrómicos repetidos (rep-PCR).....	55
Electroforesis.....	55
<b>Análisis del Patrón de Bandas.....</b>	<b>56</b>
<b>Secuenciación del Gen 16S rARN.....</b>	<b>57</b>
Amplificación por PCR del Gen 16S rDNA con Colas de M13.....	57
Purificación del Producto de PCR.....	60
Reacción de Secuenciación.....	60
Secuenciación .....	61
<b>Pruebas Bioquímicas.....</b>	<b>61</b>
Tinción Gram.....	62
Oxidasa.....	63
Sensibilidad al Agente Vibrioestático O/129.....	63
Oxido-Fermentación (O-F).....	64
Motilidad.....	65
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
Obtención de Aislados.....	66
Caracterización por (GTG) <sub>5</sub> -PCR.....	68
Análisis del Patrón de Bandas Generado por (GTG) <sub>5</sub> -PCR.....	69
Número de Bandas por Especie y Zona.....	70
Análisis del número y tamaño de bandas por especie .....	70
Análisis del número y tamaño de bandas por zona .....	73
Análisis de Similitud del Patrón de Bandas Generado por (GTG) <sub>5</sub> -PCR.....	76
Análisis Filogenético .....	83
Pruebas Bioquímicas.....	89
Análisis Ecológicos .....	91
Vibrios Identificados Durante el Verano e Invierno.....	100
Descripción de Especies Identificadas.....	101

Photobacterium .....	101
Vibrio .....	102
Especies de Vibrios Potencialmente Nuevas .....	114
Vibrio sp. ....	115
Cepas que No Pertenecen a la Familia Vibrionaceae .....	116
Cepas No Identificadas. ....	116
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>120</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>135</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>136</b>
Ostrícola Guevara S. A. de C. V. ....	136
Ostrícola del Sol S. C. de R. L. ....	139
Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora .....	141
S. C. P. P. E. Bahía de San Jorge S. C. L. ....	143
Coop. Única de Mujeres .....	144
Agromarinos S. A. de C. V. ....	146
Sol Azul S. A. de C. V. (Ensenada) .....	148
Sol Azul S. A. de C. V. (Mulegé).....	150
<b>Anexo 2.....</b>	<b>153</b>
Bahía Alfacs .....	153
Bahía Fangar .....	158
<b>Anexo 3.....</b>	<b>164</b>
Secuencias .....	164

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Producción en peso vivo de <i>C. gigas</i> en el 2003 por ostricultura en el mundo .....	6
<b>Tabla 2.-</b> Principales agentes patógenos de <i>C. gigas</i> . .....	9
<b>Tabla 3.-</b> Principales técnicas moleculares empleadas en la caracterización e identificación de procariontes.....	23
<b>Tabla 4.-</b> Sitios de muestreo de ostión en el noroeste mexicano (modificada de Cabanillas, 2005) .....	46
<b>Tabla 5.-</b> Sitios de muestreo de ostión en el Delta del Ebro.....	48
<b>Tabla 6.-</b> Iniciadores empleados.....	58
<b>Tabla 7.-</b> Aislados de cada granja.....	67
<b>Tabla 8.-</b> Análisis del patrón de bandas generado por (GTG) <sub>5</sub> -PCR por especie.....	71
<b>Tabla 9.-</b> Análisis del patrón de bandas generado por (GTG) <sub>5</sub> -PCR por zona .....	74
<b>Tabla 10.</b> Especies de bacterias identificadas aisladas de ostión cultivado en el noroeste mexicano y en el delta del río Ebro identificadas mediante (GTG) <sub>5</sub> -PCR.....	79
<b>Tabla 11.-</b> Posición filogenética de cepas representativas de clusters formados por (GTG) <sub>5</sub> -PCR sobre la base de secuencias del gen 16S rARN.....	86
<b>Tabla 12.-</b> Pruebas bioquímicas.....	90
<b>Tabla 13.-</b> Número de cepas aisladas de ostión identificadas por (GTG) <sub>5</sub> -PCR pertenecientes a la familia Vibrionaceae registradas en las zonas de cultivo del noroeste mexicano y del delta del Ebro. ....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Árbol filogenético de cepas tipo .....	20
<b>Figura 2.-</b> Estructura secundaria de la molécula 16S rARN de <i>E. coli</i> . .....	27
<b>Figura 3.-</b> Zonas de estudio en el noroeste mexicano .....	47
<b>Figura 4.-</b> Zonas de estudio en el delta del Ebro.....	49
<b>Figura 5.-</b> Vista panorámica de la "batería" de bateas ostrícolas ubicadas en la bahía de Alfacs, delta del río Ebro, Cataluña, España.....	49
<b>Figura 6.</b> Diagrama de muestreo en el Delta del Ebro.....	51
<b>Figura 7.-</b> Consenso del gen 16S rARN de 65 cepas tipo de Vibrios .....	59
<b>Figura 8.-</b> Diagrama de flujo para la identificación fenotípica de bacterias pertenecientes al género <i>Vibrio</i> . .....	62
<b>Figura 9.</b> Gel de electroforesis producido por (GTG) <sub>5</sub> -PCR .....	68
<b>Figura 10.-</b> Análisis del patrón de bandas empleando el software GelCompar II Ver. 4.5.....	69
<b>Figura 11.-</b> Promedio del número de bandas generado por (GTG) <sub>5</sub> -PCR por especie analizada .....	72
<b>Figura 12.-</b> Promedio del tamaño de las bandas generado por (GTG) <sub>5</sub> - PCR por especie analizada .....	73
<b>Figura 13.-</b> Promedio del número de bandas generado por (GTG) <sub>5</sub> -PCR por zona analizada .....	75
<b>Figura 14.-</b> Promedio del tamaño de las bandas generado por (GTG) <sub>5</sub> - PCR por zona analizada.....	75
<b>Figura 15.-</b> Dendrograma de cepas pertenecientes a la familia Vibrionaceae aisladas de ostión ( <i>C. gigas</i> ) cultivado en granjas del noroeste mexicano y en el delta del Ebro, Cataluña, España .....	82

<b>Figura 16.-</b> Modelo propuesto del árbol filogenético.....	88
<b>Figura 17.-</b> Riqueza específica por zona de estudio.....	91
<b>Figura 18.-</b> Porcentaje de especies identificadas con respecto al total identificado por zona y con respecto al total de todas las zonas. ....	92
<b>Figura 19.</b> Especies identificadas durante el verano e invierno en el noroeste mexicano. ....	101

## RESUMEN

Se realizó un estudio taxonómico de bacterias del género *Vibrio* aisladas de ostión (*Crassostrea gigas*) cultivado en ocho granjas localizadas en los estados de Sinaloa, Sonora, Baja California y Baja California Sur, en el noroeste mexicano y de dos zonas de producción ostrícola localizadas en el delta de río Ebro, provincia de Tarragona; Cataluña, España. El estudio se realizó empleando las técnicas de tipificación molecular: (GTG)<sub>s</sub>-PCR y secuenciación del gen 16S rRNA, así como algunas pruebas bioquímicas, con el objetivo de estudiar la composición taxonómica de las bacterias del género *Vibrio* aisladas de ostión cultivado en dos áreas geográficas distintas. Los resultados de estudio muestran que se obtuvieron 758 aislados bacterianos en total, de los cuales 327 proceden de granjas ubicadas en el noroeste de México y 431 del delta del río del Ebro. Los aislados obtenidos fueron caracterizados empleando (GTG)<sub>s</sub>-PCR. Las especies pertenecientes a la familia Vibrionaceae mostraron un promedio de 19.8 bandas (n= 639), con un tamaño promedio de 1,414.48 pares de bases (pb) (n<sup>o</sup> 12,628) cuando son caracterizadas por (GTG)<sub>s</sub>-PCR. El análisis del patrón de bandas produjo un dendrograma con 32 clusters compuesto por 620 cepas, incluyendo las cepas tipo y las cepas de referencia y 133 cepas que no formaron ningún cluster. (GTG)<sub>s</sub>-PCR y pruebas bioquímicas mostraron que 27 cepas no pertenecen a la familia Vibrionaceae. El análisis permitió la identificación de 20 especies pertenecientes al género *Vibrio* y dos especies al género *Photobacterium*: *V. alginolyticus* (40 cepas), *V. brasiliensis* (dos cepas), *V. campbellii* (52 cepas), *V. chagasii* (215 cepas), *V. coralliilyticus* (una cepa), *V. cyclotrophicus* (nueve cepas), *V. fortis* (17 cepas), *V. harveyi* (65 cepas), *V. gigantis* (10 cepas), *V. mediterranei* (45 cepas), *V. neptunius* (siete cepas), *V. parahaemolyticus* (siete cepas), *V. ponticus* (seis cepas), *V. rotiferianus* (13 cepas), *V. splendidus* (tres cepas), *V. xuii* (una cepa), *Vibrio* sp. nov. 1 (31 cepas), *Vibrio* sp. nov. 4 (una cepa), *Vibrio* sp. nov. 5 (tres cepas), *Vibrio* sp. nov. 6 (cinco cepas) y *P. damsela* (dos cepas), *Photobacterium* sp. nov. 7 (cuatro cepas). Las cuatro especies potencialmente nuevas fueron reconocidas mediante la secuencia completa del gen 16S rARN (>97% de similitud rARN). Se seleccionaron 39 cepas a las cuales se les secuenció algún tercio o todo el gen 16S rARN. El criterio de la selección de cepas a secuenciar se basó en los clusters que no incluyeron cepas tipo y/o referencia o que presentaron un coeficiente de similitud por debajo del 42% (Jaccard) con otros clusters identificados. Un análisis cológico entre ambas regiones geográficas; el noroeste mexicano y el delta del Ebro permitió conocer que los ostiones, comparten una flora bacteriana de 10 especies *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. chagasii*, *V. fortis*, *V. harveyi*, *V. mediterranei*, *V. neptunius*, *V. ponticus*, *V. rotiferianus* y *Vibrio* sp. nov. 1. Estos resultados demuestran que los ostiones cultivados en el noroeste mexicano tienen una riqueza bacteriana específica mayor a la de los ostiones cultivados en el delta del río Ebro. Por otro lado, los ostiones cultivados en las ocho granjas ostrícolas y en las dos bahías del delta del Ebro analizadas en este estudio, no revelan la presencia de vibrios potencialmente patógenos en humanos. Sin embargo, es recomendable realizar estudios enfocados en la presencia de estos patógenos en organismos cultivados en ambas regiones geográficas.

## INTRODUCCIÓN

La ostricultura representa dentro de la acuicultura marina una de las actividades acuícolas más importantes desde el punto de vista productivo y económico, siendo esta industria dominada por el cultivo del ostión japonés (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793) que representa el 99.5 % de la producción ostrícola mundial (FAO, 2003). Sin embargo, uno de los principales problemas que frenan el desarrollo de esta actividad son las enfermedades de origen bacteriano (Griffin *et al.*, 2003), y más concretamente aquellas causadas por bacterias pertenecientes a la familia Vibrionaceae, quienes no sólo representan un problema para los ostiones, sino que también pueden ser patógenos de los consumidores.

Desde la década de los 50's se han realizado esfuerzos por conocer la composición de la flora bacteriana de *C. gigas* (Colwell y Liston, 1959), sin embargo, hasta la fecha estos estudios han sido limitados. Aunque existe una gran cantidad de información sobre los principales patógenos que son transmitidos al hombre por el consumo de ostión, el mayor problema de los últimos años es el surgimiento de enfermedades en los cultivos de moluscos bivalvos, en los que indudablemente las especies del género *Vibrio* son uno de principales agentes etiológicos (Paillard *et al.*, 2004).

En los últimos cuatro años las especies descritas como pertenecientes a la familia Vibrionaceae han aumentado de 67 especies en el 2002 (Thompson *et al.*, 2004a) a 85 especies descritas en el 2006 (<http://www.bacterio.cict.fr>). Es indudable que los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de herramientas que permiten caracterizar e identificar aislados bacterianos de una forma mucho más confiable.

La secuencia del gen 16S rARN, secuencias de genes "housekeeping" que codifican proteínas y la hibridación ADN-ADN son considerados como los criterios para la delimitación de especies procarióticas (Stackebrandt *et al.*, 2002). Sin embargo, muchos investigadores han promovido nuevas especies basándose en métodos o técnicas genómicas que han demostrado tener suficiente grado de congruencia con la reasociación ADN-ADN, como es el caso de AFLP y rep-PCR (Rademaker *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2001, Gomez-Gil *et al.*, 2004).

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de fragmentos repetidos palíndromos (rep-PCR) empleando el iniciador (GTG)<sub>5</sub> ha sido reconocida como una técnica taxonómica simple que se caracteriza por tener un alto poder discriminatorio, un bajo costo, un alto rendimiento con un gran número de aislados y ha demostrado ser una herramienta confiable para la clasificación e identificación de aislados bacterianos procedentes de diversas fuentes (Versalovic *et al.*, 1994; Gevers *et al.*, 2001; Gomez-Gil *et al.*, 2004; Gomez-Gil *et al.*, 2006 en prensa).

El objetivo principal de este estudio fue el de caracterizar e identificar la composición de la flora bacteriana perteneciente a la familia Vibrionaceae del ostión japonés (*Crassostreae gigas*) cultivado en los centros de producción ostrícolas más importantes del noroeste mexicano que incluyen los estados de Sinaloa, Sonora, Baja California y Baja California Sur. También se analizaron individuos de las zonas de producción ostrícola más importantes de España ubicadas en el delta del río Ebro, en la provincia autonómica de Tarragona, Cataluña, España, para identificar posibles especies de bacterias patógenas pertenecientes a la familia Vibrionaceae que supongan un riesgo para el cultivo de ostión o para el consumidor y saber si existen especies potencialmente nuevas.

## OBJETIVO

Estudiar la composición taxonómica de las bacterias del género *Vibrio* aisladas de ostión (*Crassostrea gigas*) cultivado en dos áreas geográficas distintas.

### Objetivos Particulares

- Obtener aislados de vibrios de ostión cultivado
- Caracterizar molecular del genoma de los aislados de vibrios
- Comparar la riqueza de especies entre las regiones geográficas analizadas

## ANTECEDENTES

### *Crassostrea gigas*

#### **Biología**

Los ostiones son organismos invertebrados de cuerpo blando sin segmentar, se encuentran cubiertos por una concha constituida por dos valvas de naturaleza calcárea unidas entre sí por la región dorsal y articuladas gracias a una charnela que posee dientes que forman un engranaje, la cual hace posible los movimientos de apertura y cierre. Los ostiones son organismos pelágicos durante su vida larvaria y bentónicos durante su etapa adulta (Polanco y Corral, 2002b). Estos organismos se distribuyen en la zona intermareal, en aguas de poca profundidad y están fijos a objetos sólidos a través del biso de una de sus valvas (Bautista, 1989; Polanco y Corral, 2002b). Son filtroalimentadores, aproximadamente filtran unos 10 litros de agua por hora; por lo que se les ubica en la base de la cadena alimenticia. Su crecimiento es rápido, aproximadamente 8 cm en 18 meses, en los trópicos (Guerra, 2002) y no requieren de la adición de alimentos cuando son cultivados (Newkirk, 1993).

#### **Distribución Geográfica**

La distribución de *C. gigas* está en función de la temperatura del agua, ya que éste es sin duda el parámetro esencial para su ubicación. Los ostiones son propios de las zonas subtropicales y pueden extenderse más o menos sobre las zonas templadas en las que las corrientes de aguas cálidas invaden las costas más frías (Polanco y Corral, 2002b).

*Crassostrea gigas* habita ambientes marinos y/o estuarinos, generalmente la zona intermareal, siendo su repartición geográfica natural las costas del norte del mar de China y Japón (Polanco y Corral, 2002b). Sin embargo, esta especie

ha sido introducida para su cultivo en países como Australia, Francia, Holanda, Portugal, Tailandia, Estados Unidos, Reino Unido, España y México (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003).

### **Cultivo de *C. gigas***

Estado actual. La ostricultura está dominada por la producción de *C. gigas*. Esta actividad aportó el 99.5% de la producción total de ostión en el 2003. La producción por capturas en el 2003 fue de 21,536 toneladas, siendo Corea y Estados Unidos los principales productores por captura (FAO, 2003) (tabla 1). Sin embargo, la evolución de la producción muestra una reducción significativa de la participación de las capturas en el total de la producción, adquiriendo la ostricultura un mayor peso en el sector, que lo posiciona como la alternativa más viable para el abastecimiento del mercado.

El dominio de *C. gigas* en la ostricultura se explica por el plazo de maduración de las inversiones, es decir, el acelerado ritmo de crecimiento del ostión permite el producto en el plazo de un año y medio ya esté en el mercado listo para su consumo. Además, el cultivo es relativamente fácil y el nivel de mortalidad relativamente bajo, aproximadamente del 35 % de la producción (Polanco y Corral, 2002a). Estas características sobre el cultivo del ostión japonés en general explican la preferencia de las empresas por el cultivo de esta especie; con menos riesgo en la inversión y mayor productividad que las demás especies de ostras (Polanco y Corral, 2002a).

Tabla 1. Producción en peso vivo de *C. gigas* en el 2003 por ostricultura en el mundo

Rango	País	Producción *
1	China	3,668,237
2	Japón	260,644
3	Corea	238,326
4	Francia	106,400
5	Estados Unidos	42,756
15	México	1256
16	España	715

\* Toneladas métricas

Técnicas de cultivo. Descripción breve de las principales etapas operativas en el cultivo integrado de *C. gigas* propuestas por Guerra (2002):

#### 1) Cultivo larvario y metamorfosis

El cultivo se inicia cuando tiene lugar el desove de las larvas por las hembras y continúa hasta el final de la metamorfosis. Durante este periodo tiene lugar el desarrollo larvario (larva veliger, pediveliger) y la metamorfosis (fijación y formación de postlarvas). La conducta natural las larvas recién eclosionadas, es nadar agrupadas en la superficie lo que facilita su captura. Posteriormente, son colocadas en tanques de fibra de vidrio o polietileno con alimentación microalgal y aeración constante (Guerra, 2002).

Cuando las larvas alcanzan la talla en que se inicia la metamorfosis, se observan una serie de señales visuales (aparición del ocelo, pérdida de la corona ciliar, aparición del pie, entre otras) que indican la transformación de las larvas que pasan de ser un organismo pelágico a uno bentónico fijado definitivamente a un sustrato, por una sustancia cementante que se encuentra en la base del pie. El periodo de cultivo larvario y metamorfosis dura

aproximadamente 21 días, alcanzando las post-larvas una talla mayor a 3 mm (Guerra, 2002).

## 2) Engorda de semilla

En general se usan contenedores en forma tubular (40-50 cm de diámetro), con diferente luz de malla en el fondo, en donde esta depositada la semilla. El agua con suplemento de microalgas, pasa por un flujo invertido impulsada por sistemas de aeración a través de la capa de semilla. Las necesidades de flujo de agua mínimos que tienen que pasar a través de los contenedores, está relacionado con la temperatura y el tamaño de la semilla (Guerra, 2002). Rodhouse *et al.* (1981; en Guerra, 2002) la definen "cantidad de flujo necesario" con la siguiente formula:

$$Fr = (0.47 + 0.04T) Lw^{-0.26}$$

Fr = tasa de flujo (ml/min<sup>-1</sup>/g<sup>-1</sup>); T = temperatura °C; Lw = peso vivo (gr)

En la producción de microalgas para la alimentación de las larvas y postlarvas de ostión se siguen métodos que varían, desde los controlados en laboratorio hasta los sistemas de producción masiva bajo condiciones ambientales naturales (Lavens y Soorgelos, 1996; en Guerra, 2002). Las especies *Ishochrysis* sp., *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica* y *Thalassiosira pseudonana*, son las cinco especies de microalgas más usadas en los criaderos de moluscos (Coutteau y Sorgeloos, 1992, en Guerra, 2002).

## 3) Cultivo exterior (engorda)

El ostión se cultiva en el medio natural sobre el fondo, directamente en el substrato, sobre mesas o artefactos que se apoyan en el substrato de la zona intermareal, o bien en suspensión (bateas o sistemas similares). Cuando los

organismos alcanzan un tamaño de 3 a 4 cm se colocan en bandejas ostrícolas o bien se dejan fijados a conchas perforadas, las cuales se unen a una cuerda de cultivo. En ambos casos los ostiones son colgados en bateas, similares a las empleadas en el cultivo de mejillón (Guerra, 2002).

La engorda del ostión dura hasta que el ostión alcanza una talla de 8 cm aproximadamente, con una duración de cultivo de 18 meses, desde que se obtiene la semilla hasta la comercialización del producto (Guerra, 2002).

#### 4) Depuración

Los ostiones tienen la capacidad de autodepurarse de la contaminación microbiológica que puede existir en determinadas áreas de cultivo. Estos microorganismos por su patogenicidad o por su cantidad, pueden causar enfermedades al ostión y/o al consumidor. La depuración es un proceso mecánico que efectúa el propio ostión de forma natural, limitándose el depurador a administrarle agua de mar libre de patógenos, con la cual el bivalvo lava su aparato digestivo durante un tiempo determinado hasta que los niveles microbiológicos no son perjudiciales para el consumo humano. La finalidad de este proceso es el de obtener un producto que cumpla con los requisitos legales establecidos y al mismo tiempo, posea parámetros de calidad y salubridad adecuados para su comercialización y consumo (Guerra, 2002).

#### Enfermedades

Los ostiones *C. gigas* al igual que muchos otros organismos se ven afectados por patógenos oportunistas durante su cultivo, los cuales provocan enfermedades infecciosas (tabla 2). Dentro del grupo de las enfermedades producidas por bacterias, destacan varias especies de *Vibrio* quienes han estado implicadas en los brotes de enfermedad afectando a los ostiones independientemente de su estadio de vida (Paillard *et al.*, 2004).

Tabla 2.- Principales agentes patógenos de *C. gigas*.

Agente patógeno	Familia/Especie	Referencia
Parásitos	<i>Perkinsus marinus</i> <i>Mikrocytos mackini</i> <i>Mikrocytos roughleyi</i> <i>Mycicola ostrae</i>	Polanco y Corral, 2002b
Virus	Herpesviridae Iridoviridae Papoviridae Reoviridae	Polanco y Corral, 2002b
Bacterias	<i>Vibrio tubiashi</i> <i>Vibrio splendidus</i> <i>Vibrio sp.</i> <i>Vibrio anguillarum</i> <i>Alteromonas sp.</i> <i>Cytophaga sp.</i> <i>Nocordia</i> <i>Rickettsia</i> <i>Chlamydia</i>	Paillard <i>et al.</i> , 2004

Sin embargo, algunos autores concuerdan en que las causas que favorecen la aparición y dispersión de las enfermedades se deben buscar en los intercambios comerciales y en el aumento de los niveles de contaminación (Griffin *et al.*, 2003). Esta situación requiere de un mayor estudio enfocado hacia la identificación y descripción de las causas que facilitan el desarrollo de agentes patógenos, unido a estudios epidemiológicos que permitan la adopción de medidas profilácticas. Este camino debe iniciarse mediante el aislamiento de los agentes patógenos que contribuirá en gran medida a controlar las epizootias que tanto daño ocasionan a los cultivos, dando lugar a grandes pérdidas económicas y al desaliento en los productores (Bautista, 1989).

### **Vibriosis en *C. gigas***

Los ostiones por su tipo de alimentación, pueden acumular a partir del agua una gran cantidad de microorganismos que propician una rica flora bacteriana (Bautista, 1989).

Las especies más importantes de bacterias desde el punto de vista patológico en ostión son las pertenecientes al género *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Bautista, 1989; Austin, 1988; Gómez-Gil *et al.*, 2004; Paillard *et al.*, 2004; Berthe, 2006; Hernández-Zárate y Olmos-Soto, 2006), estos grupos son capaces de proliferar aprovechando las condiciones favorables que tienen lugar en los tanques de cultivos larvarios y en las zonas de engorda de ostión. En general, estos cultivos suelen verse afectados por vibriosis (Polanco y Corral, 2002b; Paillard *et al.*, 2004), debida la producción de toxinas (Lampbert *et al.*, 2001) y/o presencia de inhibidores de proteasas (Faisal *et al.*, 1998)

Necrosis baciliar o vibriosis. Comúnmente, las infecciones por vibrios son conocidas como: necrosis baciliar, necrosis larval o vibriosis, y es conocida como una enfermedad oportunista afectando principalmente los cultivos larvarios (Elston, 1990, Berthe, 2006). Muchas especies de vibrios han sido asociadas a esta enfermedad: *V. tubiashi*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. ordali*, *V. alginolyticus* y *Vibrio* sp. Sin embargo, especies de *Pseudomonas* y *Aeromonas* también se les ha involucrado en la enfermedad (Berthe, 2006).

Esta enfermedad se presenta en todos los ambientes marinos donde se practique el cultivo larvario de bivalvos. La infección generalmente es iniciada por la adherencia de bacterias a la superficie externa de la concha. Cuando la bacteria logra penetrar la concha, el resultado es la necrosis del manto y la penetración de la bacteria en todos los tejidos blandos vía cavidad celómica. De la infección sistemática de los tejidos blandos de las larvas o juveniles del ostión

resulta la necrosis del tejido y la muerte. Los signos de la infección incluyen una infección repentina de la bacteria lo que reduce la alimentación de la larva, nado errático, comportamiento posiblemente debido al daño velar, sin embargo, los signos clínicos de esta enfermedad son poco conocidos. El diagnóstico definitivo de esta enfermedad requiere de la identificación de las especies específicas que producen la vibriosis (Waechter *et al.*, 2002; Paillard *et al.*, 2004; Berthe, 2006).

Mortalidad de verano. Recientemente, varios investigadores describieron mortalidades crónicas en los cultivos ostrícolas del norte de Francia durante el verano de la última década (Lacoste *et al.*, 2001; Le Roux *et al.*, 2002; Waechter *et al.*, 2002; Le Roux *et al.*, 2004; Gay *et al.*, 2004a; Gay *et al.*, 2004b; Paillard *et al.*, 2004). Dichas mortalidades se han reportado principalmente en juveniles de *C. gigas* y fueron asociadas con un absceso (acumulación de pus) en el espacio extra-palial resultado de la invasión por bacterias tipo bacilos a lo largo de la concha (Elston, 1999 en Paillard *et al.*, 2004). Se observan alteraciones en el manto y crecimiento anormal de la concha. Esta enfermedad ha sido reportada solamente en juveniles de *C. gigas* con una talla máxima de 1 cm de concha, y frecuentemente en organismos de 2 a 6 mm. El examen microscópico del manto y la concha ha revelado una afectación por un absceso crónico que es diferente de la infección del ligamento de la charnela y de la enfermedad del anillo café (Paillard *et al.*, 2004). Este síndrome fue llamado "Mortalidad de Verano" parece tener una compleja etiología con varios factores, implicados: las condiciones ambientales, fisiológicas, parámetros genéticos del hospedero y agentes infecciosos (Le Roux *et al.*, 2002).

Solamente, tres agentes infecciosos potencialmente patógenos han sido asociados a la "Mortalidad de Verano": virus del herpes (Renault *et al.*, 2000; Renault *et al.*, 2001), *Vibrio splendidus* biotipo I (Lacoste *et al.*, 2001) y *Vibrio splendidus* biotipo II (Waechter *et al.*, 2002). Las dos cepas de *V. splendidus*

provocaron mortalidades en *C. gigas* bajo condiciones experimentales (Gay *et al.*, 2004). Sin embargo, embargo estos agentes infecciosos no pueden ser considerados como el agente etiológico de la "enfermedad del verano", debido a que aun es necesario realizar estudios experimentales para conocer el efecto de las condiciones ambientales, fisiología y factores genéticos de la virulencia, así como de la respuesta del hospedero (Le Roux *et al.*, 2002). No se han reportado signos clínicos específicos para esta enfermedad.

Enfermedad del anillo café. Esta enfermedad es causada por *V. tapetis*. Se ha demostrado que la virulencia del aislado varía de acuerdo a la cepa y al molusco bivalvo hospedero. Esta enfermedad solamente ha sido reportada en las almejas *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus* de Francia, España, Inglaterra e Irlanda. Sin embargo, *V. tapetis* ha sido aislado de otros moluscos bivalvos, incluyendo *C. gigas* (Paillard *et al.*, 2004), aunque su patogenicidad aún no ha sido comprobada. La bacteria se adhiere a la superficie de la lamina periostracal en el borde del manto causando una colonización progresiva, la secreción resultante causa el deposito de materia orgánica café en la superficie de la almeja, el cual es considerado como el signo clínico de la enfermedad. La infección también provoca un proceso de descalcificación. Las técnicas de diagnóstico disponibles son observación de los signos (el anillo café), microscopía electrónica, inmunoensayos, cultivo e identificación bacteriológica. No existen medidas claras para controlar la enfermedad se recomienda reducir la densidad de los cultivos y medidas profilácticas (Berthe, 2006).

### ***C. gigas* como Vector de Enfermedades en Humanos**

Los moluscos bivalvos pueden actuar como portadores de microorganismos que sean patógenos para el hombre, como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio*

*vulnificus* y *Vibrio cholerae* (Bautista, 1989; Matté *et al.*, 1994) que son de los más importantes desde el punto de vista patológico.

Muchas de las especies de *Vibrio* son importantes patógenos en humanos, entre las especies más representativas que tienen esta facultad se pueden considerar a:

*V. cholerae*. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en ambientes estuarinos y de agua dulce y tiene la habilidad de producir la toxina cólera que provoca gastroenteritis (Fallarino *et al.*, 2002), causante de signos clínicos como abundante diarrea líquida, deshidratación y en muchos casos la muerte (Nishibuchi, 2006).

*V. parahaemolyticus*. Esta bacteria se encuentra distribuida en ambientes marinos y estuarinos, pero también se ha reportado como parte de la flora bacteriana normal de una gran número de especies marinas (DePaola *et al.*, 2000). Esta especie se divide en cepas patógenas o no patógenas, clasificación basada en la ausencia o presencia de los genes *tdh* y *trh* que codifican para la toxina termoestable directa (TDH) y la toxina hemolisina relacionada (TRH), respectivamente (Nishibuchi y Kaper, 1995; en Nishibuchi, 2006). TDH tiene actividad hemolítica sobre una variada gama de eritrocitos (fenómeno de Kanagawa); algunas de las propiedades de esta toxina son: citotoxicidad, aumento de la permeabilidad vascular y acumulación de líquido en el asa de ileon en el modelo experimental en conejos. El mecanismo patogénico es la alteración del flujo iónico de las células intestinales en el que desencadena una diarrea secretora (DePaola *et al.*, 2000, Raimondi *et al.*, 2000; Heitmann *et al.*, 2005). Mientras que TRH que también produce acumulación de líquido en el modelo experimental de asa ileal y presenta actividad citotóxica en una variedad de tejidos; requiere a demás de otros factores para causar

enfermedad, como una variedad de pili, hemaglutininas, factores de colonización y capacidad de invasión celular. La relación entre ambos genes (*tdh* y *trh*) es muy estrecha (97 % de similitud). (DePaola *et al.*, 2000, Raimondi *et al.*, 2000; Heitmann *et al.*, 2005).

*V. vulnificus*. Su distribución es amplia en sistemas marinos y estuarinos. Esta bacteria se encuentra clasificada en dos subgrupos (biogrupo 1 y biogrupo 2). Por lo general el biogrupo 1 es un importante patógeno de humanos y el biogrupo 2 es patógeno de anguilas (Nishibuchi, 2006). El biogrupo 1 es causante de infecciones y septicemia en humanos inmunocomprometidos (Finkelstein *et al.*, 2002).

Otras especies de la familia Vibrionaceae como *V. mimicus*, *Grimontia hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, *Photobacterium damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* y *V. harveyi*; han sido reportadas como patógenos en humanos, aunque su acción patogénica es poco conocida (Nishibuchi, 2006).

Estudios de tipificación y taxonomía han revelado que existe una cantidad considerable de taxa correspondientes a la familia Vibrionaceae que podrían no estar adscritos a alguna de las especies conocidas y que podrían ser potenciales patógenos en humanos (Ortigosa *et al.*, 1994 en Macián *et al.*, 2001) y que además requieren de caracterización genética (Macián *et al.*, 2001; Nishibuchi, 2006).

La mayoría de los brotes de infecciones por vibrios en países desarrollados y subdesarrollados se da principalmente por el consumo de mariscos, siendo los más representativos los moluscos bivalvos y los camarones (DHHS 1999; DePaola *et al.*, 2003; Matté, 1994). Estas bacterias no sólo juegan un papel

negativo en la salud pública, sino que también causan graves problemas a la industria ostrícola, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas (Vandenberghe *et al.*, 1999) ya que la presencia de vibrios potenciales causantes de enfermedades suponen un riesgo para el consumidor y puede condicionar su comercialización.

### Taxonomía de Vibrios

#### **Familia Vibrionaceae**

De acuerdo con el Manual para la determinación bacteriológica de Bergey<sup>1</sup> (Holt *et al.*, 1994), las bacterias pertenecientes a la familia Vibrionaceae son bacilos alargados o curvos, Gram negativos, tienen motilidad mediante un flagelo polar. Son anaeróbicos facultativos, quimiorganotróficos con metabolismo fermentativo. Muchas de las especies que pertenecen a esta familia crecen apropiadamente a 37°C, pero algunas especies de *Photobacterium* y *Vibrio* necesitan de 25 °C o menos para su crecimiento. Catabolizan D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácidos y algunas especies producen gas. La mayoría es oxidasa positiva. *Photobacterium* y la mayoría de las especies de *Vibrio* requieren de 2-3 % NaCl para su óptimo crecimiento. Se encuentran distribuidas en todo el mundo, son principalmente habitantes acuáticos fundamentalmente marinos y algunas de agua dulce, generalmente se encuentran en asociación con organismos acuáticos. Muchas especies son patógenas de humanos, peces, ranas, entre otros vertebrados e invertebrados. Esta familia está compuesta por siete géneros: *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio*, de acuerdo a la

---

<sup>1</sup> La novena edición del manual para la determinación de Bergey contiene la descripción de las especies que conforman la familia Vibrionaceae y solo contempla los géneros *Aeromonas*, *Enhydrobacter*, *Photobacterium*, *Plesiomonas* y *Vibrio* como pertenecientes a esta familia.

"Lista de nombres de procariontes válidos en nomenclatura" ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)).

### **Género *Vibrio***

De acuerdo con manual para la determinación bacteriológica de Bergey (Holt et al., 1994), las bacterias del género *Vibrio* son bacilos rectos o curvos, Gram negativos. Poseen motilidad mediante uno o más flagelos polares los cuales están dentro de una vaina en el exterior de la membrana de la pared celular. Son anaerobios facultativos y quimiorganotróficos. La temperatura para su óptimo crecimiento varía de los 20 a los 30°C para la mayoría de las especies. Catabolizan D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácidos, pero no de gas (excepto *V. furnissii*, *V. gazogenes*, y algunas cepas de *Listonella damsela*). Son oxidasa positiva (excepto *V. gazogenes*, *V. metschnikovii* y *V. ordalii*). La mayoría de las especies fermentan carbohidratos incluyendo maltosa, D-manosa y tretalosa. Son sensibles al agente vibriostático O/129. Los iones de sodio estimulan el crecimiento de todas las especies. Fundamentalmente habitan ambientes acuáticos en un amplio rango de salinidades. Muchas son comunes en ambientes marinos y estuarinos, y sobre la superficie y en el contenido intestinal de animales marinos. Algunas especies también se les encuentran en agua dulce. Algunas especies son patógenas para el humano, y muchas especies son patógenas de vertebrados e invertebrados marinos.

### **Aislamiento de Vibrios**

Las especies del género *Vibrio* se pueden aislar fácilmente de ambientes o de muestras clínicas, aunque algunas especies pueden requerir de factores de crecimiento y/o vitaminas (Gómez-Gil y Roque, 2006).

La selección de vibrios se puede hacer cuando algunos agentes selectivos (sal de bilis, teepol, tellurito, polimixina B y/o polimixina E (colistina) y sales biliares) son incorporados al medio. El agar comercial TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa) es un medio ideal para la selección, aislamiento y purificación de vibrios. La mayoría de los vibrios crecen en grandes colonias con diferentes morfologías. Los vibrios que pueden metabolizar la sacarosa forman colonias de color amarillo en este medio, y las que no, forman colonias verdes.

El crecimiento de las bacterias Gram positivas y coliformes en este medio es inhibido por la presencia de sales biliares. Sin embargo, aunque TCBS es el mejor medio para el aislamiento de vibrios, pueden crecer cepas de *Staphylococcus*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Streptococcus*, *Aeromonas* y *Shewanella* (Nicholls *et al.*, 1976; en Gómez-Gil y Roque, 2006); pero generalmente, el crecimiento de sus colonias es muy pequeño y mediocre. *Vibrio penaeicida* no crece en TCBS, y el crecimiento de *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii* y *Grimontia hollisae* (reclasificada de *Vibrio hollisae*) forman colonias muy pequeñas (Gómez-Gil y Roque, 2006).

### **Taxonomía de *Vibrio* sp.**

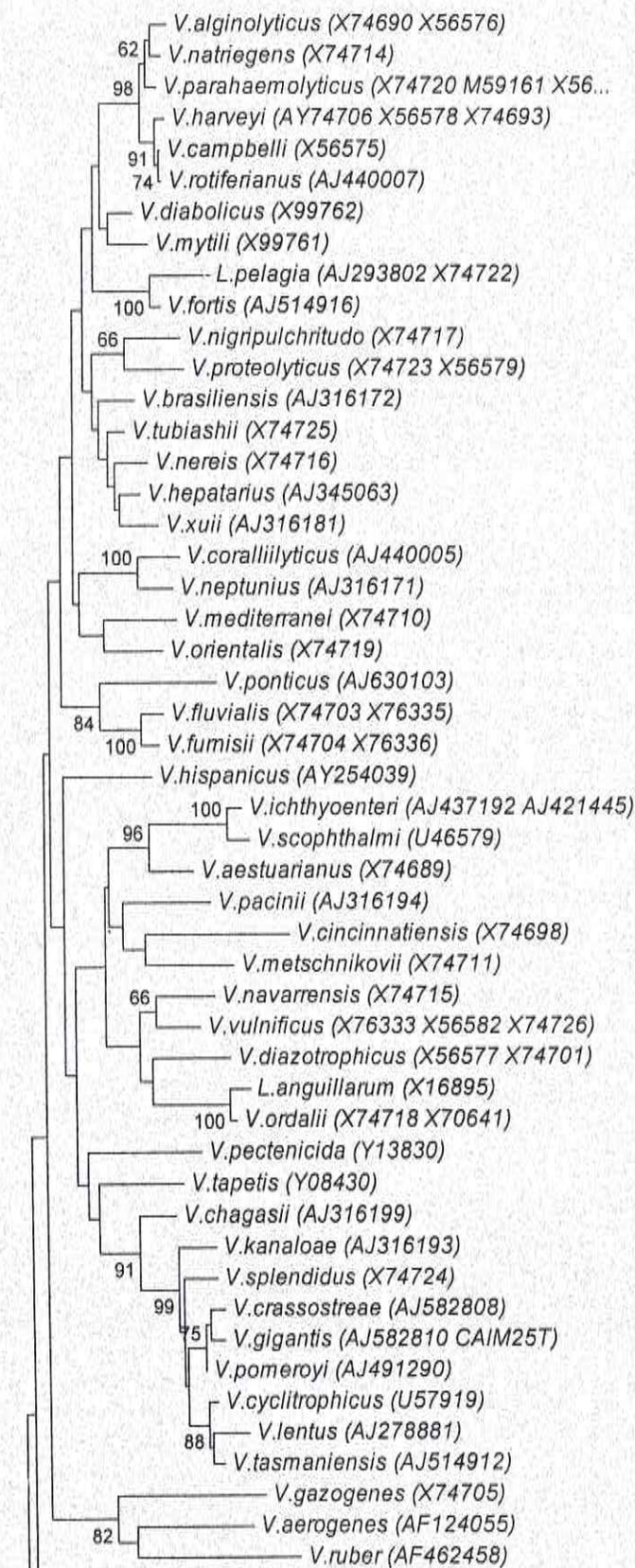
El impulso por clasificar organismos es ancestral, como lo es el deseo de tener una clasificación que refleje el "orden natural" (Doolittle, 1999).

En sus inicios, la taxonomía de procariontes se basaba principalmente en características morfológicas, que incluían: flagelos, morfología, curvatura de las células, y aspectos de cultivo. Estas características describieron muchas especies nuevas, pero su caracterización era poco confiable (Thompson y Swings, 2006).

En 1965, Zuckerkandl y Pauling (en Stackebrandt, 2006) introdujeron la poderosa idea de que las moléculas "documentan la historia de la evolución" o son "cronómetros moleculares" (Ludwig y Schleifer, 1999). Pocos años después, Colwell (1970), propuso una taxonomía polifásica que ensamblaba y asimilaba varios niveles de información, que incluía: la composición de nucleótidos ADN, homología ADN-ADN, mediciones de diferentes secuencias de ADN y pruebas fenotípicas (carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos, ácidos, alcoholes como fuente de carbón y/o energía, actividad enzimática, tolerancia a sales, luminiscencia, crecimiento a diferentes temperaturas y salinidades, antibiogramas y morfología). Esta propuesta estableció las bases firmes de la actual taxonomía.

Collwel en 1970, seleccionó el género *Vibrio* como modelo de estudio con el objetivo de establecer una taxonomía polifásica para este género. Los resultados de su estudio mostraron que cuando se integra cuidadosamente la información generada en todos los niveles que va de lo molecular a lo ecológico, esté podría proveer veracidad y precisión en la identificación y clasificación de las bacterias.

La secuenciación de "cronómetros moleculares", como los genes 5S y 16S rARN en la década de los 80's revolucionó la taxonomía. Actualmente, la columna vertebral de la taxonomía polifásica opera sobre el gen 16S rARN (Thompson y Swings, 2006). Bajo este criterio taxonómico la familia Vibrionaceae queda comprendida en nueve géneros de acuerdo a la "Lista de nombres de procariontes validos en nomenclatura" ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)): *Vibrio* (65 especies), *Catenococcus* (una especie), *Enterovibrio* (dos especies), *Grimontia* (una especie), *Listonella* (dos especies), *Photobacterium* (13 especies) y *Salinivibrio* (una especie) (figura 1).



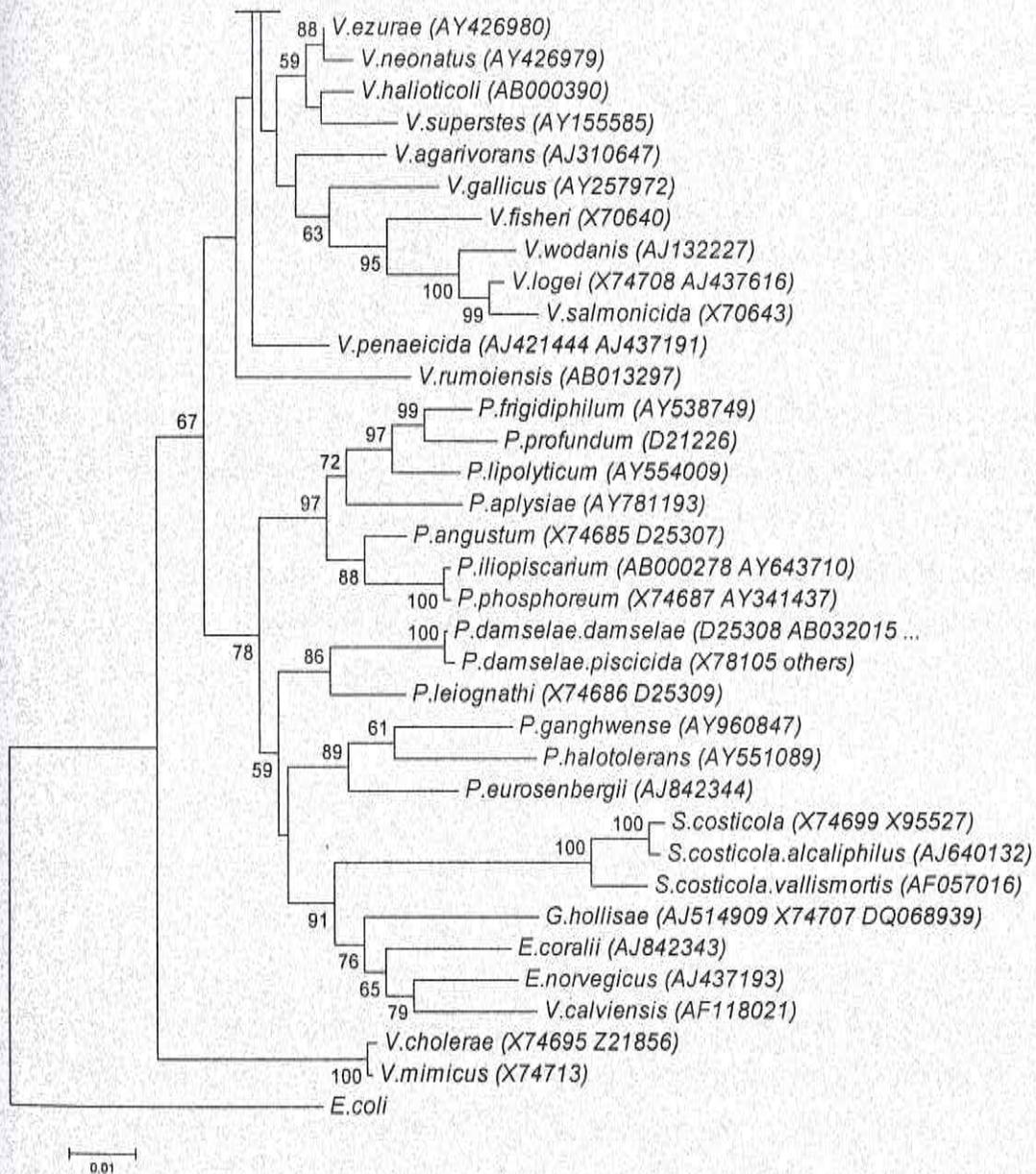


Figura 1.- Árbol filogenético de cepas tipo basado en el método del vecino más cercano (neighbor-joining), usando la secuencia completa del gen 16S rARN (~1500 pb) de las especies pertenecientes a la familia Vibrionaceae. La distancia fue obtenida empleando el modelo de Jukes y Cantor. Los porcentajes de similitud se muestran después de 1000 simulaciones. 0.01 divergencia estimada de la secuencia.

### Concepto de Especie Procariótica

El concepto *especie procariótica* se define como "una categoría que circunscribe un grupo genómicamente coherente de cepas/aislados individuales que comparten un alto grado de similitud en muchas pruebas independientes, comparativamente analizados bajo altas condiciones de estandarización" (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Stackebrandt *et al.*, 2002; Gevers *et al.*, 2005; Stackebrandt *et al.*, 2006).

Prácticamente, una especie procariótica es considerada como un grupo de cepas (incluyendo la cepa tipo) caracterizadas con cierto grado de consistencia fenotípica, además de que muestren  $\geq 70$  % de similitud ADN-ADN con  $\leq 5$  °C de  $\Delta T_m$  y una identidad mayor al 97 % de la secuencia del gen 16S rARN. Según el reporte del ad hoc comité para la re-evaluación de especies en bacteriología (Stackebrandt *et al.*, 2002).

### Técnicas Moleculares de Identificación Bacteriana

Las metodologías de tipificación molecular de bacterias constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. De estas metodologías se desprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más bacterias. De esta manera se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente, y por lo tanto, derivados recientes de un ancestro común. Así mismo, estas técnicas deben ser capaces de diferenciar aislados bacterianos no relacionados, independientemente de que pertenezcan a la misma especie o taxón.

La disponibilidad de técnicas de identificación bacteriana es bastante amplia. Las técnicas que ofrecen una resolución más específica son las que emplean el

genoma o parte de genoma bacteriano como base para la identificación (Olive y Bean, 1999; Thompson *et al.*, 2001; Gürtler y Mayall, 2001; Belkum *et al.*, 2001; Dvorská *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2004a). Los fundamentos de estas técnicas son variables: estudios de restricción del ADN cromosómico o extracromosómico; análisis del número de copias de determinadas secuencias de inserción o repetitivas a lo largo del cromosoma ó la amplificación arbitraria de fragmentos genéticos; entre otras. La mayor ventaja de estos métodos radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la disponibilidad de aplicarlos universalmente a distintos géneros y especies.

Actualmente, las técnicas más importantes de tipificación bacteriana son: ribotipificación, secuenciación de operón *rrn* (5S rARN, 16S rARN, 23S rARN y/o regiones intergenéticas), hibridación ADN-ADN, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), y técnicas basadas en PCR, como por ejemplo, amplificación de fragmentos polimórficos extensos (AFLP), amplificación al azar de polimorfismos (RAPD), amplificación de fragmentos repetitivos extragenéticos palindrómicos (rep), fragmentos de restricción polimórficos (RFLP), junto con electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y tipificación de secuencias multilocus (MLSA) (tabla 3), tienden a producir información necesaria sobre la estructura de la población de algunas especies de la familia Vibrionaceae y también proveen los medios de identificación de estos organismos.

Tabla 3.- Principales técnicas moleculares empleadas en la caracterización e identificación de procariontes.

Técnica	Gen blanco	Descripción
Hibridación ADN-ADN	Todo el genoma	Es la técnica estándar para la descripción de nuevas especies, si embargo, es costosa y poco reproducible.
Secuenciación rARN	Gen 16S rARN	La secuencia del gen 16S es ampliamente usada para determinar la posición filogenética de nuevos taxa. Es considerada como la técnica estándar en los análisis filogenéticos y en la delimitación de especies.
Ribotipificación	Operón rARN	Hibridiza genes del operón rARN como el 16S, 23S, 5S o regiones intergenéticas con sondas específicas, realizando una tipificación del ribosoma.
Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia	Gen 16S rARN	Hibridiza el gen 16S con sondas específicas y subsecuentemente se observan por microscopía epifluorescente.
MLSA	Genes conservados como 16S rARN, <i>gyrB</i> ó <i>rpoD</i>	Detecta cambios puntuales en las secuencias de genes "housekeeping", ocurrencia y portabilidad de información. Es una técnica fácil de realizar y es altamente reproducible.
RFLP	Genes conservados como 16S rARN, <i>gyrB</i> ó <i>rpoD</i>	Esta técnica amplifica por PCR genes conservados, de los cuales se obtiene un patrón de bandas empleando endonucleasas. Esta técnica tiene un bajo poder discriminatorio
RAPD	Todo el genoma	Amplifica por PCR fragmentos de ADN genómico usando iniciadores arbitrarios. Se ha demostrado que esta técnica es mas discriminatoria que RFLP y pero menos que AFLP y rep-PCR. Es poco reproducible y de difícil estandarización.
AFLP	Todo el genoma	Amplifica polimorfismos genéticos por PCR en el todo el genoma, los cuales son visualizados en geles de poliacrilamida como patrones de bandas. Tiene alto grado de reproducibilidad y poder discriminatorio.
rep-PCR	Todo el genoma	Amplifica fragmentos polimorficos en todo el genoma por PCR. Existen cuatro juegos de iniciadores: REP, ERIC, BOX y (GTG) <sub>5</sub> . Tiene alto poder discriminatorio y reproducibilidad. Es sencilla de estandarizar y realizar.

Hibridación ADN-ADN. Esta técnica es considerada como la estándar para la descripción de especies procarióticas.

La técnica de hibridación puede ser llevada a cabo con ADN extraído de la célula bacteriana o directamente sobre la célula fijada a una membrana. La reasociación de ADN-ADN se puede monitorear por espectrofotometría; midiendo la cinética de la hibridación, o bien, empleando isótopos marcados con elementos radioactivos (Kuninaga, 1996).

La astringencia de la reacción está determinada por la concentración de sales y formamida, por la temperatura y el porcentaje molar del contenido G+C de los ADN's empleados. La hibridación es comúnmente realizada bajo condiciones estandarizadas que no son las necesariamente óptimas para todos los ADN's bacterianos. Por lo general, las condiciones óptimas para la hibridación son estandarizadas en cada laboratorio y para cada organismo. La curva óptima de la temperatura para la alineación es amplia (alrededor de 5 °C). Como regla general, la hibridación requiere de una temperatura de 22 a 26 °C, por debajo de la temperatura de alineación. La temperatura de alineación ( $T_m$ ) es calculada por la concentración de sales y el índice base de ADN (Vandamme *et al.*, 1996).

La taxonomía de vibrios está basada en experimentos masivos de homologación de ADN. Diferentes grupos de especies fueron reconocidas sobre la base de su similitud ADN-ADN y la secuenciación del gen 16S rARN. Sin embargo, especies de cada uno de estos grupos también tienen genotipos muy similares. Gomez-Gil *et al.* (2003), demostraron que la secuencia del gen 16S rARN de *V. rotiferianus* es similar a *V. campbellii* (99.8 %) y *V. harveyi* (99.1 %), sin embargo, también se ha demostrado que estas tres especies pueden ser fácilmente diferenciadas por otras técnicas de tipificación como AFLP y rep-PCR (Gomez-Gil *et al.*, 2004).

La técnica de hibridación DNA-DNA es reconocida por muchos investigadores como la mejor técnica de identificación. Sin embargo, es costosa y poco reproducible en diferentes laboratorios, debido principalmente a su laboriosidad. Después de hibridación DNA-DNA, técnicas como AFLP y rep-PCR, muestran una mejor delineación de especies bacterianas. Sin embargo, REP-PCR es mucho más fácil de adaptar al laboratorio y el análisis de grandes colecciones es menos demandante que AFLP (Rademaker *et al.*, 2000).

La alta correlación observada entre estudios de hibridación DNA-DNA y análisis de REP-PCR y AFLP sugieren que estos métodos de tipificación genómica pueden funcionar como técnicas taxonómicas, independientemente del modelo estadístico empleado (Rademaker *et al.*, 2000; Rademaker y De Bruijn, 1997).

Secuenciación del operón rARN. Los complementos del operón *rrn* (5S, 16S y 23S rARN) y las regiones intergenéticas, son considerados como "cronómetros moleculares" debido a que son genes altamente conservados, sin embargo, también tienen regiones altamente variables que pueden discriminar especies entre géneros (Stackebrandt y Rainey 1995; Dvorská *et al.*, 2001). En las dos últimas décadas, estos "cronómetros moleculares" han reconstruido la filogenia bacteriana, también han sido empleados como marcadores taxonómicos para la identificación bacteriana (Thompson *et al.*, 2004a).

La secuenciación de 16S rARN es comúnmente empleada en análisis filogenéticos y usada en la identificación de patógenos clínicos y ambientales. La secuencia del gen 23S rARN es dos veces más grande que la del gen 16S rARN, y sin embargo, casi no es empleada, debido a que en muchos casos no ofrece información filogenética más detallada que la que ofrece la secuencia del gen 16S rARN, y por otro lado, debido a que la secuencia del 16S rARN es más empleada, las bases de datos para comparar secuencias del 23S rARN es mucho más pequeña que la del 16S rARN (Roselló-Mora y Amann, 2001).

La región intergenética 16S-23S rADN puede ser empleada en la tipificación de aislados, estudios de evolución y diversidad microbiana (Gürtler y Mayall, 2001). La figura 2 muestra la estructura secundaria de la molécula 16S rARN de *Escherichia coli*.

Los análisis comparativos de la secuencia del gen 16S rARN son extensamente usados para determinar la posición filogenética en nuevos aislados. Cepas que muestran una similitud menor al 97 % en la secuencia del gen 16S rARN de los taxa conocidos son considerados como una potencial nueva especie (Gevers *et al.*, 2001). Las regiones variables (entre 129 pb – 276 pb y 430 pb – 495 pb) son particularmente empleadas para resolver variación entre especies (Dvorská *et al.*, 2001).

MacDonell y Colwell (1985, en Thompson *et al.*, 2004a), analizaron el 5S rARN de la superfamilia I (Vibrionaceae y Enterobacteriaceae), concluyeron que *V. marinus*, *V. psychroerythrus* y *Aeromonas sp.* no eran miembros auténticos de Vibrionaceae y los colocaron dentro de otras familias. También propusieron la creación de dos nuevos géneros *Listonella* y *Shewanella*.

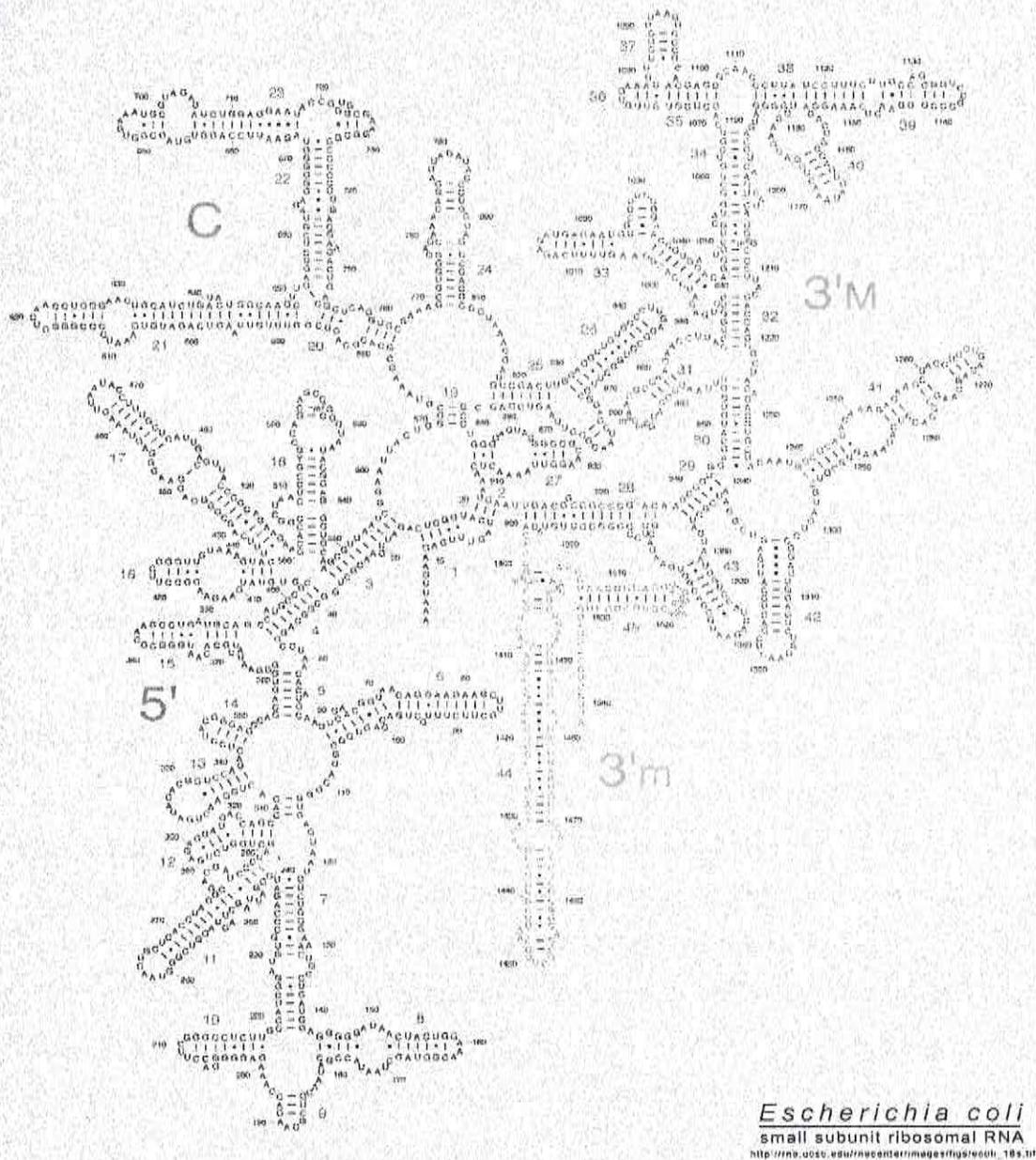


Figura 2.- Estructura secundaria de la molécula 16S rARN de *E. coli*.  
([http://rna.ucsc.edu/rnacenter/images/figs/ecoli\\_16s.tif](http://rna.ucsc.edu/rnacenter/images/figs/ecoli_16s.tif))

Ribotipificación. La ribotipificación consiste en cuatro pasos: (1) restricción del cromosoma bacteriano con endonucleasas, (2) electroforesis de los fragmentos resultantes, (3) transferencia de los fragmentos a una membrana y (4) hibridación del gel con una sonda marcada complementaria a el gen 16S rARN y/o 23S rARN (Thompson *et al.*, 2004). Desde la descripción de esta técnica se han presentado muchas variantes, pero el principio general sigue siendo el mismo. La técnica de marcaje de la sonda rARN puede variar, por ejemplo, se puede marcar sólo el 16S rARN o 23S rARN o ambos, con o sin regiones intergenéticas, o emplear oligonucleótidos de rARN conservados (Vandamme *et al.*, 1996).

La ribotipificación fue una de las primeras técnicas de tipificación que fue usada en la taxonomía de vibrios y esta fue empleada particularmente en el estudio de *V. cholerae* (Thompson *et al.*, 2004).

Hibridación *in situ* por fluorescencia. La aplicación de la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) es inherente al cultivo bacteriano, es decir, no es necesario hacer la purificación de los aislados en medios de cultivo selectivos. La extracción de ácidos nucleicos es seguida de la fijación de las células en papel filtro hibridizadas con sondas de oligonucleótidos marcados fluorescentemente que hibridizan el gen 16S rARN, posteriormente se realiza una visualización mediante microscopía de epifluorescencia (Thompson *et al.*, 2004a). Esta técnica provee eficientes resultados para la detección, identificación y cuantificación de comunidades bacterianas de diferentes muestras, incluidas las del género *Vibrio* (Hernández-Zárate y Olmos-Soto, 2006).

Hernández-Zárate y Olmos-Soto (2006), aplicaron FISH para la identificación de la diversidad bacteriana de *C. gigas*, sus resultados mostraron una alta diversidad bacteriana en *C. gigas*, con una mayor actividad de crecimiento en

branquias que en las glándulas digestivas o en la gónada. En el tejido branquial, las bacterias Gram positivas y  $\alpha$ -*Proteobacteria* representaron más del 95% de los grupos activos. Otros tejidos mostraron la presencia de grupos miembros de  $\alpha$ -, y  $\beta$ -*Proteobacterias*, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*

### **Técnicas Moleculares de Identificación Basadas en PCR**

Amplificación al azar de polimorfismos en el ADN. La técnica de amplificación al azar de polimorfismos (RAPD, por sus siglas en inglés) en el ADN es muy popular en la tipificación de genomas muy similares y a demostrado su utilidad en una gran variedad de organismos para diferentes aplicaciones (Brown, 2001). RAPD involucra la amplificación por PCR de fragmentos de ADN geonómico empleando iniciadores arbitrarios de 8 o 10 bases, los cuales hibridizan con suficiente afinidad a baja temperatura de alineación (Olive y Bean, 1999; Gürtler y Mayall, 2001). Esta técnica a sido empleada en tipificación de *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Thompson *et al.*, 2004a).

En comparación con otras técnicas, RAPD demostró ser más discriminatoria que el análisis de fragmentos de restricción polimórficos (RFLP, por sus siglas en inglés) y la región intergenética 16S-23S rARN, pero menos discriminatoria que rep-PCR. Por otro lado, la técnica RAPD carece de reproducibilidad y estandarización. Los iniciadores no están diseñados para un locus genético en particular, por lo que muchas de las amplificaciones son el resultado de una hibridación imperfecta entre el iniciador y el sitio blanco. De tal manera que el proceso de amplificación se hace extremadamente sensible a ligeros cambios en la temperatura de alineación, lo cual puede ser la principal causa de variabilidad en el patrón de bandas (Olive y Bean, 1999).

Fragmentos de restricción polimórficos (RFLP). El análisis de fragmentos de restricción polimórficos y el examen de los heterólogos puede ser aplicado en alelos variables de genomas de mamíferos. Recientemente, se ha demostrado que la restricción enzimática de cromosomas bacterianos provee de un método reproducible y sensible para la detección de pequeñas variaciones en la secuencia del ADN y para diferenciación de cepas bacterianas (Brown, 2001). Esta técnica de diferenciación se basa en la premisa de que el ADN de dos cepas bacterianas diferentes podrían tener secuencias de nucleótidos diferentes, de tal manera que la restricción con algunas enzimas, pueden producir diferentes mezclas de fragmentos (Brown, 2001). Estos fragmentos son separados en agarosa o en pequeños geles de poliacrilamida, con el objeto de visualizar los patrones de bandas producto de la digestión empleando una tinción con bromuro de etidio (Olive y Bean, 1999).

Urakawa *et al.* (1997), analizaron patrones de restricción del 16S rARN de 35 especies de la familia *Vibrionaceae*, esta técnica mostró ser útil para la clasificación e identificación de cepas de la familia *Vibrionaceae*. Un examen detallado de los datos presentados por estos autores revela que todos los grupos centrales de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. vulnificus* tienen el mismo patrón de bandas por lo que son indistinguibles con este método. Es notable que la similitud entre estas especies en la secuencia del 16S rARN es <96.5 %, lo demuestra claramente el bajo poder discriminatorio de esta técnica (Thompson *et al.*, 2004a).

Electroforesis de múltiples loci de enzimas y análisis mediante secuencias de múltiples loci. La electroforesis de enzimas multilocus (MLEE, por sus siglas en inglés) fue la primer técnica aplicada a la sistemática bacteriana en los 80's y fue la técnica estándar para los estudios de poblaciones genéticas e identificación (Thompson *et al.*, 2004a).

La técnica de tipificación mediante secuencias de multilocus (MLSA, por sus siglas en inglés) es una variación de MLEE, la cual es una poderosa herramienta en epidemiología. Ambas técnicas indexan la variación en los genes "housekeeping". MLSA asigna alelos directamente de las secuencias de los nucleótidos, mientras que MLEE compara la movilidad electroforética de las enzimas codificadas por estos genes. Es obvia la ventaja que MLSA tiene sobre MLEE, por ejemplo: alto poder discriminatorio por que detecta cambios puntuales y no puntuales en los genes "housekeeping", ocurrencia y portabilidad de la información, fácil de realizar y reproducibilidad (Thompson *et al.*, 2004a).

Beltrán *et al.* (1999) realizaron un análisis mediante MLEE de 397 cepas de *V. cholerae* aisladas en México y Guatemala, sus resultados sugieren que la transferencia horizontal y la recombinación son procesos importantes en la evolución de los complejos clonales que pueden persistir por décadas. Una alta diversidad genética, evaluada por MLEE de 15 loci de enzimas, fue observada entre 107 aislados diversos de *V. cholerae*. Estos aislados mostraron 99 patrones electroforéticos distintos y un gran número de alelos (2 a 7) por locus, pero no se observaron agrupaciones significantes entre serogrupos, biotipo o país de aislamiento.

Thompson y Swings (2006), mencionan que la imagen filogenética obtenida por "el estándar de oro" (secuenciación de gen 16S rARN) a confirmado y redefinido cronómetros evolutivos adicionales. Por ejemplo, el árbol filogenético basado en la unión de las secuencias de los genes 16S rARN y los genes "housekeeping" *rpoA*, *recA* y *pyrH* con un total de 3,324 nucleótidos, corroboran la creación de tres nuevas familias de vibrios. Los diferentes grupos de especies que forman con *V. harveyi* y con *V. splendidus* se distinguen en el árbol filogenético producido por 16S rARN que también se distinguen en la familia *Vibrionaceae*.

También se observa que las especies que forman el grupo de especies de *V. fischeri* se posicionan en los contornos de la familia *Vibrionaceae*. Los autores concluyen que MLSA realizado con los genes *rpoA*, *recA* y *pyrH*, proveen información suficiente para la demarcación de vibrios. Este tipo de información ofrece fácil accesibilidad, confiabilidad y una alternativa práctica al "estándar de oro" (hibridación ADN-ADN y secuenciación del gen 16S rARN) que puede ser aplicada a la taxonomía actual de vibrios.

Polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados. La técnica polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés) consiste en tres pasos: (1) digestión total del ADN geonómico con dos enzimas de restricción y la subsiguiente ligación de adaptadores específicos a los fragmentos de restricción, (2) amplificación selectiva de estos fragmentos con dos iniciadores de PCR que corresponden a las secuencias del sitio restringido y del adaptador como su sitio blanco, y (3) la separación por electroforesis de los productos de PCR en geles de poliacrilamida con detección selectiva de fragmentos que contienen iniciadores marcados fluorescentemente y el posterior análisis numérico del patrón de bandas empleando programas de computo (Savelkoul *et al.*, 1999; Thompson y Swings, 2006).

La técnica AFLP ha sido empleada en el estudio de vibrios: *V. cholerae* (Thompson *et al.*, 2004a), *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. rotiferianus* (Gómez-Gil *et al.*, 2004), *V. halioticoli* (Sawabe *et al.*, 2002). Thompson *et al.* (2001), analizaron 506 cepas de vibrios, incluyendo casi todas las especies de la familia *Vibrionaceae* (excepto: *V. lentus* y *V. cyclitrophicus*). El patrón de bandas producido por AFLP produjo  $102 \pm 24$  bandas, ya la reproducibilidad media de estos patrones fue  $91 \pm 3$  %. Este estudio culminó con la descripción de varias nuevas especies de vibrios.

Rademaker *et al.* (2000), compararon AFLP y rep-PCR contra hibridación ADN-ADN, empleando como modelo de estudio a bacterias del género *Xanthomonas*, los autores observaron una alta correlación de Person entre los estudios de homología de ADN con rep-PCR ( $r= 0.77$ ;  $P= 0.001$ ;  $n= 732$ ) y AFLP ( $r= 0.83$ ;  $P= 0.001$ ;  $n= 322$ ) y siguieron que estas técnicas de tipificación pueden ser empleadas en análisis de taxonomía polifásica, sin importar que modelo estadístico se utilice, debido a que reflejan el genotipo, filogenia y la relación taxonómica de *Xanthomonas*.

Los análisis por AFLP se han establecido como una técnica de genotipificación con un alto grado de reproducibilidad y poder discriminatorio. Pero esta técnica requiere de reactivos y protocolos estandarizados, así como, de colecciones y bases de datos de cepas internacionales para una mejor interpretación de los resultados (Savelkoul *et al.*, 1999).

Amplificación de fragmentos repetitivos palíndromos. El fundamento de las técnicas moleculares que analizan polimorfismos genéticos en bacterias es el análisis del número de copias de inserción o repetidas a lo largo del cromosoma (rep-PCR, por sus siglas en inglés), existen cuatro juegos de iniciadores BOX, ERIC, REP y (GTG)<sub>5</sub> (Versalovic *et al.*, 1991, Versalovic *et al.*, 1994)

Los elementos REP son secuencias de 38 pb que consisten en seis posiciones degeneradas y una variable "loop" de 5 pb a cada lado de una región palíndroma conservada (Stern *et al.*, 1984; en Olive y Bean, 1999). Las secuencias REP han sido descritas para diversas bacterias. La naturaleza palíndroma de los elementos REP y su habilidad para formar estructuras "stem-loop" tienen la función de realizar múltiples funciones altamente conservadas (Gilson *et al.*, 1984; en Olive y Bean, 1999).

El patrón de bandas generado por rep-PCR a partir de ADN bacteriano permite diferenciar a nivel especie, subespecie y cepa. Esta técnica es rápida de realizar y reproducible en el laboratorio, además de que puede ser aplicable a un gran número de aislados o a pocos aislados. Esta técnica es considerada como una de las que tienen mayor poder discriminatorio, anteponiéndose a otros métodos de tipificación como electroforesis de enzimas multilocus, caracterizaciones bioquímicas o ribotipificación, entre otras. Finalmente, muchos estudios han mostrado que rep-PCR tiene una buena correlación con los resultados por PFGE (Olive y Bean, 1999).

Secuencias pequeñas de nucleótidos pueden representar altas frecuencias repetitivas en la secuencia completa de genomas de procariontes (Versalovic *et al.*, 1994). Secuencias repetidas de trinucleótidos pueden representar largos elementos con lo cual también se encuentran altamente repetidas en el genoma bacteriano (Versalovic *et al.*, 1994). Doll *et al.* (1993), demostraron que el politrinucleótido (GTG)<sub>5</sub> se encuentra altamente repetido en el cromosoma bacteriano de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* en comparación a otros trinucleótidos como (GCC)<sub>5</sub>. Además, los autores mencionan que (GTG)<sub>5</sub> es una herramienta poderosa y ampliamente aplicable en investigaciones epidemiológicas, de estructura clonal y en poblaciones bacterianas.

Versalovic *et al.* (1994), decidieron probar el trinucleótido (GTG)<sub>5</sub> en un estudio de tipificación genómica de bacterias usando rep-PCR. Los autores demostraron que esta herramienta puede estimar el grado de similitud entre aislados y elucidar si los aislados tienen una relación clonal. El protocolo general para el empleo de esta tecnología para estudios de identificación y clasificación de bacterias o para estudios de epidemiología molecular de patógenos de humanos o plantas está descrito por Rademaker y De Bruijn en la siguiente dirección web <http://www.msu.edu/user/debruijn/dna1-4.htm>.

Rademaker *et al.* (2000), compararon AFLP y rep-PCR con estudios de homología de ADN-ADN empleando a *Xanthomonas* como modelo de estudio. Los autores concluyeron que rep-PCR y AFLP reflejan el genotipo, la filogenia y la relación taxonómica de los organismos, y proponen el empleo de esta técnica como un medio rápido de determinación de diversidad taxonómica y estructura filogenética, especialmente si se trata de colecciones de microorganismos grandes.

Wong y Lin (2001), diseñaron y evaluaron tres métodos de tipificación para *V. parahaemolyticus* basados en PCR usando iniciadores sobre la base de secuencias conservadas de regiones espaciadoras del ribosoma (RS, por sus siglas en inglés), REP y ERIC. Los resultados de estudio demostraron que la capacidad discriminativa de estas tres técnicas es muy cercana. Sin embargo, REP-PCR mostró patrones de bandas más reproducibles a los producidos por ERIC-PCR, mientras que RS-PCR, tiene una menor capacidad discriminativa que las anteriores, debido a que produjo pocos patrones de bandas.

Gomez-Gil *et al.* (2004), identificaron aislados relacionados a *V. harveyi* asociados con organismos acuáticos enfermos empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR y otras técnicas de tipificación molecular, los autores reportaron que la correlación de hibridación ADN-ADN entre los patrones de bandas generados por FAFLP y (GTG)<sub>5</sub>-PCR fueron por encima de 0.68 y estadísticamente significante, y recomiendan como el mejor método para identificar estas especies a rep-PCR (preferentemente (GTG)<sub>5</sub>-PCR) o FAFLP.

Gomez-Gil *et al.* (2006, en prensa), realizaron un trabajo de tipificación de vibrios presentes en pargos juveniles cultivados en jaulas flotantes y silvestres de cuatro regiones localizadas en el noroeste mexicano. El análisis se realizó empleando rep-PCR con el iniciador (GTG)<sub>5</sub>, y secuenciación parcial del gen 16S rARN. Los autores reconocieron la presencia de 12 especies de vibrios y

cuatro especies potenciales nuevas de vibrios por (GTG)<sub>5</sub>-PCR y secuenciación del 16S rARN, también identificaron 2 especies de *Photobacterium*.

### **Vibrios Asociados a *C. gigas***

A mediados de 1900, las publicaciones de MacArthur y Hutchinson incitaron el campo de la ecología en una intensa búsqueda y debate sobre el significado de la biodiversidad. Estos y otros trabajos afirmaron que la biodiversidad es una medida importante para los procesos ecológicos, tales como: partición de recursos, competencia, sucesión y productividad comunitaria, y así como también un indicador de la estabilidad de la comunidad (Morris, *et al.*, 2002).

Colwell, en los 70's realizó los primeros intentos en establecer una taxonomía polifásica de bacterias del género *Vibrio* aislado de ambientes naturales, empleando datos de genética molecular y distribución ecológica, los resultados de su estudio mostraron que la taxonomía numérica empleada provee una medida de similitud fenotípica en un nivel intra e inter específico del género *Vibrio* (Colwell, 1970).

De los primeros trabajos de biodiversidad de bacterias en ostión se destacan los realizados por Colwell y Liston a finales de los años 50's, donde el propósito de su estudio fue evaluar la composición bacteriana de *C. gigas* cultivado en la bahía de Washington bajo condiciones controladas. El estudio de identificación se realizó empleando técnicas de tipificación bioquímicas y fenotípicas. Los resultados de este estudio mostraron la presencia de *Pseudomonas/Vibrio* (en mayor cantidad), *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, entre otros grupos (Colwell y Liston, 1959).

Vasconcelos y Lee (1971), realizaron experimentos para conocer la flora bacteriana de la parte externa de *C. gigas* después de una exposición a luz UV,

las técnicas empleadas de tipificación fueron pruebas fenotípicas y bioquímicas, los resultados de sus trabajos muestran la presencia de *Flavobacterium/Cytophaga*, *Vibrio/Pseudomonas* tipo II, *Pseudomonas* tipo III o IV, *Acinetobacter/Moraxella*, cocos y bacilos Gram positivos.

Hernández-Zárate y Olmos-Soto (2006), realizaron una identificación de la diversidad bacteriana en *C. gigas* cultivado en la bahía de Todos Santos, México empleando hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) y PCR, utilizando sondas específicas para el gen 16S rADN/rARN para géneros y grupos específicas. Los autores confirmaron la presencia de bacterias miembros de grupos  $\alpha$ - y  $\beta$ - Proteobacterias, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.

Son muy pocos los trabajos que se han realizado para conocer la biodiversidad bacteriana en *C. gigas*, y casi todos los trabajos sólo se enfocan en la identificación a nivel de género. Esto por la poca resolución que ofrecen las técnicas de tipificación fenotípica y/o bioquímica y además, por la cercana relación de muchas de las especies bacterianas (Colwell, 1970).

### Áreas de Estudio

#### **Noroeste Mexicano**

En México, *C. gigas* se introdujo en 1973 en la bahía de San Quintín, Baja California, como resultado del plan de creación de los distritos de acuicultura promovidos por la Dirección de Acuicultura del Departamento de Pesca. En los 70's, el cultivo de ostión se amplió de manera importante en el noroeste del país, realizándose su cultivo en bahías y lagunas costeras de los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit (Bautista, 1989) y actualmente se están realizando esfuerzos por cultivarlo en Barra de Navidad, Jalisco (Gallo *et al.*, 2001). Los métodos de cultivo empleados son de fondo y

suspensión, según las características de cada una de las lagunas o bahías donde se practique dicha actividad.

Las expectativas de crecimiento de esta actividad, aunque promisorias, se han visto afectadas por la desorganización del sector, el cierre de las exportaciones del producto a mercados extranjeros debido a múltiples problemas de carácter administrativo, comercial, sanitario y recientemente a la presencia de mortalidades masivas (Cáceres-Martínez, 2003).

En 1997, se empezaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva de ostión, incluyendo semilla, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur, haciéndose patente la alarma del sector. En 1998, se realizaron tres reuniones de trabajo entre productores, autoridades acuícolas y académicos para tratar de determinar las causas de estas mortalidades, como resultado de estas reuniones se determinó que entre las posibles causas asociadas con estas mortalidades estaban: el aumento de la temperatura y condiciones ambientales propiciadas por el fenómeno del Niño en 1997 y 1998, presencia de toxinas producidas por microalgas u otros organismos marinos, contaminación, cantidad y calidad de alimento disponible, patógenos o la sinergia producida por la interacción de dos o mas de los factores antes mencionados (Cáceres-Martínez, 2003).

En la actualidad son muy pocos los trabajos que se han realizado para elucidar la causa de las mortalidades. Vázquez-Yeomans *et al.* (2004a) realizaron un análisis de microscopia electrónica en las branquias de ostiones enfermos, los autores encontraron la presencia de bacterias tipo bacilos y de un virus parecido al herpes. Con base en estos resultados, Vázquez-Yeomans *et al.* (2004b), realizaron un trabajo posterior, en el cual su objetivo fue aislar e identificar bacterias del tejido branquial de *C. gigas*, colectados durante un

episodio de mortalidad en Bahía Falsa, Baja California, los autores sólo pudieron aislar tres colonias bacterianas de los ostiones estudiados, de las cuales solo lograron identificar dos aislados como pertenecientes al género *Aeromonas*, empleando técnicas de identificación fisiológica y bioquímica. El tercero de los aislados no pudo ser identificado debido a su lento crecimiento.

El agente causal de las mortalidades en ostión aún es desconocido, aunque la mayoría de los estudios enfocados a determinar la causa de estas mortalidades refieren a las bacterias como los posibles agentes causales. Entre las principales enfermedades accionadas por bacterias en *C. gigas* destacan la vibriosis y nocordiosis (Colwell y Liston, 1959, Lacoste *et al.*, 2000, Bower *et al.*, 1994).

Recientemente, se realizó un trabajo para conocer la diversidad bacteriana de *C. gigas* cultivado en la bahía de Todos Santos, México, empleando FISH y PCR, en que se reporta como parte de la flora bacteriana de *C. gigas* a  $\alpha$ - y  $\beta$ -*Proteobacterias*, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* (Hernández-Zárate y Olmos-Soto, 2006). Los resultados de este trabajo confirman la precedencia de grupos cuyos miembros pueden ser patógenos importantes tanto para el recurso como para el consumidor.

#### **Delta del Ebro, Cataluña, España**

En Europa, *C. gigas* fue introducido en los parques de cultivo franceses, como especie sustitutiva y alternativa para la supervivencia del sector ostrícola, en primer lugar como sustitución de *Crassostrea angulata* y ante el deterioro del cultivo y mortalidades sucesivas de la ostra plana.

En España, la importación de semilla para su posterior engorde, se da en la década de los 70's, concentrándose particularmente en Galicia, con todos los

problemas que esto conlleva: introducción de fauna asociada, patógenos, entre otras. En la década de los 80's se empezó la producción de semilla española, sin embargo, esta producción no abastece la demanda, dándose, una importación de semilla incontrolada principalmente de otros países Europeos (Polanco y Corral, 2002a).

Actualmente Cataluña es una las principales provincias españolas productoras de moluscos bivalvos, siendo la región del Delta del Ebro la zona de cultivo de mayor producción (Polanco y Corral, 2002a).

El río Ebro es un río español que forma un delta en su desembocadura al sur de Cataluña en mar mediterráneo, su superficie territorial es de aproximadamente 350 km<sup>2</sup>, formando en la desembocadura dos hemideltas, y en cada una de ellas hay una bahía: Fangar al norte y Els Alfacs al sur. Ambas bahías son moderadamente eutróficas y, aunque aledañas, presentan diferencias importantes en extensión y profundidad (Montilla *et al.*, 1993).

El Delta del Ebro está rodeado por un área bastante poblada, principalmente en verano y sus aguas son usadas para recreación. En Alfacs la temperatura varia anualmente de 7 a 31 °C y la salinidad de 16 a 38 ‰ y en Fangar la temperatura a lo largo del año va de 6 a 30 °C y la salinidad de 21 a 38 ‰, finalmente, el pH de las aguas del delta es moderadamente alcalino. Estos factores fisicoquímicos son adecuados para el desarrollo de bacterias del género *Vibrio* (Montilla *et al.*, 1993; Montilla *et al.*, 1994). Por otro lado, las actividades humanas como la agricultura resultan en una disponibilidad de nutrientes orgánicos que permiten el crecimiento de microorganismos heterótrofos.

En el Delta del Ebro, la acuicultura y el marisqueo de bivalvos son de las actividades económicas de mayor importancia. Entre las especies explotadas se encuentran el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), la almeja (*Ruditapes*

*deccussatus* y *Ruditapes philippinarum*) y el ostión (*C. gigas*), realizándose en cultivo de engorde de este último en suspensión utilizando bateas fijas al fondo, de las cuales se cuelgas las sartas que tiene una longitud de aproximadamente 4 metros.

Como se mencionó anteriormente, el ecosistema del Delta del Ebro favorece la presencia y crecimiento de vibrios y son innegables los riesgos para la salud pública y para el desarrollo de dicha actividad en la zona (Montilla *et al.*, 1993).

La información sobre la presencia de vibrios asociados a bivalvos en esta región es escueta y solamente se encontraron dos estudios realizados por Montilla *et al.*, (1993, 1994) en los cuales los autores muestrearon las bahías de Alfacs y Fangar a lo largo de un año, identificando, cuando se pudo, los aislados bacterianos de vibrios a nivel de especie, la identificación en este estudio se realizó empleando técnicas fisiológicas, bioquímicas y moleculares (marcadores proteicos). Los resultados de ambos trabajos mostraron que se aislaron vibrios más frecuentemente en primavera, verano y otoño que en invierno. De 380 aislados, 310 fueron identificados como vibrios de los cuales sólo 14 no fueron identificados a especie. Los datos de este estudio indicaron una mayor presencia de bacterias en Alfacs que en Fangar debido posiblemente a la menor tasa de recambio del agua. Sin embargo, no se encontró ningún trabajo que reportara casos de mortalidad masiva en esta zona de cultivo, como ha sucedido en los últimos años en otras partes del mundo donde se cultiva *C. gigas*.

### **Legislación y situación actual**

La naturaleza biológica del ostión y los hábitos de consumo de este molusco, hacen de este alimento un vehículo importante en la transmisión de

enfermedades de origen microbiano, principalmente por bacterias *Vibrio*. Esto ha obligado a que las agencias encargadas de la vigilancia del manejo y procesamiento de los alimentos tomen medidas que exijan el cumplimiento de programas de inocuidad alimentaria para que se les permita su comercialización a nivel local, nacional e internacional (Cabanillas, 2005).

En México. La Secretaría de Salud ejerce el control sanitario de los moluscos bivalvos con fundamento en el artículo 39 de la ley Orgánica de la Administración Pública artículos 3, 14, 15, 16, 17 y 19 de la Ley Federal de Procedimientos Administrativos; los artículos 3º, apartado A, 21, 18 194 de la Ley General de Salud en materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Artículos 22 fracción III del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993, NOM-032-SSA1-1992, NOM-0129-SSA1-1995, NOM-128-SSA1-1994, NOM-127-SSA1-1994 y NOM-120-SSA1-194; así como las Bases de Coordinación firmados en cada Estado participante y al *Memorandum* de Entendimiento SSA-FDA el cual le confiere el marco legal al Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB) (SSA, 1999 en Cabanillas, 2005).

Los aspectos más importantes de la legislación mexicana en en cuanto a las especificaciones microbiológicas se encuentran en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la Pesca. Moluscos Bivalvos Frescos-Refrigerados y Congeladas.

<b>Especificaciones</b>	<b>Límite Máximo</b>
Mesofilicos aerobios	500 000 UFC/gr
Coliformes fecales	230 NMP/100 gr en carne
Salmonella sp. en 25 gr	Ausente
<i>Vibrio cholerae</i> toxigénico en 50 gr	Ausente

El área de de cultivo debe cumplir con las siguientes especificaciones microbiológicas (límites máximos): bacterias coliformes totales, la mediana de coliformes totales o del promedio geométrico del NMP de las muestras de agua, no debe exceder de 700 NMP/100 ml, muestras que para, bacterias coliformes fecales no debe de exceder de 88 NMP/100 ml.

Las áreas que rebasen los límites máximos serán consideradas como áreas no aptas para el desarrollo del cultivo de moluscos bivalvos.

A principios del 2001, la FDA estableció un ultimátum a la SSA en México para que cumpliera con una serie de compromisos necesarios para darle continuidad a las exportaciones de moluscos bivalvos, con el entendido de que al no cumplirse antes del 17 de Febrero, el programa de envíos se vería interrumpido tajantemente (FIS, 2001a en Cabanillas, 2005). Dado que no se dio cumplimiento al *Memorandum* de entendimiento con la FDA, el primero de Marzo del 2001, se cerró la frontera norteamericana para las exportaciones mexicanas. Aunque el cierre no se debió a la calidad sanitaria de las aguas, los productos o procesos, sino a las ausencias estrictamente administrativas del Gobierno Federal Mexicano, en particular de la Secretaría de Salud y la Subsecretaría de Pesca (FIS, 2001b en Cabanillas, 2005). Sin embargo, para el 2002 se cumplió con los requisitos demandados por la FDA y las exportaciones se reanudaron a partir de ese año (Cabanillas, 2005).

En España. El Diario Oficial de la Unión Europea menciona sobre la inocuidad de moluscos bivalvos en el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de Noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. En el inciso 2 del reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios, consideran que "Los productos alimenticios no deben contener microorganismos ni sus toxinas o metabolitos en cantidades

que supongan un riesgo inaceptable para la salud humana". El inciso 9 del mismo reglamento menciona que el Comité científico de medidas veterinarias relacionadas con la salud pública (SCVPH, por sus siglas en inglés) emitió un dictamen el 23 de Septiembre de 1999 sobre la evaluación de los criterios microbiológicos para los productos alimenticios de origen animal destinados al consumo humano. El comité recomienda que los criterios microbiológicos sean pertinentes y eficaces en la que se refiere a la salud de los consumidores. En el inciso 11, el SCVPH adoptó un dictamen sobre *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* los días 19 y 20 de Septiembre de 2001. El comité afirmaba que las pruebas científicas disponibles no apoyan el establecimiento de criterios específicos para los patógenos *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* en el pescado y el marisco. Recomendaba, sin embargo, que se establecieran los códigos de prácticas para garantizar la aplicación de buenas practicas de higiene. En el inciso 27, el comité menciona que "cuando los métodos analíticos estén suficientemente desarrollados, deberan establecerse criterios para los virus patógenos en los moluscos bivalvos vivos. Asimismo, es preciso elaboraar métodos fiables para otros riesgos microbianos, como el *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

## METODOLOGÍA

### Obtención de los Aislados Bacterianos

#### **Recuperación de los Aislados Bacterianos del Noroeste Mexicano**

Las cepas aisladas de *C. gigas* cultivado en el noroeste de México (Fig. 3), las cepas de *referencia*, así como, las cepas *tipo* para el género *Vibrio* (ver anexo 1), fueron proporcionadas por la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM, [www.ciad.mx/caim](http://www.ciad.mx/caim)) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, México.

Se realizaron tres muestreos en diversas granjas de producción de ostión *C. gigas* localizadas en noroeste mexicano durante los meses de: Noviembre del 2003, Febrero del 2004 y Septiembre del 2004. La metodología para la obtención de aislados bacterianos se encuentra descrita en el trabajo de Cabanillas (2005). En el mismo trabajo se menciona, que durante los muestreos se tomaron datos de temperatura y salinidad de las zonas de muestreo seleccionadas. Se menciona también que debido a que las condiciones ambientales de los meses de Noviembre 2003 y Septiembre de 2004 se registraron como el mismo dato, están registradas como de verano (tabla 4), mientras que las condiciones ambientales del mes de Febrero del 2004 como invierno (Cabanillas, 2005).

Todas las cepas aisladas de *C. gigas* cultivado en el noroeste mexicano, incluyendo las cepas tipo y de referencia, fueron recuperadas a partir de crioviales congelados (REVCO Scientific Inc. USA) a -70 ° C, sembrándose en caldo trypticasa de soya (TSB, Bioxon, México) con 2 % de cloruro de sodio

(NaCl) (Fermont, México) e incubadas (VWR scientific, EUA) a 30 °C durante 24 horas con agitación (IKA-VIBRAX-VXR, Cincinnati, EUA).

Tabla 4.- Sitios de muestreo de ostión en el noroeste mexicano (modificada de Cabanillas, 2005)

Clave*	Municipio	Granja/Empresa	Ubicación geográfica	Temperatura °C		Salinidad ‰	
				Ver.	Inv.	Ver.	Inv.
SIN	La Cruz de Eleta	Ostrícola Guevara S.A. de C.V.	23°52'56.16"N 106°55'47.77"W	29	21	34	31
SONI	Huatabampo	Ostrícola del Sol S.C. de R.L.	26°42'57.94"N 109°29'48.48"W	30	13	35	35
SONII	Bahía de Kino	Inst. de Acuicultura del Edo. de Sonora	28°49'2.35"N 111°55'6.42"W	29	12	37	35
SONIII	Caborca	S.C.P.P.E. Bahía de San Jorge, S.C.L.	30°58'17.53"N 113° 4'25.91"W	28	15	34	33
SONIV	Puerto Peñasco	Coop. Única de Mujeres	31°18'0.29"N 113°29'5.08"W	28	15	31	29
BCI	San Quintín	Agromarinos S.A. de C.V.	30°26'30.49"N 115°58'37.10"W	22	18	35	33
BCII	Ensenada	Sol Azul S.A. de C.V.	28° 7'39.74"N 114° 3'49.73"W	24	18	33	32
BCS	Mulegé	Sol Azul S.A. de C.V.	26°52'28.13"N 113°10'11.15"W	24	18	32	31

\* Clave para la identificación de cada granja o empresa ostrícola. Ver, Verano; Inv, Invierno

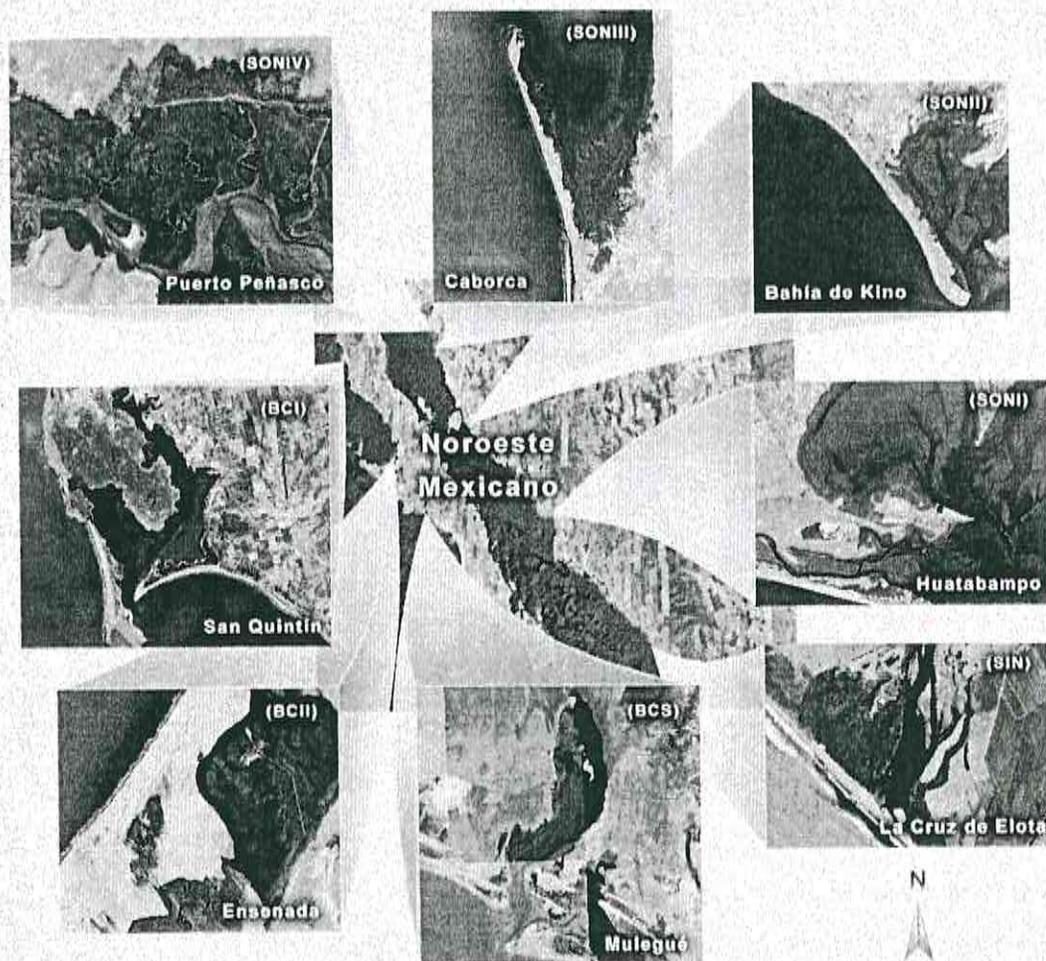


Figura 3 - Zonas de estudio en el noroeste mexicano. En cada imagen se menciona el municipio y entre paréntesis el nombre que se asignó a cada zona (imágenes tomadas de Google Earth)

### Muestreo en el Delta del Ebro

La otra fracción de cepas fue aislada de *C. gigas* cultivado en las bahías Alfacs y Fangar en el Delta del Ebro, provincia de Tarragona, Cataluña, España (Fig 4).

La bahía Alfacs (Fig. 5) se muestreó el 20 de Septiembre del 2005 y la bahía de Fangar el 4 de Octubre del mismo año, ver tabla 5. Durante los muestreos se registraron la temperatura y salinidad en cada zona de muestreo.

Tabla 5.- Sitios de muestreo de ostión en el Delta del Ebro.

Clave*	Bahía	Provincia	Ubicación geográfica	Temperatura °C	Salinidad ‰
ALF	Alfacs	Tarragona	40°37'3.41"N 0°38'0.99"E	22.4	32
FAN	Fangar	Tarragona	40°46'22.12"N 0°44'35.23"E	21.6	33

\* Clave para la identificación.

Se seleccionaron dos puntos de muestreo a lo largo de la "batería" de bateas, procurando obtener organismos de los extremos de la "batería" de bateas de las cuales se seleccionaron dos sargas de ostiones, de las que se obtuvieron 15 ostiones de superficie y 15 de fondo. Posteriormente, los ostiones fueron colocados en hieleras de plástico conteniendo placas de hielo para mantener una temperatura de 4 °C, donde fueron transportados al laboratorio de patología del centro de acuicultura, del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA, por sus siglas en catalán).

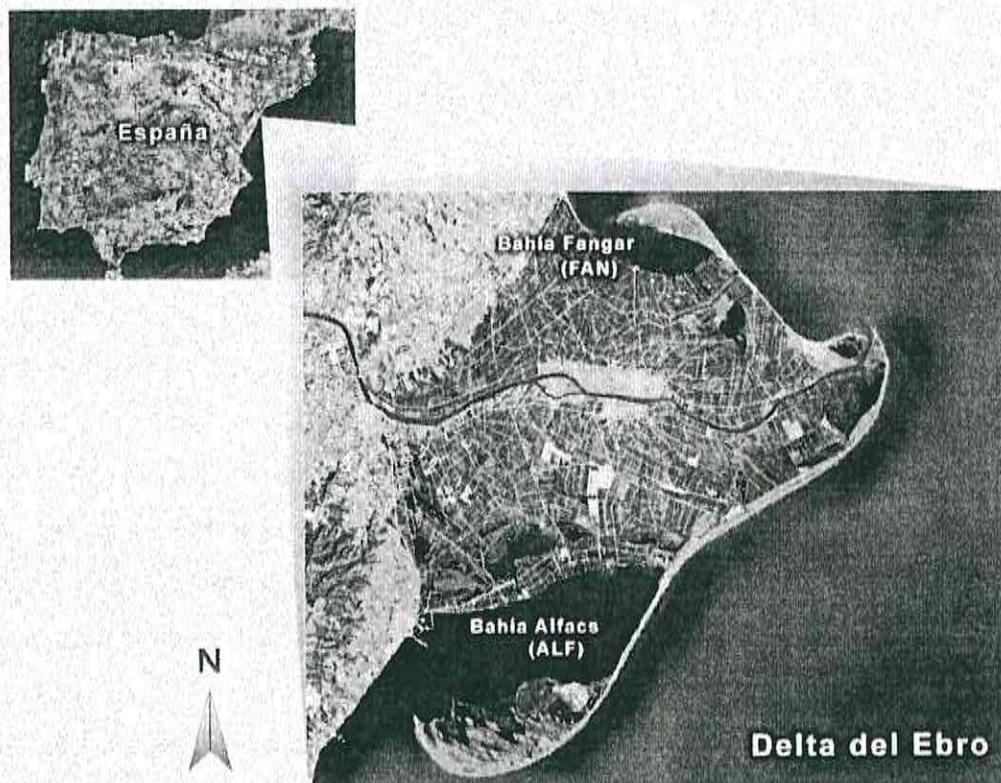


Figura 4.- Zonas de estudio en el delta del Ebro, entre paréntesis se menciona el nombre que se le asignó a cada zona (imagen tomada de Google Earth)

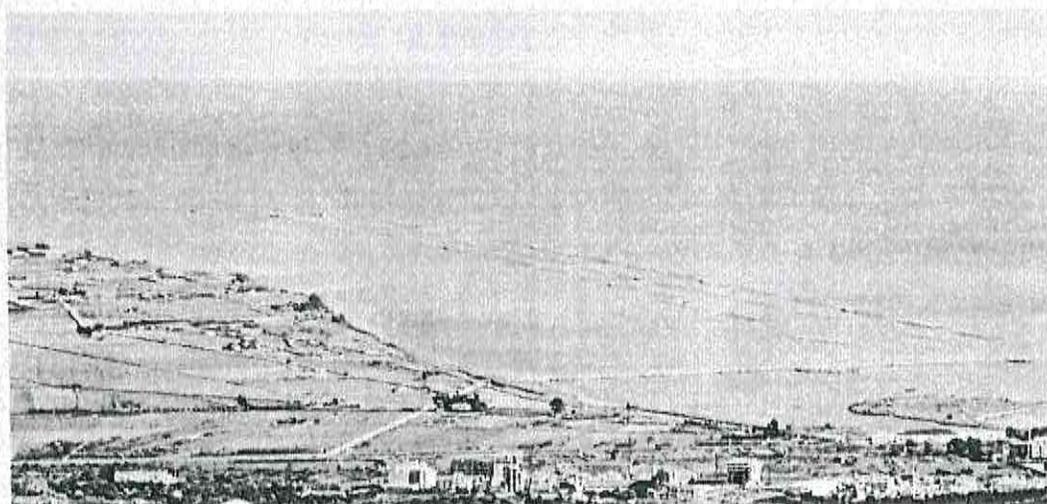


Figura 5.- Vista panorámica de la "batería" de bateas ostrícolas ubicadas en la bahía de Alfacas, delta del río Ebro, Cataluña, España

### **Obtención de Aislados de *C. gigas* Cultivado en el Delta del Ebro**

El mismo día de la colecta se procesaron los ostiones para obtener los aislados bacterianos. Se hicieron grupos de 15 ostiones de cada punto de muestreo formados por tres grupos de cinco individuos cada uno (figura 6).

Los ostiones fueron limpiados externamente (concha) y fueron colocados en las mismas hieleras de transporte a 4 °C, posteriormente, se abrieron con un cuchillo previamente esterilizado con flama, y se extrajo la pulpa y el líquido intervalvar de cada grupo de cinco ostiones. La pulpa y el líquido intervalvar de cada grupo de ostiones fueron colocados en un matraz para ser macerados. El matraz y el macerador de tejidos (Ultra-Turrax T25basic IKA®-WERKE) usado fue esterilizado previamente en cada macerado con etanol 70% y flama.

Posteriormente, se sembraron directamente 100 µl del macerado en agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS, Scharlau Microbiology), seguido de una dilución 1:10 en solución salina estéril al 2 % de cada grupo de ostiones; de la cual se tomaron 100 µl que se sembraron en agar TCBS, todas las placas de agar fueron incubadas (WTW-TS606H-i) a 30 °C durante 24 horas.

Transcurrido este periodo, se seleccionaron 20 colonias verdes y amarillas al azar de cada caja; incluyendo las de las diluciones. Cuando crecieron menos de 10 colonias en la dilución se tomaron todas las colonias para obtención de los aislados y cuando la obtención de colonias en la dilución fue mayor a 10 colonias, la selección de los aislados bacterianos fue a partir de la siembra directa y de la dilución.

Para la selección al azar de las colonias, cada placa se colocó sobre un contador de colonias cuadrulado (IUL Instruments, Colony Counter) y con la ayuda de una tabla de números al azar, se seleccionaron 20 colonias: 10 colonias de provenientes de la siembra directa y 10 colonias de la dilución respectiva. En total, se seleccionaron 240 colonias por cada zona de muestreo.

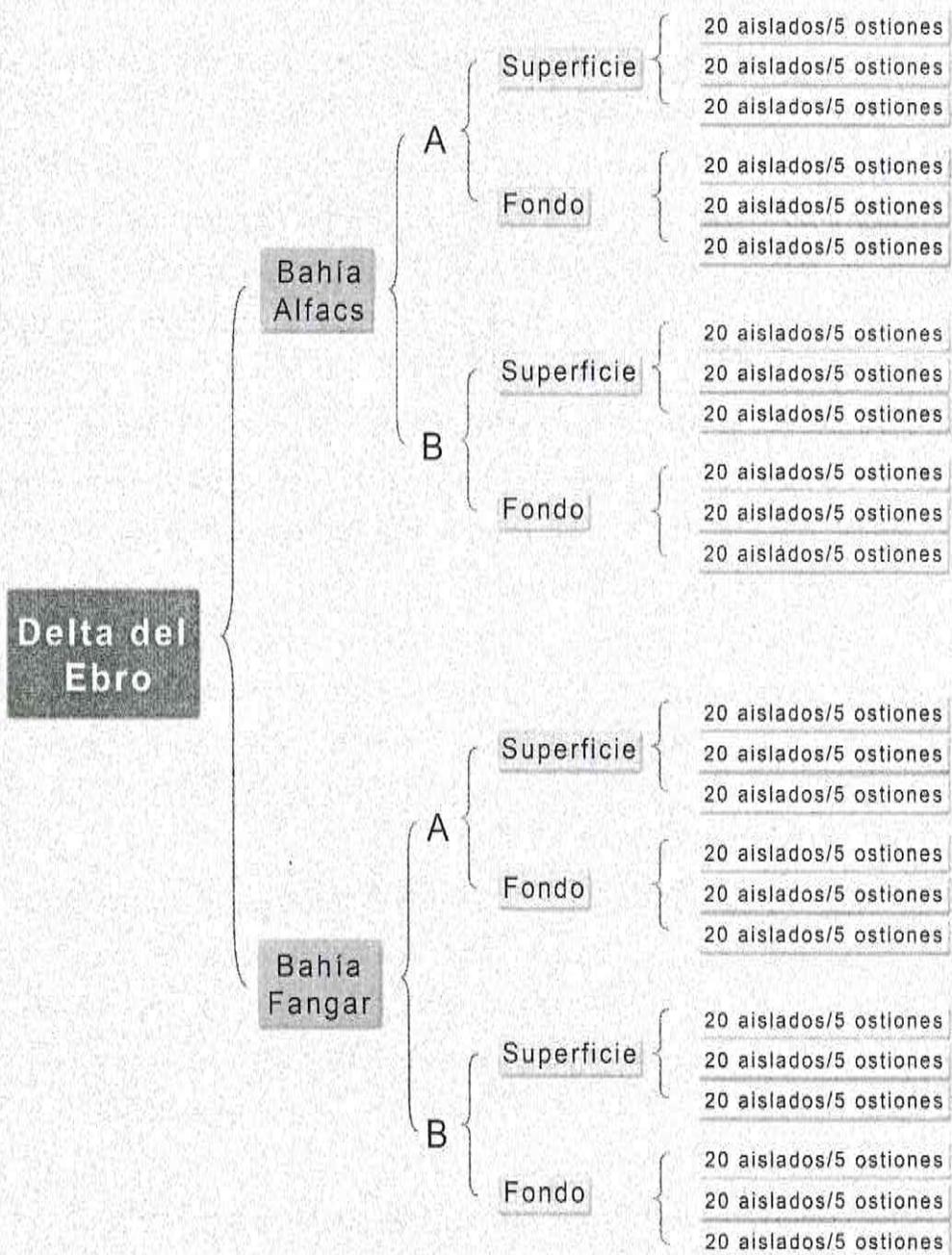


Figura 6. Diagrama de muestreo en el Delta del Ebro. A y B, son los puntos de muestreo a lo largo de toda la "batería" de bateas ostrícolas.

### **Purificación y Criopreservación de los Aislados**

La purificación de las colonias seleccionadas se realizó re-sembrando cada una de las colonias en agar TCBS e incubándose a 30 °C durante 48 horas. Posteriormente se analizó la pureza y uniformidad de las colonias con ayuda de un microscopio estereoscopio (SMZ800, Nikon), re-sembrando nuevamente los aislados potencialmente puros en agar TCBS e incubándose a 30 °C durante 24 horas, con el objeto de confirmar su pureza.

Los aislados fueron criopreservados, inoculando crioviales (Simport) conteniendo cuentas de vidrio, medio de cultivo caldo trypticasa de soya (TSB, Scharlau Microbiology), glicerol (Panreac) al 15 % y NaCl al 2%. Una vez inoculados los crioviales, éstos se agitaron en vortex (VWR Internacional) durante 20 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente les fue retirado el medio de cultivo a los crioviales con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Los crioviales se almacenaron (Ing. Climas, mod. GT 3782/80) a -80 °C.

Todos las cepas obtenidas en el delta del Ebro fueron enviadas vía aérea al laboratorio de bacteriología del CIAD, unidad Mazatlán, México, donde se re-analizó su pureza y posteriormente se ingresaron a la colección CAIM. El envío de las cepas se realizó en tubos de Eppendorf con agar TSA al 2 % NaCl y aceite mineral estéril.

La información completa de cada uno de los aislados obtenidos en el Delta del Ebro se encuentra en el anexo 2.

### Caracterización Genómica de los Aislados Bacterianos

#### **Caracterización por rep-PCR**

La técnica y algunos de los reactivos usados para la extracción y cuantificación de ADN fue la misma que se empleó en ambos laboratorios (Bacteriología/CIAD-Unidad Mazatlán y Patología/IRTA Unidad Acuicultura), sin embargo, el equipo varió en algunos casos. Las técnicas moleculares posteriores fueron realizadas en el laboratorio de Bacteriología/CIAD-Unidad Mazatlán

#### **Extracción de ADN**

Cada aislado se sembró en TSB (México; Bioxon, México. España; Sharlau Microbiology) al 2 % NaCl (México; Fermont, México. España; Panreac) incubándose a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente se extrajo 1.5 ml del cultivo bacteriano y se depositó en un tubo Eppendorf (Eppendorf), el cual se centrifugó (México; Heraeus, Biofuge Primo R, Germany. España; Jouan, MR22i) a 13 000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se desechó el sobrenadante y se agregaron 600 µl de solución de lisis nuclear (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA) resuspendiendo el pelet bacteriano con la ayuda de una pipeta estéril, después se dejaron incubar los tubos Eppendorf en un termoblock (México; VWR Scientific industries Inc. USA. España; LAB-LINE Multi-Block® Heater) a 80 °C durante 5 minutos, y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. En seguida, se agregaron 5 µl de solución RNasa para lisar (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA) las células bacterianas, invirtiendo el tubo Eppendorf de 2 a 5 veces, posteriormente se incubaron las tubos Eppendorf en baño maría (México; Felisa, México. España, VWR Instruments, mod. 1122S) a 37 °C durante 60 minutos dejándose enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se

agregaron 200  $\mu\text{l}$  de solución de precipitación proteica (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA) a cada tubo Eppendorf, se agitaron en vortex (México; VWR Vortex mixer, Scientific industries Inc. USA. España, VWR Internacional) a máxima velocidad durante 20 segundos y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 13 000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf conteniendo 600  $\mu\text{l}$  de isopropanol (Sigma) a temperatura ambiente, los tubos se mezclaron gentilmente hasta que se observó el pelet de ADN. Posteriormente se centrifugó a 13000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se agregaron 600  $\mu\text{l}$  de etanol al 70 % (Sigma) y se resuspendió en pelet, en seguida se centrifugó nuevamente a 13000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante.

Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agregó a cada tubo 30  $\mu\text{l}$  de solución de hibridación (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0), dejando re-hidratar el ADN durante toda la noche a 4 °C. La extracción de ADN se almacenó (México; Frigidaire, Costa Rica. España; LEIBHERR, Alemania) a -20 °C.

El ADN de cada aislado se ajustó a una concentración de 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ , con la ayuda de un espectrofotómetro (México, Samrtspec 3000, BIORAD. España, Spectrophotometer U-2001, HITACHI), diluyendo 5  $\mu\text{l}$  de ADN en 995  $\mu\text{l}$  de agua milliQ estéril (1:200), usando como blanco 1 ml de agua milliQ estéril, las lecturas de absorbancia se realizaron a una densidad óptica de 260 nm y 280 nm. Para ajustar la concentración de ADN a 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ , se tomó la lectura de la absorbancia, la cual se multiplicó por el factor de dilución (1:200) y por la concentración deseada (50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ). Una vez conocida la concentración de ADN en cada extracción se ajustaron con agua destilada ultra pura de 8 M $\Omega$  estéril todas las extracciones a 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . El ADN se almacenó a -20 °C.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa de Elementos Palindrómicos repetidos (rep-PCR)

La mezcla de rep-PCR se realizó bajo condiciones estériles y sobre una capa de hielo. En un tubo de Eppendorf de 0.2 ml se agregaron los siguientes reactivos: 10.6  $\mu\text{l}$  de buffer H/C (KCl 50 mM;  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM; Tris HCl pH 8.8 10 mM; Triton X-100 al 1 %; Wong y Lin, 2001), 0.1  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTP's (25 mM), 0.5  $\mu\text{l}$  de iniciador (GTG)<sub>5</sub> (0.3  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ , 5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'; Versalovic *et al.*, 1994; Gómez-Gil *et al.*, 2004), 0.2  $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ , Amplitaq; Applied Biosystems). Posteriormente se agregó 1  $\mu\text{l}$  de ADN (50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) procedente de las extracciones de los aislados bacterianos, el volumen final de cada reacción fue de 12.5  $\mu\text{l}$ . Este proceso se realizó para cada uno de los aislados, como control negativo se utilizó una mezcla sin ADN y como control positivo se empleo el ADN de las cepas CAIM 320<sup>T</sup> (*Vibrio harveyi*) y CAIM 513<sup>T</sup> (*Vibrio parahaemolyticus*).

El protocolo de rep-PCR en el termociclador (MyCycler™ Thermalcycler, BIO-RAD) fue 95 °C durante 7 minutos, seguido de 35 ciclos de 90 °C durante 30 segundos, 45 °C durante 1 minuto y 65 °C durante 3 minutos, con una temperatura de extensión final de 70 °C durante 10 minutos.

### Electroforesis

La amplificación de los productos de la reacción de rep-PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2.25 % (Grado analítico, Promega, USA) en buffer TAE 0.5X (800 ml de agua destilada, 96.8 gr de Tris-base, 22.8 ml de ácido acético glacial, 40 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0), cada reacción de PCR se mezcló con 2  $\mu\text{l}$  de buffer de carga (6X, 25 mg de azul de bromofenol; 4 gr de sacarosa; Promega, USA, se aforó a 10 ml con agua destilada estéril). Agregando 5  $\mu\text{l}$  de la solución en cada carril del gel; se utilizó 3  $\mu\text{l}$  del marcador de peso molecular

1 kb DNA 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Promega, USA) y como control para el análisis de cada gel de electroforesis se emplearon las muestras procedentes de las cepas CAIM 320<sup>T</sup> y CAIM 513<sup>T</sup>.

El gel se corrió en una cámara de electroforesis horizontal (E-C maxicell EC360M, USA) a 4 °C durante 18 horas con una fuente de poder (EPS 301, Amersham pharmacia biotech, USA) a 55 V. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (120  $\mu\text{l}$  de solución madre de 10 mg  $\text{ml}^{-1}$  en 1 L de TAE 0.5X) durante 30 minutos a temperatura ambiente, enjuagándose después con agua destilada a temperatura ambiente durante 15 minutos, el gel fue transportado a un fotodocumentador de longitud de onda corta (UVP 3.527, USA) donde se digitalizó e integró la imagen con el software LabWorks, Ver 4.0.0.8 (Media Cybernetics, LP), guardándose la imagen como archivo TIFF.

#### Análisis del Patrón de Bandas

Los patrones de bandas de cada cepa presentes en las imágenes obtenidas de la electroforesis de REP-PCR fueron analizados con el software GelCompar II Ver. 4.5 (Applied-Maths).

La similitud entre los patrones de bandas fue calculada empleando el coeficiente de similitud de Jaccard como lo propone Kosman y Leonard (2005). El dendrograma fue construido con el algoritmo de Ward (optimización 0.35, tolerancia de comparación de bandas 0.60 %).

Las cepas tipo y de referencia de prácticamente toda la familia Vibrionaceae fueron incorporadas en el análisis, así como muchas otras cepas aisladas de diferentes fuentes (artemia, salmón, mejillón, camarón, jaiba, almeja, coral, ostras, botete, pargo, rana, abulón, tiburón, rotíferos, hipocampo, sargazo,

microalga, algas marina, cangrejo, muestras clínicas, sedimento costero, agua marina, entre otras fuentes) (2,158 cepas), esta base de datos junto con todas las cepas tipo y referencia esta compuesta de casi todas las cepas de vibrios de la colección CAIM analizadas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR y se encuentra en el laboratorio de bacteriología del CIAD, unidad Mazatlán. Este extenso análisis permitió dejar para el final las cepas aisladas de ostión (presentadas en este trabajo) y las cepas tipo y de referencia relevantes a las cepas aisladas de ostión.

#### Secuenciación del Gen 16S rARN

Los clusters que no incluyeron cepas tipo y/o de referencia fueron analizados por secuenciación del gen 16S rARN, secuenciando cepas representativas de cada cluster.

Se realizó una extracción del ADN, la cual se ajustó a una concentración de 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  para cada aislado usando la metodología mencionada anteriormente.

#### **Amplificación por PCR del Gen 16S rDNA con Colas de M13**

En la secuenciación se emplearon tres juegos de iniciadores para amplificar el gen 16S rARN, cada juego de iniciadores amplifica aproximadamente 560 pb del gen (Fig. 7), también fueron agregadas colas de M13 (subrayado) para hacer una amplificación directa (sin clonar) (Gomez-Gil *et al.*, 2006, en prensa), los iniciadores empleados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.- Iniciadores empleados

Tercio	Iniciador	Segmento	Secuencia
1er tercio	M13F	4 pb	5' <u>CACGACGTTGTAGTAAAACGACGAGAGTTTGATCATGGCTCAG</u> 3'
	M13R	558 pb	5' <u>GGATAACAATTCACACAGGCTCGCACCCCTCCGTATTACC</u> 3'
2do tercio	M13F	502 pb	5' <u>CACGACGTTGTAAAACGACGCAGAGAAGAAGCACCGGCTAAC</u> 3'
	M13R	1100 pb	5' <u>GGATAACAATTCACACAGGCCCAACATTCACAACACGA</u> 3'
3ro tercio	M13F	977 pb	5' <u>CACGACGTTGTAAAACGACGCAACGCGAAGAACCTTACCT</u> 3'
	M13R	1520 pb	5' <u>GGATAACAATTCACACAGGGCTACCTTGTTACGACTTCACC</u> 3'

La secuencia M13 se muestra subrayada.

La mezcla de PCR se realizó bajo condiciones estériles y sobre una capa de hielo, en un tubo Eppendorf de 0.2 ml se agregaron los siguientes reactivos: 8.48  $\mu\text{l}$  de agua destilada ultrapura de 8 M $\Omega$  estéril, 0.75  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0.66  $\mu\text{l}$  de dNTP's 2.5 mM, 1.25  $\mu\text{l}$  de buffer 10X (Promega, USA); 0.13  $\mu\text{l}$  de cada iniciador 16S - M13 según el tercio del 16S rARN a amplificar (los iniciadores se observan en la tabla 5), 0.1  $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ , Amplitaq; Applied Biosystems). Posteriormente se agregó 1  $\mu\text{l}$  de ADN (50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) procedente de las extracciones de los aislados, el volumen final fue de 12.5  $\mu\text{l}$  para cada reacción. Este proceso se realizó para cada uno de los aislados que no se agruparon. Como control negativo se realizó una mezcla sin ADN.

El protocolo de la PCR en el termociclador fue 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minutos, con una temperatura de extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, se corrió un gel de agarosa al 2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente aplicando un voltaje de 90 V, esto con el objetivo de verificar la amplificación de gen 16S.

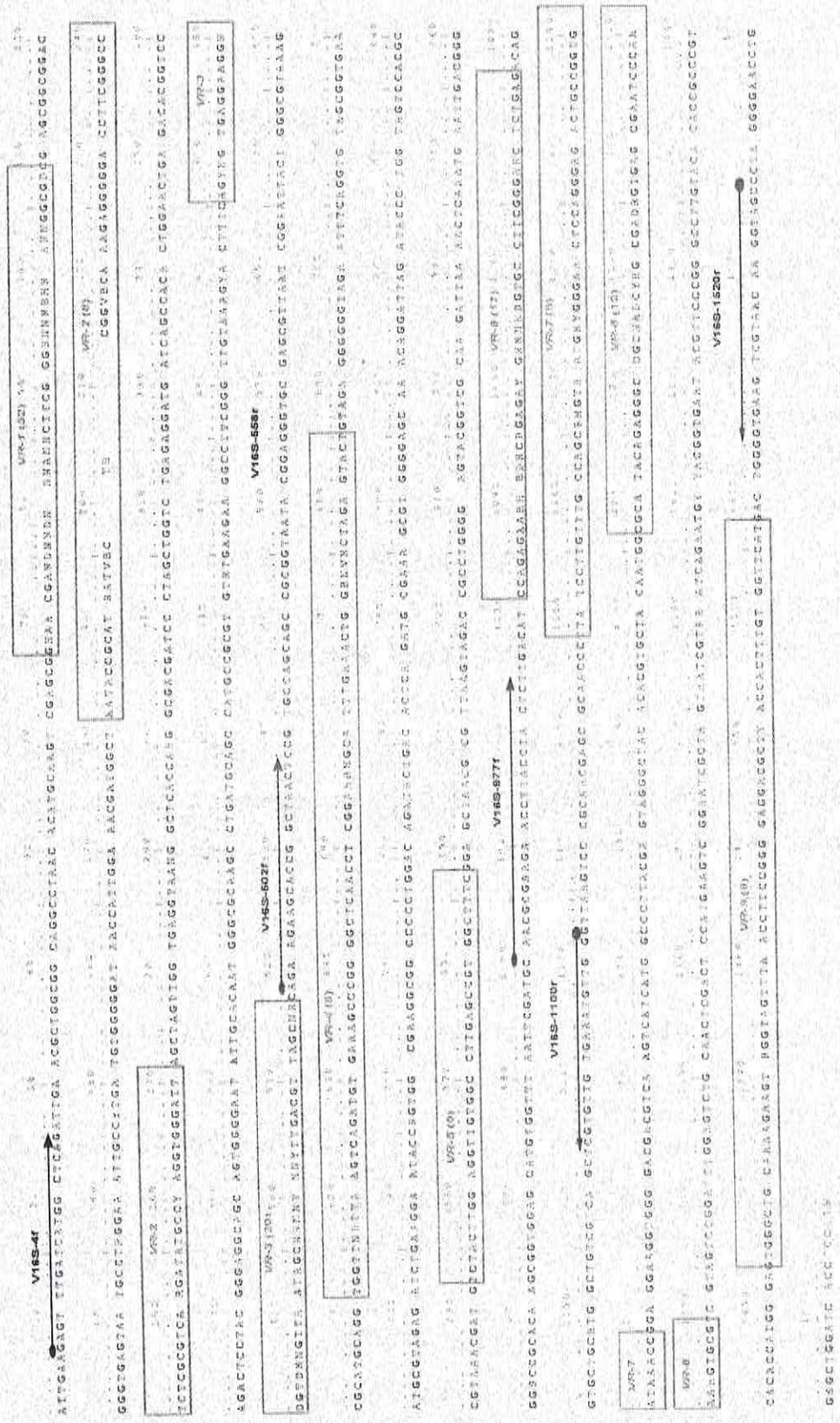


Figura 7.- Consenso del gen 16S rARN de 65 cepas tipo de *Vibrio*. Las flechas indican la región amplificada por cada juego de iniciadores. Las cajas muestran las regiones aproximadas de variabilidad.

### **Purificación del Producto de PCR**

Se realizó con el kit de purificación de Promega (Wizard® PCR Preps, DNA Purification System, USA), con el fin de obtener únicamente el producto de amplificación deseado, libre de los reactivos que quedaron de la PCR.

Se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de purificación directa al ADN amplificado se agitó en vortex a máxima velocidad. Posteriormente, se agregó 1 ml de resina y se agitó nuevamente en vortex 3 veces durante un minuto. En seguida, se ensambló la columna a una jeringa de 3 ml y se puso toda la solución dentro de la jeringa y se presionó el émbolo lentamente (recolectando el filtrado en un vaso de precipitado). Posteriormente, se agregaron 2 ml de isopropanol al 80 % y se presionó nuevamente el émbolo lentamente (gota a gota). Se paso la columna al tubo original (Eppendorf de 1.5 ml) y se centrifugó durante 2 minutos a 13 000 x g. Posteriormente, se pasó la columna a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml y se agregaron 20  $\mu$ l de agua destilada ultra pura de 8 M $\Omega$  estéril, se incubaron los tubos durante un minuto a temperatura ambiente, nuevamente se centrifugó durante un minuto a 13 000 x g. Por último, se corrió un gel de agarosa al 2 % a temperatura ambiente durante 30 minutos a 90 V, con el objetivo de verificar la presencia del producto purificado.

Los productos de PCR purificados se almacenaron a  $-20$  °C.

### **Reacción de Secuenciación**

Se realizó la reacción con el kit SequiTherm EXCELL II, DNA Sequencing kit-LC (Epicentre Technologies, USA).

La mezcla de PCR se realizó bajo condiciones estériles y sobre una capa de hielo, en un tubo Eppendorf de 0.2 ml se agregaron los siguientes reactivos: 3.4  $\mu$ l de agua destilada ultra pura de 8 M $\Omega$  estéril, 0.75  $\mu$ l de cada uno de los

iniciadores (M13 F 5'-CAC GAC GTT GTA AAA ACG AC-3') (M13 R 5'-GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3') (M13 1 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ), 3.6  $\mu\text{l}$  de buffer de secuenciación 3.5X, 0.5  $\mu\text{l}$  de enzima Excell II ADN (Epicentre Technologies, USA), 1  $\mu\text{l}$  de ADN. El total de cada muestra fue de 10  $\mu\text{l}$ , de los cuales se tomaron 8  $\mu\text{l}$  y fueron divididos en cuatro tubos Eppendorf de 0.2 ml, a cada tubo se le agregó 1  $\mu\text{l}$  de la mezcla de terminación (A, G, C, T), los tubos fueron colocados en el termociclador (PCR Express thermohybrid, UK) bajo las siguientes condiciones: 92 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 92 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos y un minuto a 72 °C.

Una vez finalizado este proceso se le agregó a cada tubo 1.5  $\mu\text{l}$  de solución "stop", posteriormente se desnaturalizó el ADN de cada muestra durante 3 minutos a 92 °C en el termociclador.

### **Secuenciación**

Al terminar la reacción se procedió a realizar la secuenciación (LI-COR IR<sup>2</sup>, LI-COR Nebraska, USA), los productos fueron separados en un gel de poliacrilamida (6.5% Gel Matrix KB plus; Li-cor biosciences, USA) y de 45 cm de largo y 0.25 mm de espesor, el cual se cargó agregando 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra en cada pozo del gel. Una vez obtenida la secuencia del gel esta fue analizada en dirección 5'- 3' con el software e-Seq DNA Secuencing, Versión 2.0 (LI-COR, Inc. Nebraska, USA).

### Pruebas Bioquímicas

Los aislados a las que se les realizaron las pruebas bioquímicas fueron aquellos que amplificaron de una a siete bandas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR, debido a se observó

durante este estudio que un patrón de pocas bandas dificulta la identificación de estas cepas.

Se realizaron cinco pruebas bioquímicas (tinción Gram, oxidasa, sensibilidad O/129, oxido-fermentación y motilidad) para la identificación de bacterias del género *Vibrio* bajo el supuesto que se presenta en la figura 8. Éstas cinco pruebas fenotípicas son las básicas que determinan a las especies pertenecientes al género *Vibrio*, según el manual para la determinación bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

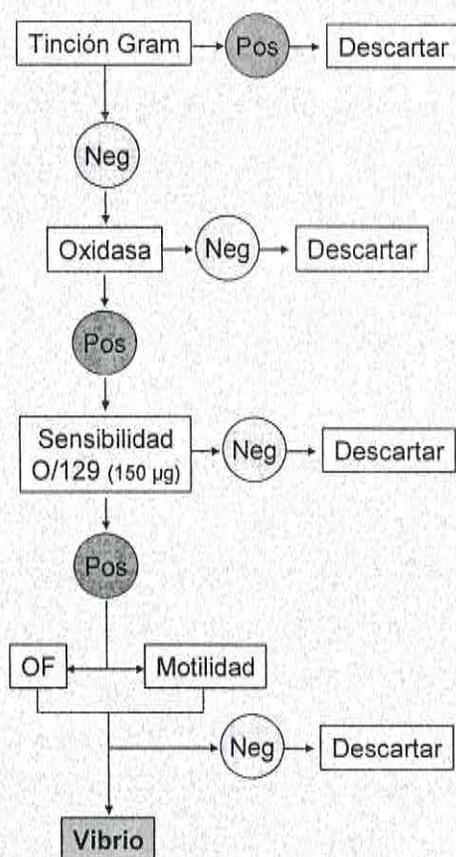


Figura 8.- Diagrama de flujo para la identificación fenotípica de bacterias pertenecientes al género *Vibrio*.

### **Tinción Gram**

La tinción Gram se realizó empleando el kit de tinción Gram (HYCEL de México).

Se realizó un frotis de los aislados en un portaobjetos limpio y se fijó con flama, posteriormente se agregaron unas de cristal violeta y se incubaron las laminillas durante un minuto, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se drenaron las laminillas, en seguida se agregaron unas gotas de yodo lugol y se incubó durante un minuto y se decoloró con etanol al 70 %, en seguida se enjuagó con agua corriente y se drenaron las laminillas, posteriormente, se agregaron unas gotas de safranina y se incubó durante 30 segundos, posteriormente se enjuagaron con agua corriente, se drenaron y secaron las laminas.

La visualización de la tinción se realizó con un microscopio de luz (Carl Zeiss, Axiolab drd KT) a 100X.

### **Oxidasa**

La prueba de oxidasa se realizó a los aislados que resultaron Gram negativo.

Se colocaron trozos de papel filtro en una caja de Petri, a cada trozo de papel se le agregó una gota de tetrametil-p-fenilediamina (sin HCl) (Aldrich Chemical CO., Milwaukee, USA). Posteriormente se agregó un poco de aislado bacteriano puro con una asa de siembra de platino estéril. Después de 10 segundos se observó el resultado, cuando se observó un color azul/púrpura en el papel filtro se consideró que el aislado tiene una oxidasa positiva. Las cepas que dieron negativo fueron descartadas de las posteriores pruebas.

### **Sensibilidad al Agente Vibrioestático O/129**

Se realizó la prueba de sensibilidad al agente vibrioestático O/129 (2,4-diamino-6,7-disopropilpeptiridina fosfato, Sigma) a los aislados que resultaron oxidasa positivos.

Se sembró el aislado en agar marino (extracto de levadura 1 gr, bactopectona 5 gr, cloruro férrico 1 gr, agar bacteriológico 15 gr, agua de mar 750 ml y agua destilada 250 ml; ajustar el pH a 7.5 antes de agregar el agar) al 2 % NaCl con ayuda de un hisopo estéril tratando de cubrir toda la superficie de la caja de petri. Posteriormente, se agregaron dos discos de papel filtro humedecidos con el agente vibrioestático O/129 a una concentración de 10 µg y 150 µg, respectivamente. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, se midió el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de ambas concentraciones.

Los aislados que no presentaron inhibición de crecimiento al agente vibrioestático O/129 al menos a 150 µg fueron descartadas de los posteriores análisis.

### Oxido-Fermentación (O-F)

Los aislados que fueron positivos a la sensibilidad del agente vibrioestático se les realizó la prueba de O-F empleando el método de Hugh y Leifson (MacFaddin, 1990).

Para la realización de la prueba O-F se preparó el medio Hugh y Leifson:

Peptona.....	2 gr
NaCl.....	25 gr
Fosfato de potasio.....	0.30 gr
Agar.....	3 gr
Azul de bromotimol.....	0.03-0.08 gr
Agua destilada.....	1000 ml

Después de disolver los ingredientes se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó el medio en autoclave a 110 °C durante 15 min. Posteriormente, se dejó enfriar el medio a 45 - 50 °C y se agregó glucosa estéril por filtración al 10 %. El medio

fue dispensado en tubos de ensaye estériles bajo condiciones de esterilidad (5 ml de medio por tubo) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente, los tubos con el medio Hugh y Leifson fueron inoculados con los aislados bacterianos que resultaron positivos al agente vibrioestático O/129 bajo condiciones de esterilidad. Inmediatamente se colocó un tapón de aceite mineral estéril a uno de los tubos inoculados procurando no producir ni dejar burbujas de aire, y se incubaron ambos a 30 °C durante 48 horas.

Dos tubos por duplicado fungieron como controles; el control positivo fue inoculado con la cepa tipo de *V. parahaemolyticus* (CAIM 350<sup>T</sup> = LMG 2850<sup>T</sup>) y un tubo sin inocular fungió como control negativo.

Interpretación de resultados: la oxidación y fermentación se observó en los tubos que produjeron ácido y mostraron color amarillo en los tubos, los organismos que no son oxidativos ni fermentativos no se observa un cambio de color en el tubo.

### **Motilidad**

La prueba de motilidad empleando el método de la gota colgante se realizó a aquellos aislados que fueron sensibles al agente vibrioestático O/129.

La motilidad se observó con la ayuda de un microscopio de luz (Carl Zeiss, Axiolab drd KT) a 40X. Se lavaron y esterilizaron portaobjetos a los cuales se le colocaron unas gotas de parafina derretida, inmediatamente se colocó una gota de solución salina estéril al 2 % inoculada con el aislado bacteriano en un cubreobjetos limpio e estéril. El cubreobjetos con la gota conteniendo la bacteria, se colocó cuidadosamente sobre la parafina en el portaobjetos. La motilidad de la bacteria se observó en el microscopio. Los vibrios tienen motilidad positiva.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de Aislados

Se obtuvieron 758 aislados bacterianos provenientes de ostión *C. gigas* cultivado en ocho granjas ostrícolas del noroeste mexicano y en cuatro bateas ostrícolas; dos en la bahía Alfacs y dos en la bahía Fangar, ambas bahías situadas en el delta del río Ebro, Cataluña, España (tabla 7).

Se recuperaron 327 aislados procedentes de ostiones cultivados en ocho granjas ostrícolas distribuidas en el noroeste mexicano, todos estos aislados se obtuvieron de la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM) del CIAD, Unidad Mazatlán, empleando agar TSA + 2 % de NaCl a 30 °C e incubado durante 24 horas. Los aislados obtenidos en cada granja se encuentran distribuidos de la siguiente manera: del estado de Sinaloa 59 aislados proceden de la granja Ostrícola Guevara S.A. de C.V. (SIN); del estado de Sonora, 53 aislados proceden de la granja Ostrícola del Sol S.C. de R.L. (SONI), 24 aislados del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora (SONII), 26 aislados de S.C.P.P.E. Bahía de San Jorge, S.C.L. (SONIII) y 29 aislados de Cooperativa Única de Mujeres (SONIV); del estado de Baja California; 47 aislados proceden de Agromarinos S.A. de C.V. (BCI) y 38 aislados de la empresa Sol Azul S.A. de C.V. (BCII); por último, 51 aislados proceden de la empresa Sol Azul S.A. de C.V. ubicada en el estado de Baja California Sur.

Del delta de Ebro se obtuvieron un total de 480 aislados bacterianos procedentes de ostiones cultivados en cuatro bateas ostrícolas; dos en la bahía Alfacs y dos en la bahía Fangar. De los cuales se logró purificar el 90 % de los aislados (431 aislados) a partir de agar TCBS; de las que corresponden 205

cepas aisladas de ostión cultivado en la bahía Alfacs (ALF) y 226 cepas de ostión cultivado en la bahía de Fangar (FAN).

Todos los aislados que se purificaron de ambas bahías del delta del Ebro se criopreservaron en medio de cultivo TSA más NaCl al 2 % y glicerol al 15 %, y se incluyeron en la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM) del CIAD, Unidad Mazatlán y se encuentran criopreservados en el IRTA.

Tabla 7.- Aislados de cada granja

Estado	Granja/Empresa	Clave*	Aislados	Temperatura °C		Salinidad ‰	
				Ver	Inv	Ver	Inv
Sinaloa	Ostrícola Guevara S.A. de C.V.	SIN	59	29	21	34	31
Sonora	Ostrícola del Sol S.C. de R.L.	SONI	53	30	13	32	31
	Inst. de Acuicultura del Edo. de Sonora	SONII	24	29	12	33	32
	S.C.P.P.E. Bahía de San Jorge, S.C.L.	SONIII	26	28	15	35	33
	Coop. Única de Mujeres	SONIV	29	28	15	31	29
Baja California	Agromarinos S.A. de C.V.	BCI	47	22	18	34	33
	Sol Azul S.A. de C.V.	BCII	38	24	18	37	35
Baja California Sur	Sol Azul S.A. de C.V.	BCS	51	24	18	35	34
Delta del Ebro	Bahía Alfacs	ALF	205	22.4**		32**	
	Bahía Fangar	FAN	226	21.6**		33**	

\* La clave será utilizada para referirse a la granja o empresa ostrícola.

\*\* Sólo se registró el verano.

Ver, parámetro registrado durante el verano.

Inv, parámetro registrado durante el invierno.

### Caracterización por (GTG)<sub>5</sub>-PCR

Todos los parámetros de la electroforesis fueron adaptados a las condiciones del laboratorio de Biología Molecular del CIAD, Unidad Mazatlán, debido a que la reproducibilidad del patrón de bandas es uno de los pasos críticos en la caracterización por rep-PCR (Rademaker y De Bruijn, 1997).

La reproducibilidad del patrón de bandas generado por (GTG)<sub>5</sub>-PCR fue controlado por la inclusión dos cepas tipo *V. parahaemolyticus* (CAIM 350<sup>T</sup> = LMG 2850<sup>T</sup>) y *V. harveyi* (CAIM 513<sup>T</sup> = LMG 4044<sup>T</sup>) en cada reacción de PCR y en cada electroforesis (Fig. 9), la similitud de los patrones de bandas de los genomas de estas especies fue >80 % en cada reacción de PCR. Los resultados de este estudio y otros estudios (Versalovic *et al.*, 1994; Healy *et al.*, 2005; Rademaker y De Bruijn, 1997) demuestran que la reproducibilidad del patrón de bandas no se ve afectada por el técnico o por las condiciones del laboratorio una vez que la técnica de rep-PCR ha sido estandarizada.

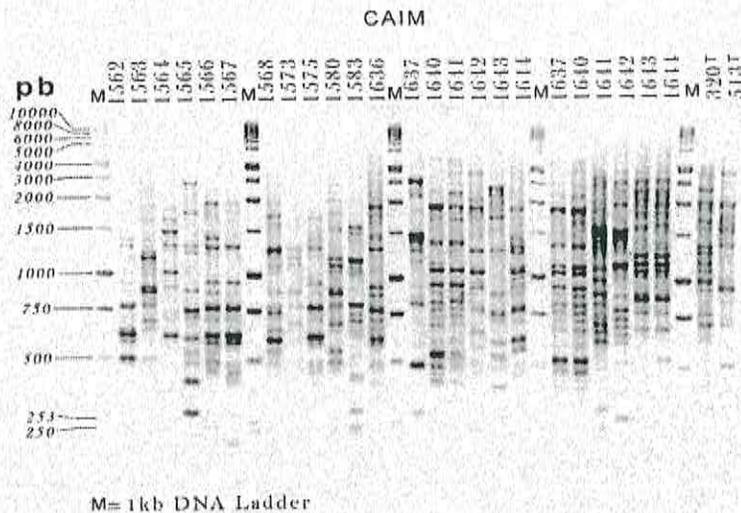


Figura 9. Gel de electroforesis producido por (GTG)<sub>5</sub>-PCR (2.25 % en buffer TAE 0.5X). pb, escala del tamaño de las bandas en pares de bases. Las cepas CAIM 320<sup>T</sup> y CAIM 513<sup>T</sup> fueron empleadas como controles para la reproducibilidad de las bandas.

### Análisis del Patrón de Bandas Generado por (GTG)<sub>5</sub>-PCR

Este análisis solamente incluyó las cepas identificadas a nivel especie como miembros de la familia Vibrionaceae (Fig.10). (GTG)<sub>5</sub>-PCR produjo un número de bandas promedio de 19.8 (n= 639, Des. Est.= 4.69, Máx. 37 y Mín. 9), con un tamaño promedio de 1,414.48 pares de bases (pb) (n= 12,628, Des. Est.= 868.33, Máx. 6,900 y Mín. 248) para las cepas aisladas de ostión analizadas en este estudio. Del análisis se excluyeron las cepas que mostraron menos de ocho bandas, debido a que el análisis se dificultaba, por otro lado, pruebas bioquímicas demostraron que muchas de estas cepas resultaron ser Gram positivas (ver resultados de pruebas bioquímicas en este trabajo). Versalovic *et al.* (1994), recomiendan que del análisis se excluyan las cepas que amplificaron un mínimo de ocho bandas por muestra (o cepa) para que el análisis comparativo del patrón de bandas sea eficiente, debido a sus estudios de caracterización bacteriana empleando REP-PCR han mostrado una mayor dificultad al identificar estas cepas.

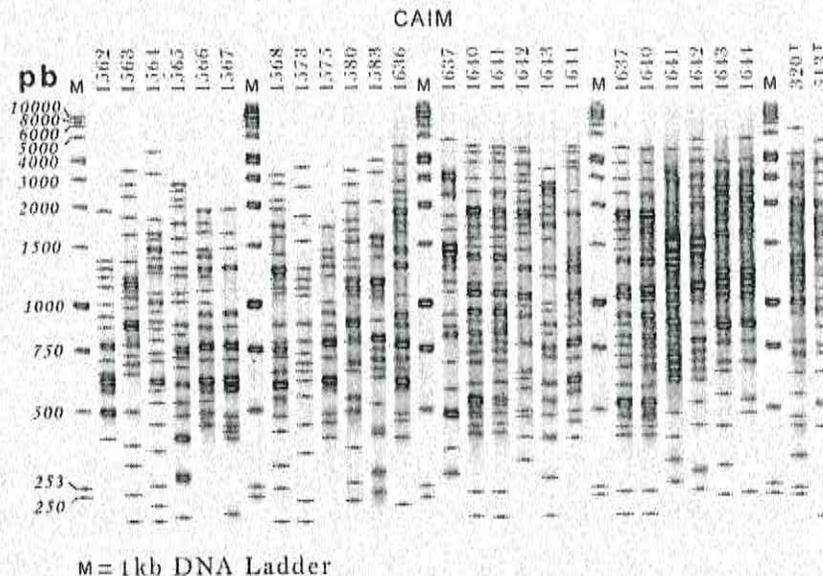


Figura 10.- Análisis del patrón de bandas empleando el software GelCompar II Ver. 4.5. pb, escala del tamaño de las bandas en pares de bases. Las cepas CAIM 320<sup>T</sup> y CAIM 513<sup>T</sup> fueron empleadas como controles para la reproducibilidad de las bandas.

Usando (GTG)<sub>5</sub>-PCR, Gevers *et al.* (2001), tipificaron especies de *Lactobacillus* obteniendo en promedio 15.5 bandas (n= 39).

Gomez-Gil *et al.* (2004), reportaron que (GTG)<sub>5</sub>-PCR produjo un promedio de 24.1 bandas (n= 49) con un peso promedio de 1,414 pb (n= 49) cuando tipificaron *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. rotiferianus*. En éste estudio estas mismas especies mostraron un promedio de 20.8 bandas (n= 230) con un peso promedio de 1,387 pb (n= 4,784 pb), resultado más consistente con el obtenido de todas las especies de vibrios reportadas en este estudio. Gomez-Gil *et al.* (2004), mencionan que los resultados del análisis del cluster producido por (GTG)<sub>5</sub>-PCR son muy similares a los producidos por AFLP, sin embargo, AFLP generó un promedio de 102 bandas con un peso promedio de 215 pb. Algunos autores han propuesto que AFLP y (GTG)<sub>5</sub>-PCR son métodos alternativos a la hibridación ADN-ADN para la delineación de especies (Rademaker *et al.*, 2000; Gomez-Gil *et al.*, 2004).

### Número de Bandas por Especie y Zona

Se realizó un análisis que incluyó los promedios y tamaños de cada uno de los patrones de bandas generados por (GTG)<sub>5</sub>-PCR por especie identificada y por zona de estudio. El objetivo de este análisis fue el de conocer el número y el tamaño de las bandas que produce (GTG)<sub>5</sub> para cada una de las especies identificadas y para cada zona de estudio.

Análisis del número y tamaño de bandas por especie. El análisis estadístico sólo incluyó 17 especies de las identificadas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR, excluyendo a *P. damsela*, *V. brasiliensis*, *V. coralliilyticus*, *V. xuii* y *Vibrio* sp. nov. 4, debido a que el número de cepas que se identificaron por (GTG)<sub>5</sub>-PCR para cada una de estas especies es menor o igual a dos cepas (tabla 8).

Tabla 8.- Análisis del patrón de bandas generado por (GTG)<sub>5</sub>-PCR por especie.

Especies*	Número de bandas					Tamaño de bandas (pb)				
	Promedio	n	$\sigma$	Máx.	Mín.	Promedio	n	$\sigma$	Máx.	Mín.
<i>Photobacterium sp. nov. 1</i>	18.3	4	2.22	20	15	1,538.2	72	854.77	4,550	432
<i>V. alginolyticus</i>	18.6	40	3.50	29	14	1,452.0	742	913.25	5,880	249
<i>V. campbellii</i>	19.8	52	5.47	34	10	1,396.0	1025	858.70	4,670	248
<i>V. chagasii</i>	18.2	214	4.54	30	9	1,443.7	3892	858.96	6,000	248
<i>V. cyclotrophicus</i>	20.9	9	3.82	27	17	1,404.0	188	975.69	5,150	259
<i>V. fortis</i>	17.1	17	4.61	24	10	1,442.9	291	776.04	3,453	249
<i>V. harveyi</i>	20.5	65	4.12	34	11	1,556.2	1325	954.22	4,570	248
<i>V. gigantis</i>	20.4	10	4.49	27	16	1,350.7	205	802.08	4,360	259
<i>V. mediterranei</i>	21.5	45	4.56	37	15	1,407.8	968	878.14	6,900	249
<i>V. neptunius</i>	20.3	7	4.61	25	11	1,470.1	142	834.04	3,915	278
<i>V. parahaemolyticus</i>	23.7	7	4.57	30	16	1,462.3	166	949.25	4,070	248
<i>V. ponticus</i>	21.3	6	3.08	24	16	1,358.2	128	818.52	3,989	250
<i>V. rotiferianus</i>	21.6	113	4.68	32	12	1,403.3	2434	898.51	5,640	248
<i>V. splendidus</i>	18.7	3	3.21	21	15	1,038.5	56	667.94	2,837	258
<i>Vibrio sp. nov. 1</i>	21.9	31	3.51	30	14	1,387.8	680	882.85	5,920	248
<i>Vibrio sp. nov. 5</i>	19.3	3	0.58	20	19	1,223.5	58	829.22	4,940	305
<i>Vibrio sp. nov. 6</i>	18.0	6	4.77	26	12	1,455.0	108	783.17	4,320	260
<i>P. damsela</i>	19.5	2	3.54	22	17	1,115.8	39	594.00	2,329	263
<i>V. brasiliensis</i>	25.0	2	1.41	26	24	1,376.0	50	959.42	4,420	249
<i>V. coralliilyticus</i>	22.0	1	--	--	--	1,784.2	22	972.08	3,700	291
<i>Vibrio sp. nov. 4</i>	16.0	1	--	--	--	1,047.8	16	534.47	2,174	269

\*Se excluyó del análisis estadístico a *P. damsela*, *V. brasiliensis*, *V. coralliilyticus*, *V. xuii* y *Vibrio sp. nov. 4*; debido que sólo se identificaron dos o menos genotipos de cada una de estas especies.

Debido a que los datos no pasaron la prueba de Normalidad, el análisis de la variación del número y tamaño de las bandas por especie se realizó empleando el método de Kruskal-Wallis, utilizando comparaciones pareadas por el método de Dunn, el software empleado fue GraphPad Prism Ver. 4.0.

La prueba de Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas en el análisis del promedio del número de bandas por especie ( $H= 68.6$ ,  $P<0.0001$ ,  $n= 731$ ) (Fig. 11). Se encontró que *V. splendidus* ( $n= 3$ ) es significativamente diferente a *V. rotiferianus* ( $n= 113$ ) (Dunn,  $P< 0.05$ ). También se encontraron diferencias significativas entre *V. chagasii* ( $n= 214$ ) contra *V. rotiferianus* ( $n= 113$ ), *V. mediterranei* ( $n= 45$ ) y *Vibrio sp. nov. 1* ( $n= 31$ ) (Dunn,  $P< 0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en el resto de las especies.

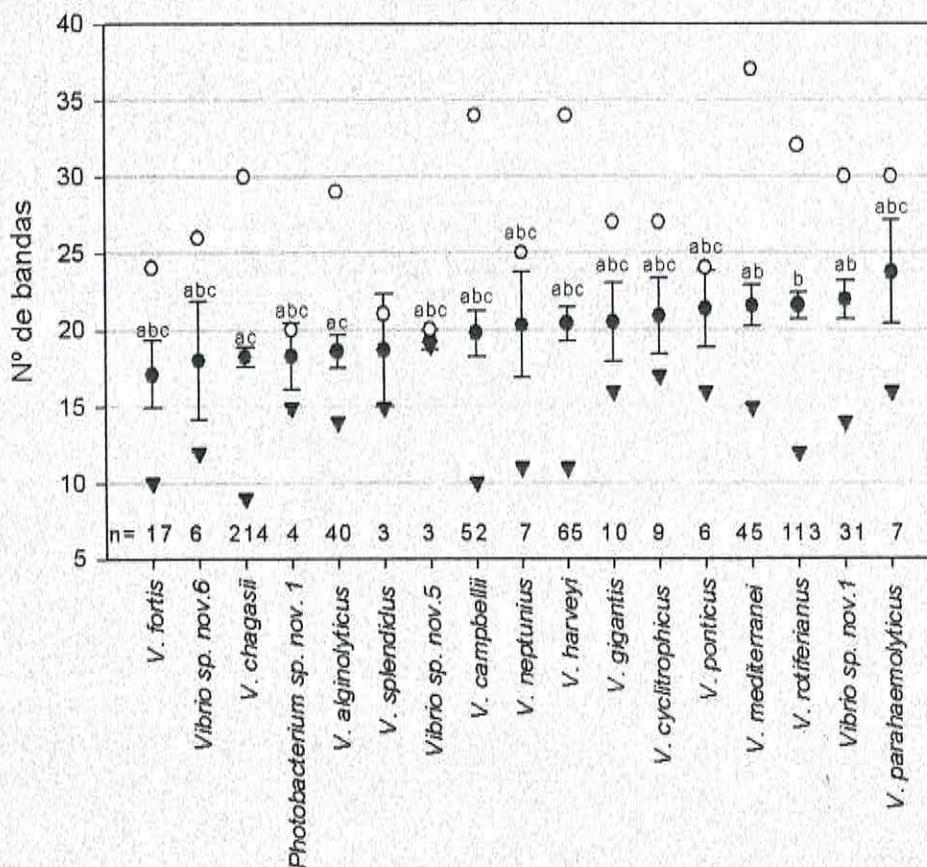


Figura 11.- Promedio del número de bandas generado por (GTG)5-PCR por especie analizada, intervalo de confianza del 95 % (barras). (o), valor máximo observado. (▼), valor mínimo observado. n, tamaño de la muestra. Especies con la misma letra no son significativamente diferentes (Dunn  $P > 0.05$ ).

Con respecto al tamaño de los fragmentos producidos por (GTG)<sub>5</sub>-PCR, el estadístico Kruskal-Wallis (H= 43.0, P<0.0003) encontró que todas la especies son significativamente diferentes entre si (Fig. 12).

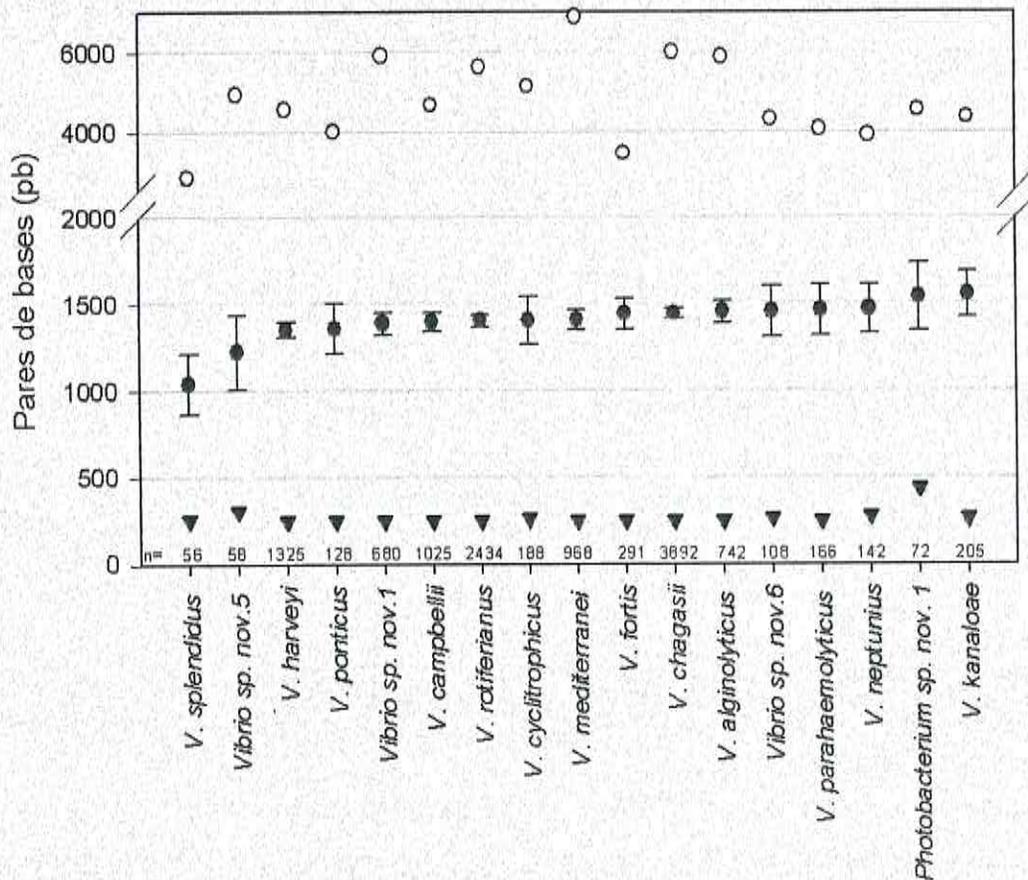


Figura 12.- Promedio del tamaño de las bandas generado por (GTG)<sub>5</sub>-PCR por especie analizada, intervalo de confianza del 95 % (barras). (o), valor máximo observado. (▼), valor mínimo observado. n, tamaño de la muestra. Se encontraron diferencias significativas entre todas las especies analizadas (Dunn P< 0.05).

Análisis del número y tamaño de bandas por zona. El análisis estadístico incluyó el número y tamaño del patrón de bandas generado por (GTG)<sub>5</sub>-PCR de todas las zonas estudiadas (tabla 9). Debido a que los datos no pasaron la prueba de Normalidad, el estadístico empleado para medir la variación del

número y tamaño de las bandas por zonas fue Kruskal-Wallis, utilizando comparaciones pareadas por el método de Dunn, empleando el software GraphPad Prism Ver. 4.0.

Tabla 9.- Análisis del patrón de bandas generado por (GTG)<sub>5</sub>-PCR por zona

Zona	Número de bandas					Tamaño de bandas (pb)				
	Promedio	n	$\sigma$	Máx.	Mín.	Promedio	n	$\sigma$	Máx.	Min.
BCI	20.9	41	4.18	30	14	1,340.9	856	880.27	5,660	248
BCII	21.9	37	4.18	29	12	1,364.9	810	876.65	6,000	248
BCS	19.2	49	3.48	29	9	1,374.7	938	864.13	4,970	248
SIN	21.6	57	5.29	34	10	1,446.6	1,230	1,003.29	6,500	248
SONI	21.2	40	5.51	37	10	1,427.3	845	913.78	5,980	248
SONII	21.9	23	5.31	34	14	1,346.0	503	847.81	5,150	248
SONIII	23.1	26	5.59	31	13	1,533.4	598	1,042.80	6,900	248
SONIV	22.9	27	5.14	34	13	1,434.1	607	904.48	4,590	249
ALF	19.2	205	4.08	28	9	1,412.1	3,941	832.35	5,880	248
FAN	17.8	226	4.19	30	8	1,424.3	4,015	837.73	5,180	248

Empleando Kruskal-Wallis ( $H= 84.23$ ,  $P<0.0001$ ) se encontraron diferencias significativas en el número de bandas cuando se analizaron los genotipos tipificados con (GTG)<sub>5</sub>-PCR por zona de muestreo (Fig. 13). Se encontró que FAN ( $n=226$ ) es significativamente diferente al resto de las zonas de muestreo, e incluso a la región más cercana ALF, por otro lado, ALF ( $n=205$ ) es significativamente diferente a BCII ( $n=37$ ), SON III ( $n=26$ ), SONIV ( $n=27$ ), Dunn ( $P< 0.05$ ).

Con respecto al tamaño de las bandas, Kruskal-Wallis ( $H=25.58$ ,  $P<0.011$ ) encontró que todas las zonas de muestreo son significativamente diferentes entre si (Fig. 14).

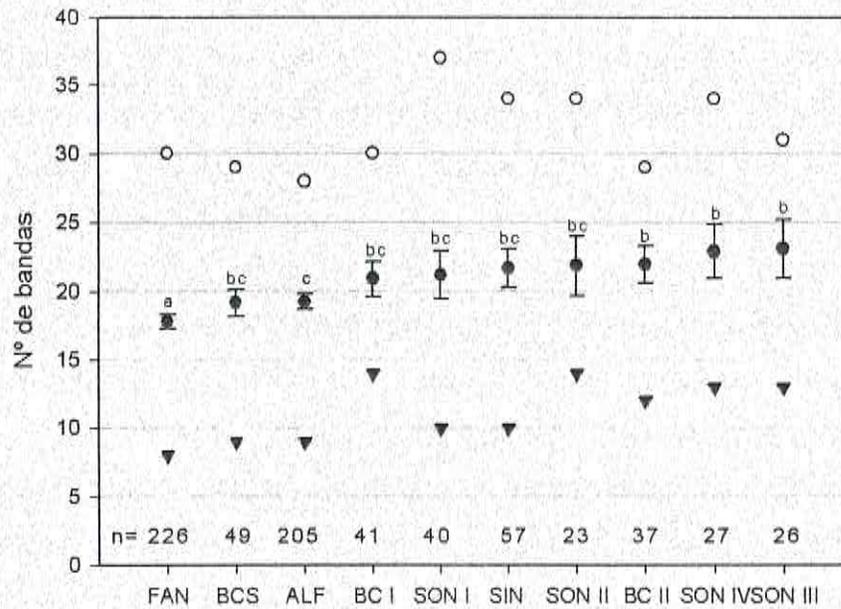


Figura 13.- Promedio del número de bandas generado por (GTG)5-PCR por zona analizada, intervalo de confianza del 95 % (barras). (o), valor máximo observado. (▼), valor mínimo observado. n, tamaño de la muestra. Zonas con la misma letra no son significativamente diferentes (Dunn  $P > 0.05$ ).

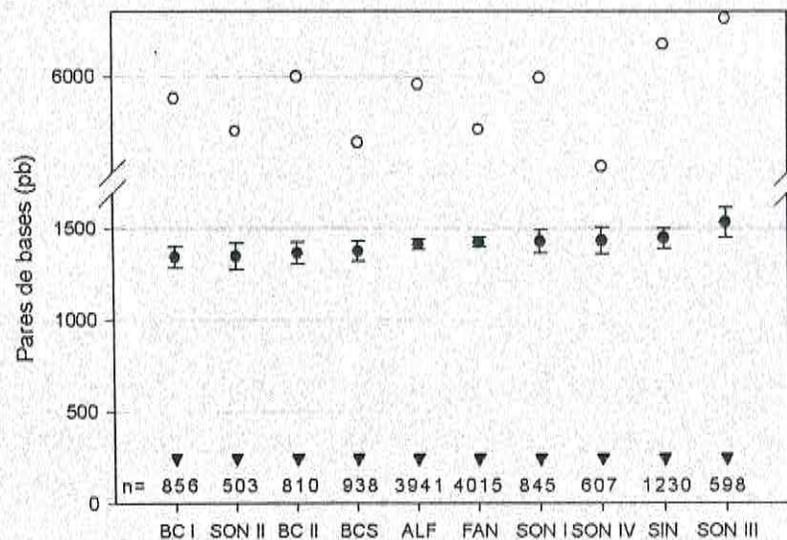


Figura 14.- Promedio del tamaño de las bandas generado por (GTG)5-PCR por zona analizada, intervalo de confianza del 95 % (barras). (o), valor máximo observado. (▼), valor mínimo observado. n, tamaño de la muestra. Se encontraron diferencias significativas entre todas las zonas analizadas (Dunn  $P < 0.05$ ).

### Análisis de Similitud del Patrón de Bandas Generado por (GTG)<sub>5</sub>-PCR

El análisis de rep-PCR con el iniciador (GTG)<sub>5</sub> se realizó solamente para las cepas pertenecientes a la familia Vibrionaceae (731 cepas, 96.4 %). También fueron incluidas en el análisis 10 cepas tipo y 10 cepas de referencia pertenecientes a esta familia.

El análisis de las cepas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR produjo un dendrograma con 32 clusters compuesto por 620 cepas, incluyendo las cepas tipo y las cepas de referencia (Fig. 15) y 21 grupos compuestos por 133 cepas que no formaron ningún cluster. Se consideró un cluster cuando la similitud entre las unidades taxonómicas operacionales (OTU, por sus siglas en inglés) fue superior al 42 % calculado con una tolerancia del 60 % en la posición de bandas. Los aislados fueron considerados clones de una cepa cuando su similitud (GTG)<sub>5</sub> fue superior al 90 %. Los criterios para la delimitación de los clusters se basaron en las observaciones hechas con las cepas tipo y referencia (Gomez-Gil et al., 2006 en prensa). (GTG)<sub>5</sub>-PCR y algunas pruebas bioquímicas mostraron que 27 cepas no pertenecen a la familia Vibrionaceae.

Este análisis permitió la identificación de 20 especies pertenecientes al género *Vibrio* y dos especies al género *Photobacterium*: *V. alginolyticus* (40 cepas), *V. brasiliensis* (dos cepas), *V. campbellii* (52 cepas), *V. chagasii* (215 cepas), *V. coralliilyticus* (una cepa), *V. cyclotrophicus* (nueve cepas), *V. fortis* (17 cepas), *V. harveyi* (65 cepas), *V. gigantis* (10 cepas), *V. mediterranei* (45 cepas), *V. neptunius* (siete cepas), *V. parahaemolyticus* (siete cepas), *V. ponticus* (seis cepas), *V. rotiferianus* (113 cepas), *V. splendidus* (tres cepas), *V. xuii* (una cepa), *Vibrio* sp. nov. 1 (31 cepas), *Vibrio* sp. nov. 4 (una cepa), *Vibrio* sp. nov. 5 (tres cepas), *Vibrio* sp. nov. 6 (cinco cepas) y *P. damsela* (dos cepas), *Photobacterium* sp. nov. 7 (cuatro cepas) (tabla 10). Las cuatro especies

potencialmente nuevas fueron reconocidas mediante la secuenciación completa del gen 16S rARN (>97 % de similitud rARN con las especies conocidas) (Gevers *et al.*, 2005). Sin embargo, estas especies potencialmente nuevas aún están pendientes por describirse considerando la necesidad de realizar más análisis que satisfagan los requerimientos establecidos (Stackebrandt *et al.*, 2002).

Noventa y dos cepas no fueron identificadas a nivel especie, debido su baja similitud con los clusters formados, sin embargo, (GTG)<sub>5</sub> produjo un mínimo de nueve bandas en estas cepas. Versalovic *et al.* (1994), recomiendan que en análisis se deben incluir las cepas que tengan un mínimo de ocho bandas generadas por rep-PCR para que la identificación sea confiable.

Todas las cepas que se identificaron como *Vibrio* sp., mostraron una similitud mayor al 35 % con los clusters formados cuando estas fueron analizadas con toda la base de datos (2,158 cepas aisladas de diferentes fuentes, esta base de datos esta compuesta por la mayoría de las cepas incluidas en la colección CAIM y caracterizadas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR). Por esta razón y por que en amplificaron más de nueve bandas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR fueron consideradas como pertenecientes al género *Vibrio*. Sin embargo, es necesario realizar pruebas más rigurosas de tipificación (incluyendo bioquímicas) o analizarlas con mayores bases de datos que confirmen su posición taxonómica. Es probable que muchas de estas cepas sean taxa ya descritos o que sean taxa nuevos.

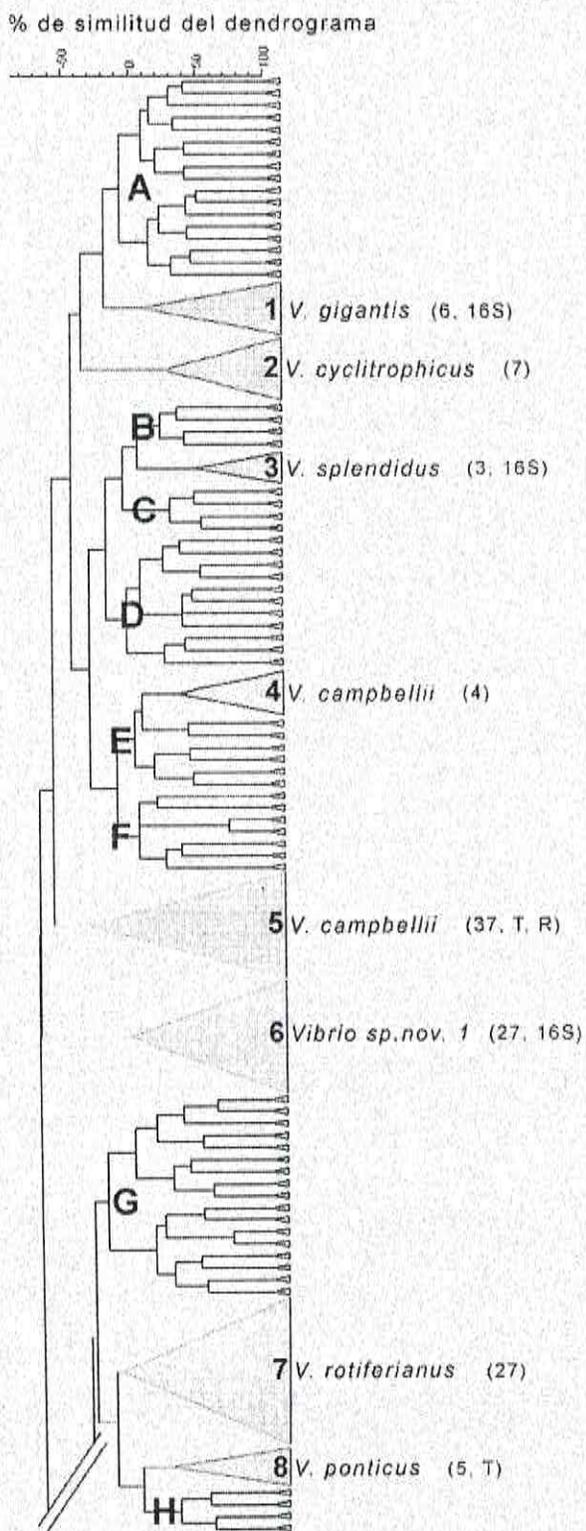
Se obtuvieron 27 cepas que no pertenecen a la familia Vibrionaceae de las cuales 15 se identificaron como especies pertenecientes al género *Shewanella* sp., empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR y secuenciación del primer tercio del gen 16S rARN de las cepas CAIM 1600, CAIM 1663 y CAIM 1680, las tres cepa mostraron una similitud del 98.4 % con la cepa tipo *Shewanella alga*

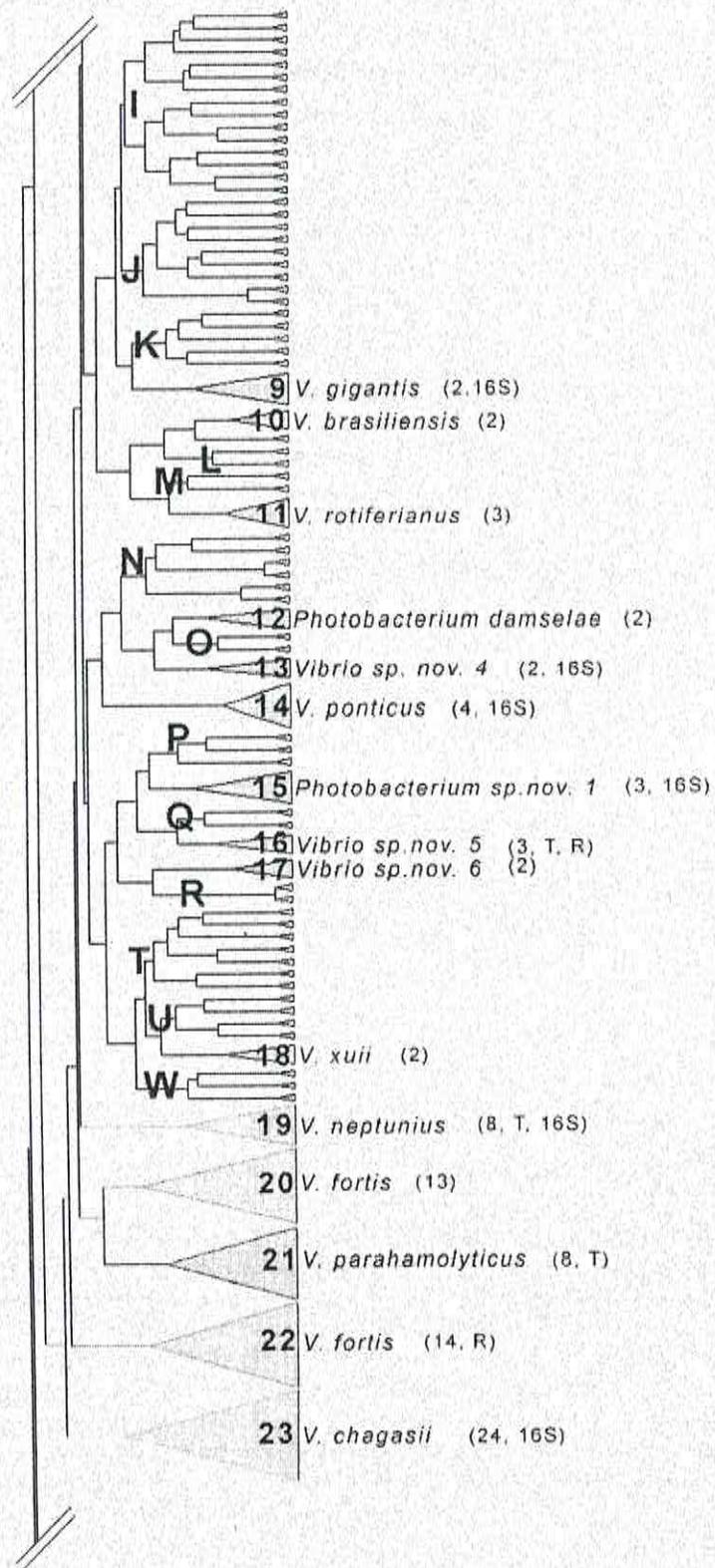
(DQ883817). Ocho cepas mostraron ser Gram positivas empleando pruebas bioquímicas y otras cuatro cepas no pudieron ser identificadas empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR.

El aislamiento y purificación de todos los aislados bacterianos analizados en este estudio se realizaron empleando agar TCBS, el cual ha sido reportado como el medio ideal para el aislamiento y purificación de vibrios, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas y coliformes por las sales biliares que contiene el medio (Nicholls *et al.*, 1976 en Gomez-Gil y Roque, 2006; Thompson *et al.*, 2004a), sin embargo, en este estudio se identificaron ocho cepas como Gram positivas, lo que demuestra que algunas especies de bacterias Gram positivas también pueden ser aisladas en ese medio (Gomez-Gil y Roque, 2006). Se ha reportado que algunas cepas de *Staphylococcus*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Streptococcus*, *Aeromonas* y *Shewanella* pueden crecer en este medio, formando generalmente colonias pequeñas (Nicholls *et al.*, 1976 en Gomez-Gil y Roque, 2006), en este estudio se identificaron por (GTG)<sub>5</sub>-PCR y secuenciación del gen 16S rARN 15 cepas como pertenecientes al género *Shewanella*. Por otro lado, también se ha reportado que *V. penaeicida* no crece en agar TCBS, y que cepas de *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii* forman colonias muy pequeñas en este medio (Nicholls *et al.*, 1976 en Gomez-Gil y Roque, 2006), sin embargo, en este estudio no se identificó ninguna cepa como pertenecientes a ninguna de estas especies.

Tabla 10. Especies de bacterias identificadas aisladas de ostión cultivado en el noroeste mexicano y en el delta del río Ebro identificadas mediante (GTG)<sub>5</sub>-PCR.

Espece	Nº de cepas identificadas	% de cepas con respecto al total
<i>Vibrio</i> sp.	92	12.6
<i>Photobacterium damsela</i>	2	0.3
<i>Photobacterium</i> sp. nov. 1	4	0.5
<i>Vibrio alginolyticus</i>	40	5.5
<i>Vibrio brasiliensis</i>	2	0.3
<i>Vibrio campbellii</i>	52	7.1
<i>Vibrio chagasii</i>	215	29.4
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	1	0.1
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	9	1.2
<i>Vibrio fortis</i>	17	2.3
<i>Vibrio gigantis</i>	10	1.4
<i>Vibrio harveyi</i>	65	8.9
<i>Vibrio mediterranei</i>	45	6.2
<i>Vibrio neptunius</i>	7	1.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7	1.0
<i>Vibrio ponticus</i>	6	0.8
<i>Vibrio rotiferianus</i>	113	15.5
<i>Vibrio</i> sp. nov.1	31	4.2
<i>Vibrio</i> sp. nov.4	1	0.1
<i>Vibrio</i> sp. nov.5	3	0.4
<i>Vibrio</i> sp. nov.6	5	0.7
<i>Vibrio splendidus</i>	3	0.4
<i>Vibrio xuii</i>	1	0.1





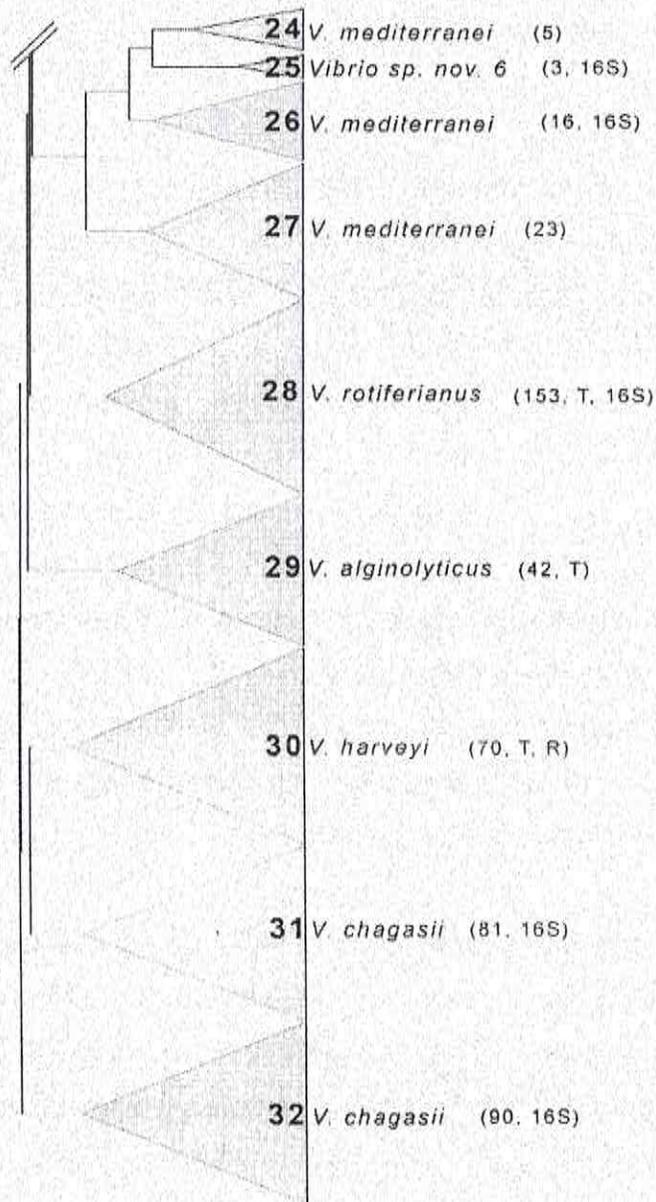


Figura 15.- Dendrograma de cepas pertenecientes a la familia Vibrionaceae aisladas de ostión (*C. gigas*) cultivado en granjas del noroeste mexicano y en el delta del Ebro, Cataluña, España. La matriz de similitud se calculó con el coeficiente de Jaccard (optimización 0.35, tolerancia 0.60) a partir de patrones de bandas electroforéticos obtenidos por (GTG)<sub>5</sub>-PCR. El número indica la asignación que se le dio al cluster, las letras indican los grupos de cepas que no se agruparon en algún cluster. Entre paréntesis se muestra el número de cepas que se alojaron en cada cluster (similitud 42 %), si en el cluster se alojó una cepa tipo (T), una de referencia (R) o si se secuenció algún tercio o el gen completo 16S rARN de algunas de las cepas (16s). La escala muestra el porcentaje de similitud del dendrograma. El tamaño de los clusters no es proporcional al número de cepas.

### Análisis Filogenético

El gen 16S rARN es una molécula que contiene regiones altamente conservadas que pueden elucidar relaciones entre clases o filos. Sin embargo, también tiene regiones variables que pueden discriminar entre especies de géneros (Stackebrandt y Rainey 1995; Thompson *et al.*, 2004a), por tal motivo, en este estudio se dividió el gen 16S rARN en tres tercios de aproximadamente 500 pb cada uno. La secuenciación del primer tercio mostró mayor variabilidad seguida del tercero, por tal razón, la primera región fue la más frecuentemente secuenciada en las cepas seleccionadas.

Se seleccionaron 39 cepas a las cuales se les secuenció algún tercio o todo el gen 16S rARN. El criterio de la selección de cepas a secuenciar se basó en los clusters que no incluyeron cepas tipo y/o referencia o que presentaron un coeficiente de similitud por debajo del 42 % (Jaccard) con otros clusters identificados (tabla 11), la secuencias se observan en el anexo 3.

Se secuenció el gen 16S completo de las cepas tipo de *V. gigantis* (CAIM 25<sup>T</sup>= LMG 22741<sup>T</sup>, EF094888) y *V. crassostreae* (CAIM 1405<sup>T</sup>= LMG 22240<sup>T</sup>, EF094887) porque ambas secuencias no fueron reportadas completas en el GenBank por los autores que describieron a la especie.

En este estudio se identificaron tres especies pertenecientes a la familia Vibrionaceae potencialmente nuevas por los resultados empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR y la secuenciación completa del gen 16S rARN. Rep-PCR ha demostrado ser una técnica con un alto poder discriminatorio para la delineación de especies (Rademaker *et al.*, 2000; Gomez-Gil *et al.*, 2004), por otro lado, la secuenciación del gen 16S rARN es considerada como la herramienta más

confiable para elucidar la estructura filogenética (género, especie y cepa) de la familia Vibrionaceae (Thompson *et al.*, 2004a).

Las cepas seleccionadas para la descripción de estas tres especies potencialmente nuevas fueron R-339<sup>T</sup> (cluster 25), CAIM 1437<sup>T</sup> (cluster 16) y CAIM 1439<sup>T</sup> (cluster 15). El análisis de las secuencias completas del gen 16S rARN de las tres especies mostraron que *Vibrio* sp. nov. 5 (CAIM 1437<sup>T</sup>) tiene una similitud con *V. hispanicus* (AY254039) del 97.0 %; *Vibrio* sp. nov. 6 (R-339<sup>T</sup>) tiene una similitud con *V. mediterranei* (X74710) del 98.5 %; mientras que, *Photobacterium* sp. nov. 1 (CAIM 1439<sup>T</sup>) tiene una similitud con *P. frigidiphilum* (AY538749) del 97.0 %. Aunque la similitud del gen 16S rARN es relativamente alta, en las regiones variables la variabilidad se mostraron claramente diferencias importantes. Por otro lado, estos taxa se encuentran claramente diferenciadas de la especie más cercana por (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Estudios de diversidad genómica han demostrado que la familia Vibrionaceae tiene taxa que aun no han sido descritos.

El número de especies pertenecientes a la familia Vibrionaceae ha incrementado en las dos últimas décadas de 20 especies en 1981 a 63 en 2004 (Thompson *et al.*, 2004b). Actualmente se han descrito 85 especies pertenecientes a esta familia ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)), siendo la gran mayoría especies aisladas de ambientes marinos. Empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR y secuencias del gen 16S rARN el laboratorio de bacteriología del CIAD/Mazatlán ha encontrado siete especies potencialmente nuevas; seis de ellas pertenecientes al género *Vibrio* (*Vibrio* sp. nov. 1 (CAIM 48<sup>T</sup>), *Vibrio* sp. nov. 2 (CAIM 932<sup>T</sup>), *Vibrio* sp. nov. 3 (CAIM 797<sup>T</sup>), *Vibrio* sp. nov. 4 (CAIM 1647<sup>T</sup>), *Vibrio* sp. nov. 5 (CAIM 1437<sup>T</sup>), *Vibrio* sp. nov. 6 (R339<sup>T</sup>) y una al género *Photobacterium* (*Photobacterium* sp. nov. 1 (CAIM 1439<sup>T</sup>)), todas ellas aisladas de pargo (*Lutjanus guttatus*) y ostión (*C. gigas*) (Gomez-Gil *et al.*, 2006, en prensa), de

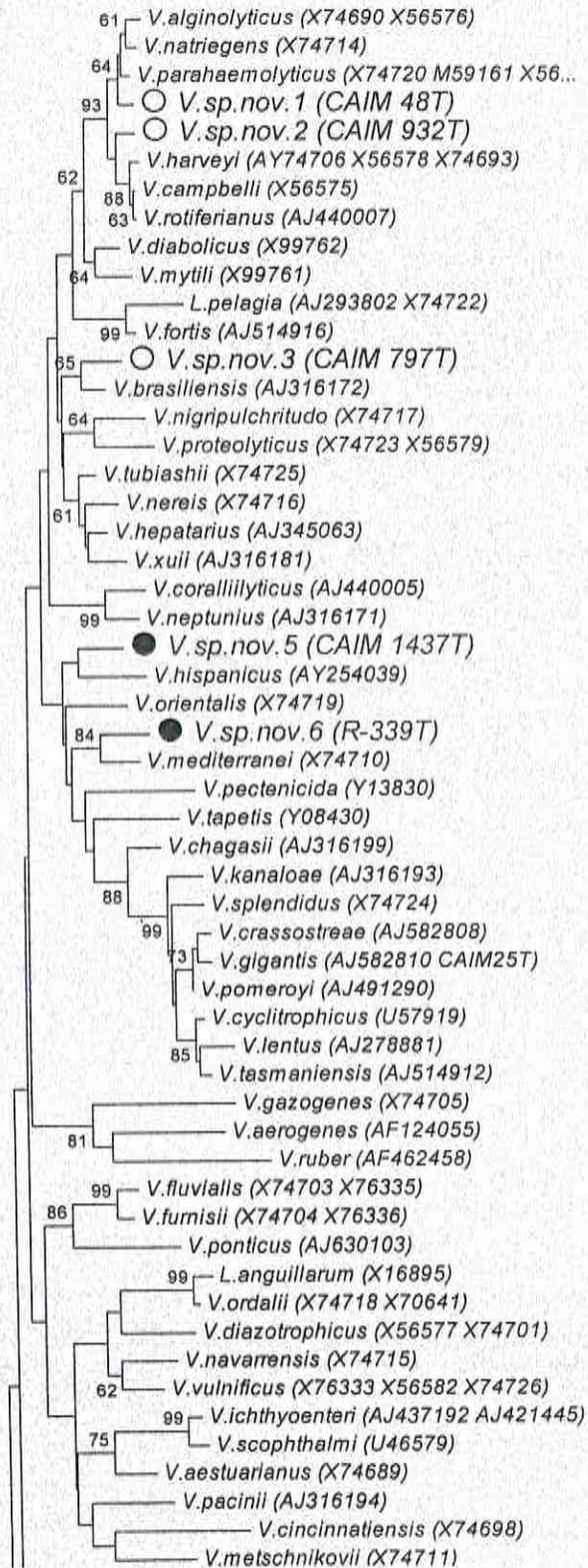
las cuales tres se reportan en este estudio, sin embargo, aún faltan estudios fenotípicos y genotípicos que las posicionen como taxa nuevos según el concepto de especie procariótica de Roselló-Mora & Amann (2001).

El modelo del árbol filogenético propuesto se observa en figura 16.

Tabla 11.- Posición filogenética de cepas representativas de clusters formados por (GTG)<sub>5</sub>-PCR sobre la base de secuencias del gen 16S rARN. La relación filogenética fue realizada empleando el programa BioEdit ver. 7.0.5.3

Cluster/ grupo	Cepa	Tercio 16S rARN	Cepa mas cercana	Similitud %
1	CAIM 1129	1er tercio	<i>V. gigantis</i> (CAIM 25 <sup>T</sup> )	99.1
3	CAIM 1479	1er tercio	<i>V. splendidus</i> (CAIM 319 <sup>T</sup> ) X74724	98.1
6	CAIM 1569	Completo	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1 (CAIM 48 <sup>T</sup> )	98.3
	CAIM 1621	1er tercio	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1 (CAIM 48 <sup>T</sup> )	97.2
	CAIM 1653	Completo	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1 (CAIM 48 <sup>T</sup> )	98.8
	CAIM 1683	Completo	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1 (CAIM 48 <sup>T</sup> )	98.1
9	CAIM 1441	1er tercio	<i>V. gigantis</i> (CAIM 25 <sup>T</sup> )	100
	CAIM 1442	1er y 3er tercio	<i>V. gigantis</i> (CAIM 25 <sup>T</sup> )	100
14	R-306	1er tercio	<i>V. ponticus</i> (CAIM 1731 <sup>T</sup> ) AJ6301013	99.7
15	CAIM 1206	Completo	<i>Photobacterium</i> sp. nov 7 (CAIM1439 <sup>T</sup> )	99.7
	CAIM 1439 <sup>T</sup>	Completo	<i>P. frigidophilum</i> (CAIM 20 <sup>T</sup> ) AY538749	97.0
16	CAIM 1437 <sup>T</sup>	Completo	<i>V. hispanicus</i> (CAIM 525 <sup>T</sup> ) AY254039	97.0
19	R-356	1er tercio	<i>V. neptunius</i> (CAIM 532 <sup>T</sup> ) AJ316171	100
	R-358	1er tercio	<i>V. neptunius</i> (CAIM 532 <sup>T</sup> ) AJ316171	99.7
20	CAIM 1130	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.3
23	CAIM 964	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	98.4
	CAIM 1108	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.1
	CAIM 1143	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	98.0
25	R-339 <sup>T</sup>	Completo	<i>V. mediterranei</i> (CAIM 316 <sup>T</sup> ) X74710	98.5
26	R-481	1er tercio	<i>V. mediterranei</i> (CAIM 316 <sup>T</sup> ) X74710	99.3
	R-606	1er tercio	<i>V. mediterranei</i> (CAIM 316 <sup>T</sup> ) X74710	99.3
28	CAIM 1445	1er tercio	<i>V. rotiferianus</i> (CAIM 577 <sup>T</sup> ) AJ440007	99.5
31	R-381	Completo	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.6
	R-410	Completo	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.7
	R-412	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.3
	R-550	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.3
	R-559	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.5
	R-571	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.1
	R-753	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	98.6
32	R-554	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	98.9
	R-600	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.1
	R-657	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.3
	R-677	1er y 3er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	98.9
	R-718	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.5
	R-719	1er y 3er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.3
	R-761	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.3
D	CAIM 1438	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.2
J	CAIM 1115	1er tercio	<i>V. chagasii</i> (CAIM 431 <sup>T</sup> ) AJ316199	99.5

En cursiva se observa el número de acceso a GenBank



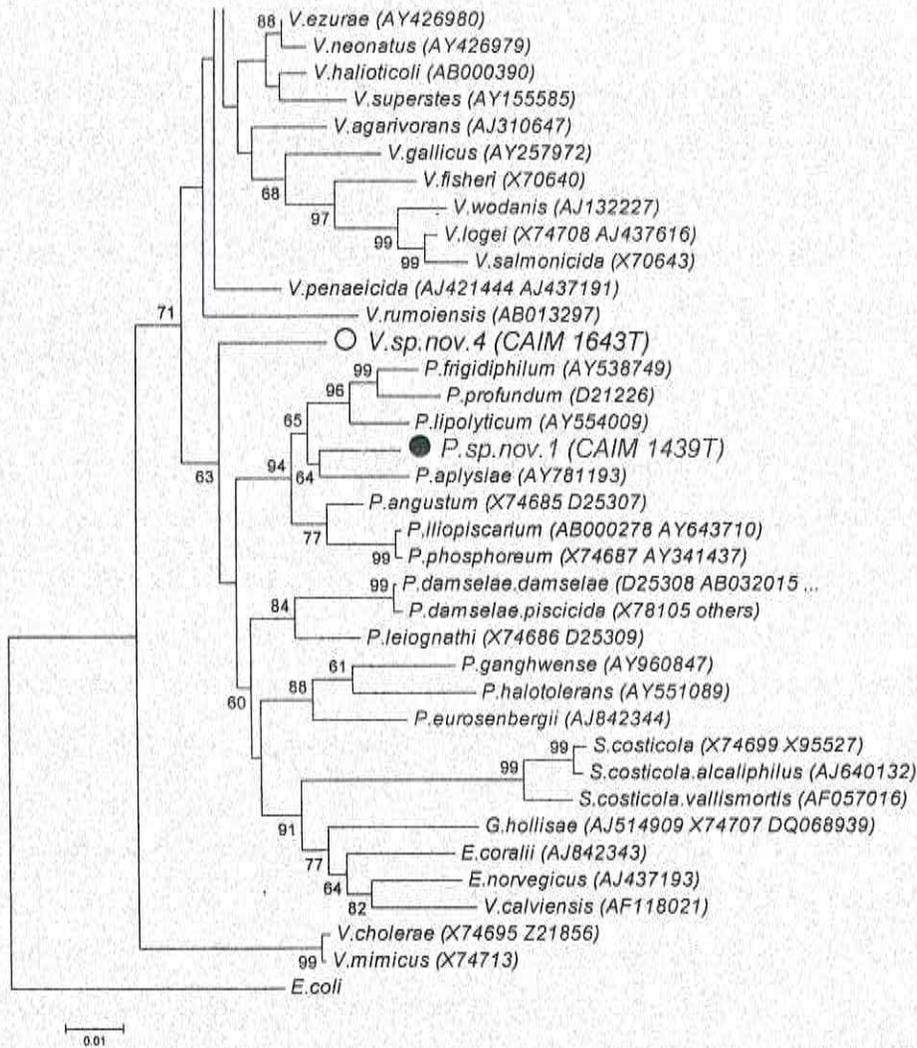


Figura 16.- Modelo propuesto del árbol filogenético basado en el método del vecino más cercano (neighbor-joining), usando la secuencia completa del gen 16S rARN (~1500 pb) de las especies pertenecientes a la familia Vibrionaceae. La distancia fue obtenida empleando el modelo de Jukes y Cantor. Los porcentajes de similitud se muestran después de 1000 simulaciones. 0.01 divergencia estimada de la secuencia. Las secuencias pertenecen a sus respectivas cepas tipo. O, especies potencialmente nuevas pertenecientes a la colección CAIM. ● especies potencialmente nuevas reportadas en este estudio. El árbol filogenético se realizó empleando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Ver. 3.1.

### Pruebas Bioquímicas

La caracterización bioquímica sólo se realizó en aquellas cepas que se dificultó su identificación genómica o que amplificaron menos de ocho bandas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR, en total fueron 41 cepas. Esta caracterización bioquímica se realizó para conocer si estas cepas pertenecen o no, al género *Vibrio*, con el objeto de descartar del análisis de (GTG)<sub>5</sub>-PCR aquellas cepas que no pertenezcan a este género.

Según el manual para la determinación bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994) la mayoría de las bacterias que constituyen el género *Vibrio* son principalmente bacilos Gram negativos, con motilidad dada por uno o más flagelos polares, son anaerobios facultativos y tienen un metabolismo fermentativo de la glucosa con producción de ácido, son bacterias con oxidasa positiva y son sensibles al agente vibrioestático O/129.

La prueba de Gram mostró que ocho cepas (CAIM 1050, CAIM 1093, CAIM 1157, CAIM 1170, CAIM 1550, CAIM 1560, CAIM 1590 y CAIM 1667) son Gram positivas (tabla 12) por lo que se descartaron de las siguientes cuatro pruebas bioquímicas (oxidasa, sensibilidad al agente vibrioestático O/129, motilidad y óxido-fermentación) y del análisis de (GTG)<sub>5</sub>-PCR. 33 cepas mostraron ser bacilos Gram positivos, oxidasa positiva, sensibles al agente vibrioestático O/120, móviles y fermentaron la glucosa (tabla 12) por lo que fueron consideradas, con base, en el manual para la determinación bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994) como pertenecientes al género *Vibrio*.

Tabla 12.- Pruebas bioquímicas.

CAIM	Gram	Oxidasa	Sensibilidad O/129		Motilidad	O-F glucosa
			10 µg cm	150 µg cm		
755	- bacilo	+	0.7	1	+	+
1050	+ coco	-	---	---	---	---
1068	- bacilo	+	1.9	2.4	+	+
1076	- bacilo	+	0.5	1.5	+	+
1078	- bacilo	+	1.3	2.2	+	+
1093	+ coco	-	---	---	---	---
1132	- bacilo	+	1.1	2.2	+	+
1135	- bacilo	+	1.3	1.8	+	+
1157	+ coco	-	---	---	---	---
1163	- bacilo	+	0.5	1.3	+	+
1170	+ coco	-	---	---	---	---
1184	- bacilo	+	1.3	1.9	+	+
1185	- bacilo	+	1.6	2	+	+
1208	- bacilo	+	0.5	0.6	+	+
1209	- coco	+	0.7	1.4	+	+
1226	- bacilo	+	0.6	1.5	+	+
1229	- bacilo	+	0.5	1	+	+
1230	- bacilo	+	0.6	1.2	+	+
1308	- bacilo	+	0.5	1.2	+	+
1310	- bacilo	+	1	1.5	+	+
1313	- bacilo	+	1.6	2	+	+
1315	- bacilo	+	1.3	2.1	+	+
1317	- bacilo	-	1.8	2.2	+	+
1318	- bacilo	+	1.5	2.2	+	+
1320	- bacilo	+	1.8	2	+	+
1382	- bacilo	+	0	0.7	+	+
1383	- bacilo	+	1.5	2.3	+	+
1444	- bacilo	+	0.5	1.5	+	+
1484	- bacilo	+	1.5	1.7	+	+
1488	- bacilo	+	1.7	2	+	+
1550	+ coco	-	---	---	---	---
1560	+ coco	-	---	---	---	---
1589	- bacilo	+	0.9	1.5	+	+
1590	+ coco	-	---	---	---	---
1594	- bacilo	+	1.7	2.5	+	+
1598	- cocobacilo	+	0.5	0.7	+	+
1599	- bacilo	+	0.5	1.6	+	+
1625	- bacilo	+	2.8	4	+	+
1632	- bacilo	+	1.8	2.2	+	+
1667	+ coco	-	---	---	---	---
1672	- bacilo	+	1.3	2	+	+

### Análisis Ecológicos

La riqueza específica de especies es el número total de especies obtenido por censo en una comunidad (Moreno, 2001), este índice varió de siete a 13 especies identificadas en todas las zonas de estudio (Fig. 17). En total se identificaron 22 especies de las cuales 86.4 % del total fueron identificadas en el noroeste mexicano y el 59 % de éstas se identificaron en el delta del río Ebro.

De las 18 especies identificadas en el noroeste mexicano, 16 pertenecen al género *Vibrio* y dos al género *Photobacterium*, ambos géneros representados por 247 cepas. Mientras que en el delta del río Ebro se identificaron 13 especies, todas pertenecientes al género *Vibrio*, representadas por 392 cepas.

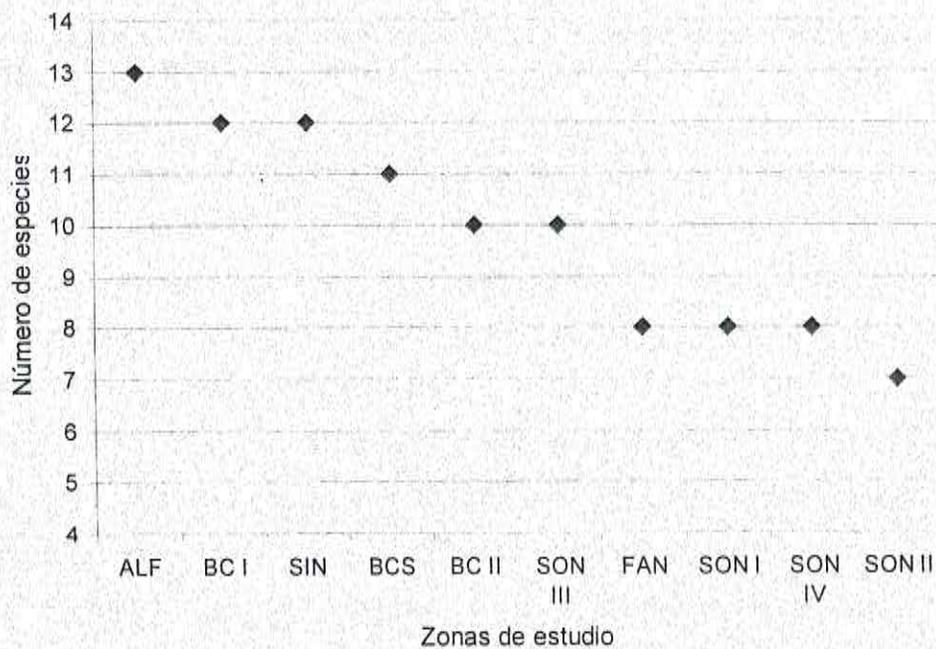


Figura 17.- Riqueza específica por zona de estudio

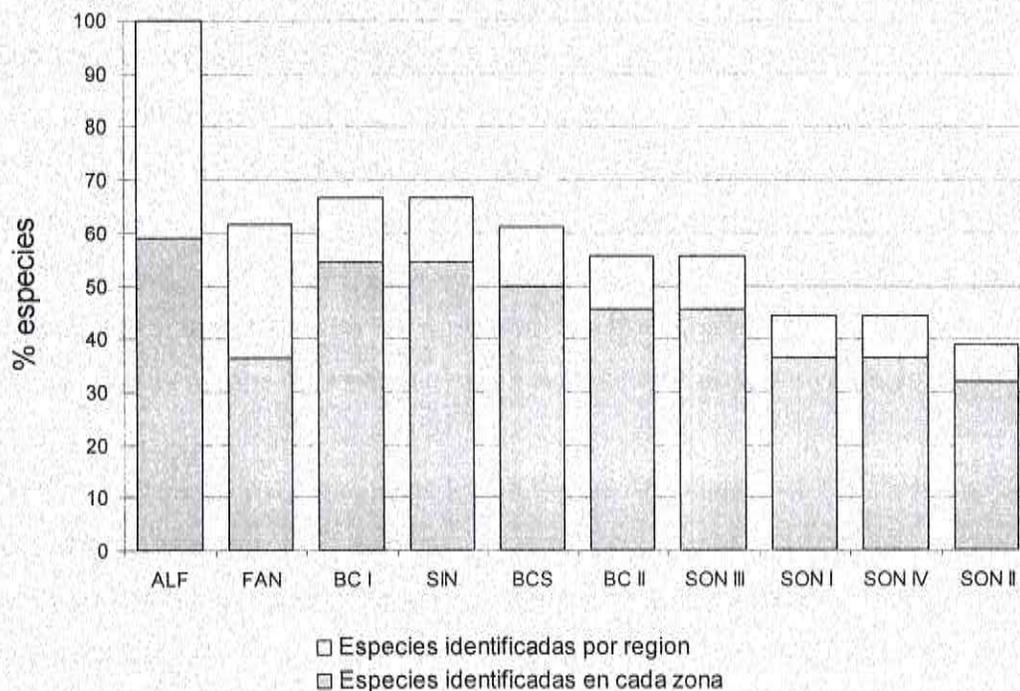


Figura 18.- Porcentaje de especies identificadas con respecto al total identificado por zona y con respecto al total de todas las zonas.

De los ostiones provenientes de la granja "Ostrícola Guevara S.A. de C.V." (SIN), ubicada en la Cruz de Elota, Sinaloa, fue una de las más ricas con 12 especies identificadas, lo que representa el 66.7 % de las especies identificadas en el noroeste mexicano y el 54.5 % de total de las especies identificadas (Fig. 18). Todas estas especies están representadas por 46 cepas, empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR 11 cepas aisladas de esta zona se identificaron como *Vibrio* sp. (tabla 13). En esta granja se identificó a *V. brasiliensis* (dos cepas) como una especie rara debido a que sólo se registró en esta zona. La especie predominante en esta zona fue *V. rotiferianus* (9 cepas). La temperatura registrada en esta granja fue de 29 °C durante el verano y de 21 °C en el invierno, y la salinidad del 34 ‰ durante el verano y 31 ‰ en el invierno.

De la granja "Ostrícola del Sol S.C de R.L." (SONI) ubicada Huatabampo, Sonora se identificaron ocho especies lo que representa el 42 % de las especies identificadas en el noroeste mexicano y el 36.4 % del total de especies (Fig. 18). Todas estas especies representadas por 30 cepas, 10 cepas sólo se identificaron como *Vibrio* sp. En esta granja predominaron *V. campbellii* (10 cepas) y *Vibrio* sp. nov. 1 (ocho cepas) (tabla 13). La temperatura que se registró durante la toma de las muestras fue de 30 °C durante el verano y de 13 °C durante el invierno, y la salinidad se registró en 35 ‰ en el verano e invierno.

En los ostiones provenientes del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora (SONII), ubicado en Bahía de Kino, se registró una de las riquezas más bajas con siete especies identificadas lo que representa el 36.8 % de las especies identificadas en el noroeste mexicano y el 31.8 % del total de especies identificadas (Fig. 18). Estas especies están representadas por 18 cepas, en esta zona cinco cepas se identificaron como *Vibrio* sp. empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR (tabla 13). La especie más abundante en esta granja fue *V. mediterranei* (cinco cepas). La temperatura fue de 29 °C durante el verano y 12 °C en el invierno, mientras que la salinidad fue de 37 ‰ durante el verano y 35 ‰ en el invierno.

En la granja "S. C. P. P. E. Bahía San Jorge S. C. L" (SONIII), ubicada en Caborca, Sonora se identificaron 10 especies lo que representa el 53.6 % de las especies identificadas en el noroeste mexicano y el 45.5 % del total de especies identificadas (Fig. 18). Estas especies están representadas por 20 cepas, de esta zona seis cepas se identificaron como *Vibrio* sp. (tabla 13). De esta granja se aisló una cepa identificada como *V. splendidus*, esta especie sólo se aisló en dos zonas BCI y SONIII. También se identificaron dos cepas como *Vibrio* sp. nov. 5, esta especie sólo se aisló en SONI y SONIII. La especie más abundante en esta granja fue *V. campbellii* (4 cepas). La temperatura registrada fue de 28

°C en el verano y 15 °C durante el invierno, la salinidad de 34 ‰ en el verano y 33 ‰ en el invierno.

De la granja "Cooperativa Única de Mujeres" (SONIV) ubicada en Puerto Peñasco, Sonora se identificaron ocho especies, el 42.1 % del total de las cepas identificadas en el noroeste mexicano y el 36.4 % del total de las especies identificadas (Fig. 18). Estas especies están representadas por 15 cepas, de esta zona 12 cepas se identificaron como *Vibrio* sp. (tabla 13). Se identificaron dos cepas como *V. ponticus*, esta especie fue considerada como rara en el Noroeste mexicano, debido a que esta especie sólo se identificó en esta granja, sin embargo, se identificaron cuatro cepas de *V. ponticus* que fueron aisladas de la bahía Alfacs las cuales formaron el cluster 14, mientras que las aisladas en el noroeste mexicano formaron el cluster 8 (Fig. 15) la variabilidad genética de esta especie se discute mas adelante en la descripción de las especies identificadas.

Las especies más abundantes en SONIV fueron *V. campbellii* y *V. chagasii* con 3 cepas cada una. La temperatura registrada fue de 28 °C en el verano y de 15 °C durante el invierno, y la salinidad fue de 31 ‰ en el verano y 29 ‰ en el invierno.

En la granja "Agromarinos S. A. de C. V." (BCI) ubicada en San Quintín, Baja California se identificaron 12 especies lo que la hace una de las zonas más ricas del noroeste mexicano, lo que representa el 66.7 % de las especies identificadas en el noroeste mexicano y el 54.5 % del total de especies identificadas (Fig. 18). Estas especies están representadas por 36 cepas, de esta zona cinco cepas se identificaron como *Vibrio* sp. (tabla 13). Una cepa se identificó como *P. damsela*, esta especie sólo fue registrada en esta zona y en BCS. La especie más abundante en esta granja fue *V. alginolyticus* (nueve cepas). La temperatura registrada en la granja durante el muestreo fue de 22 °C

en el verano y 18 °C en el invierno, y la salinidad de 35 ‰ en el verano y 33 ‰ en el invierno.

De la granja "Sol Azul S. A. de C. V." (BCII) ubicada en Ensenada, Baja California se identificaron 10 especies, lo que representa el 52.6 % de las especies identificadas en el noroeste mexicano y el 45.5 % del total de especies identificadas (Fig. 18). Todas estas especies están representadas por 35 cepas, de esta zona solo dos cepas se identificaron como *Vibrio* sp. empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR (tabla 13). La especie más abundante en esta granja fue *V. chagasii* (13 cepas). La temperatura registrada durante el muestreo fue de 24 °C en el verano y 18 °C en el invierno, y la salinidad fue de 33 ‰ en el verano y 32 ‰ en el invierno.

En la granja "Sol Azul S. A. de C. V." (BCS) ubicada en Mulegé, Baja California Sur se identificaron 11 especies, el 57.8 % de las cepas identificadas en el noroeste mexicano y el 50 % del total de especies identificadas (Fig. 18). Todas estas especies están representadas por 47 cepas, solo dos cepas aisladas de esta zona se identificaron como *Vibrio* sp. (tabla 13). Se identificó una cepa como *V. xuii*, la cual se reportó como una especie rara. La especie más abundante en esta granja fue *V. alginolyticus* (16 cepas). La temperatura registrada durante el muestreo fue de 24 °C en el verano y 18 °C en el invierno, la salinidad de 32 ‰ en el verano y 31 ‰ en el invierno.

De los ostiones obtenidos en la bahía Alfacs en el delta del río Ebro, Cataluña, España; se identificaron 13 especies, el 100 % de las especies identificadas en el delta del Ebro y el 59.1 % del total de especies identificadas (Fig. 18). Todas estas especies están representadas por 182 cepas. Esta zona es una de las que presentó mayor riqueza alfa, aquí se encontraron todas las especies reportadas en el delta del Ebro. También se encontraron tres especies raras: *V.*

*neptunius* (siete cepas), *Vibrio* sp. nov. 4 (una cepa) y *Vibrio* sp. nov. 6 (cinco cepas); estas especies no fueron identificadas en ninguna de las otras zonas muestreadas. También se identificó una cepa como *V. coralliilyticus*, y cuatro cepas como *V. ponticus* también reportada en SONIV. Sin duda ambas especies son raras en el delta del Ebro. En esa zona las especies más abundantes fueron: *V. chagasii* (60 cepas), *V. rotiferianus* (53 cepas), *V. harveyi* (15 cepas) y *V. mediterranei* (14 cepas). De esta zona 23 cepas se identificaron como *Vibrio* sp empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR (tabla 13). La temperatura registrada durante el muestreo fue de 22 °C y la salinidad de 32 ‰.

De los ostiones obtenidos en la bahía Fangar (FAN) en el delta del río Ebro, Cataluña, España se identificaron ocho especies, que representan el 61.5 % de las especie identificadas en el delta del Ebro y el 36.4 % del total de especies identificadas (Fig. 18). Todas estas especies están representadas por 210 cepas, solo 16 cepas aisladas de esta zona se identificaron como *Vibrio* sp. empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR (tabla 13). Esta zona fue una de las más pobres en cuanto al número de especies identificadas, sin embargo, se identificaron a *V. chagasii* (119 cepas) y *V. harveyi* (34 cepas) como las especies más abundantes de todas las zonas de estudio.

*Vibrio mediterranei*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi* han sido especies reportadas como parte de la flora bacteriana de ostiones y otros moluscos bivalvos cultivados en el delta del Ebro y en zonas ostrícolas cercanas al delta del Ebro (Montilla *et al.*, 1995; Pujalte *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 1999), estas mismas especies también se encontraron en los ostiones analizados en este trabajo. En el trabajo de Montilla *et al.* (1995), reportan la presencia de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en los moluscos cultivados en el delta del Ebro, sin embargo, estas especies no fueron identificadas en los ostiones procedentes del delta Ebro analizados es este estudio.

Montilla *et al.*, (1994; 1995) aislaron durante un año (Noviembre 1989 a Noviembre 1990), caracterizaron e identificaron 380 cepas bacterianas procedentes de mejillón, almeja, ostras y ostión cultivados en las bahías Alfacs y Fangar en el delta del río Ebro. Los autores reportan que las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por electroforesis proteica, y reportan 17 especies pertenecientes al género *Vibrio*, también reportan cepas identificadas como *Aeromonas* sp. (siete cepas) y *Plesiomonas* sp. (10 cepas). Los autores reportan una riqueza específica mayor a la reportada en nuestro trabajo, sin embargo, esta diferencia puede ser explicada porque Montilla y colaboradores muestrearon durante un año diversas especies de moluscos bivalvos y por los métodos de tipificación bacteriana empleados en ambos estudios.

En resumen, en el noroeste mexicano se identificaron nueve especies pertenecientes a la familia Vibrionaceae (*P. damsela*, *V. brasiliensis*, *V. cyclitrophicus*, *V. gigantis*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *V. xuij*, *Vibrio* sp. nov. 5 y *Photobacterium* sp. nov. 1) como exclusivas de esta región geográfica, es decir, ninguna de estas especies se identificaron en las bahías del delta del río Ebro. Mientras que en el delta del Ebro sólo se identificaron tres especies de la familia Vibrionaceae como exclusivas de esta zona (*V. coralliilyticus*, *Vibrio* sp. nov. 4 y *Vibrio* sp. nov. 6). Los ostiones *C. gigas* cultivados en ambas regiones geográficas comparten una flora bacteriana de 10 especies pertenecientes a la familia Vibrionaceae: *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. chagasii*, *V. fortis*, *V. harveyi*, *V. mediterranei*, *V. neptunius*, *V. ponticus*, *V. rotiferianus* y *Vibrio* sp. nov. 1.

Estos resultados demuestran que los ostiones cultivados en el noroeste mexicano tienen una riqueza bacteriana específica mayor a la de los ostiones cultivados en el delta del río Ebro, sin embargo, los ostiones de ambas regiones

comparten muchas especies de vibrios. Urakawa y Rivera, (2005) mencionan de las especies de *Vibrio* se encuentran distribuidas en la mayoría de los ambientes acuáticos del mundo, y que la variación de las poblaciones de vibrios en las regiones tropicales y subtropicales es baja. La riqueza mostrada en el noroeste de mexicano puede ser explicada por que sus aguas tienen una mayor influencia trópicar que las aguas del mar mediterráneo. Sin embargo, cabe destacar la falta de un análisis comparativo entre ambas regiones se debe principalmente a que ambas regiones presentan características ambientales, manejo de las zonas de cultivo, entre otras, muy diferentes, sin mencionar el noroeste mexicano se muestrearon más zonas y la extensión geográfica que representa cada región.



### Vibrios Identificados Durante el Verano e Invierno

Durante los muestreos se registró la temperatura y salinidad en todas las zonas muestreadas. Cabanillas (2005), reporta que debido a que las condiciones ambientales registradas durante los muestreos de Noviembre del 2003 y Septiembre del 2004 fueron muy similares, ambas se registraron como datos de verano, mientras que el muestreo de Febrero del 2004 se registró como invierno.

Las bahías de Alfacs y Fangar se muestrearon durante los meses de Septiembre y Octubre del 2005, respectivamente. Debido a que solo se muestreo una sola vez en esta zona geográfica no se incluye en este análisis.

Durante el verano se identificaron más cepas como *V. campbellii*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus*, *V. gigantis*, *V. harveyi*, *V. mediterranei*, *V. parahaemolyticus* y *V. rotiferianus* que en el invierno. Sin embargo, *V. alginolyticus*, *Vibrio nov. sp. 1* y *Vibrio nov. sp. 5* fueron más abundantes durante el invierno (Fig. 19), algunos autores coinciden en que este fenómeno se debe a que el incremento de la temperatura esta directamente relacionado con el incremento de las poblaciones de las especies de vibrios (Urakawa y Rivera, 2006). La temperatura óptima para el crecimiento de *V. alginolyticus* es de 22 a 37 °C, sin embargo, se ha reportado su crecimiento a una temperatura de 8 °C (Blake *et al.*, 1980), la temperatura mínima durante el invierno de las zonas donde se detectó esta bacteria fue de 18 °C, lo que explica la abundante presencia de este microorganismo en comparación con las demás especies aisladas durante el invierno.

Por otro lado, *P. damselae*, *V. brasiliensis* y *V. ponticus* sólo se presentaron en los ostiones cultivados durante el verano y *V. splendidus* y *V. xuii* sólo se identificó en los ostiones cultivados durante el invierno (Fig. 19).

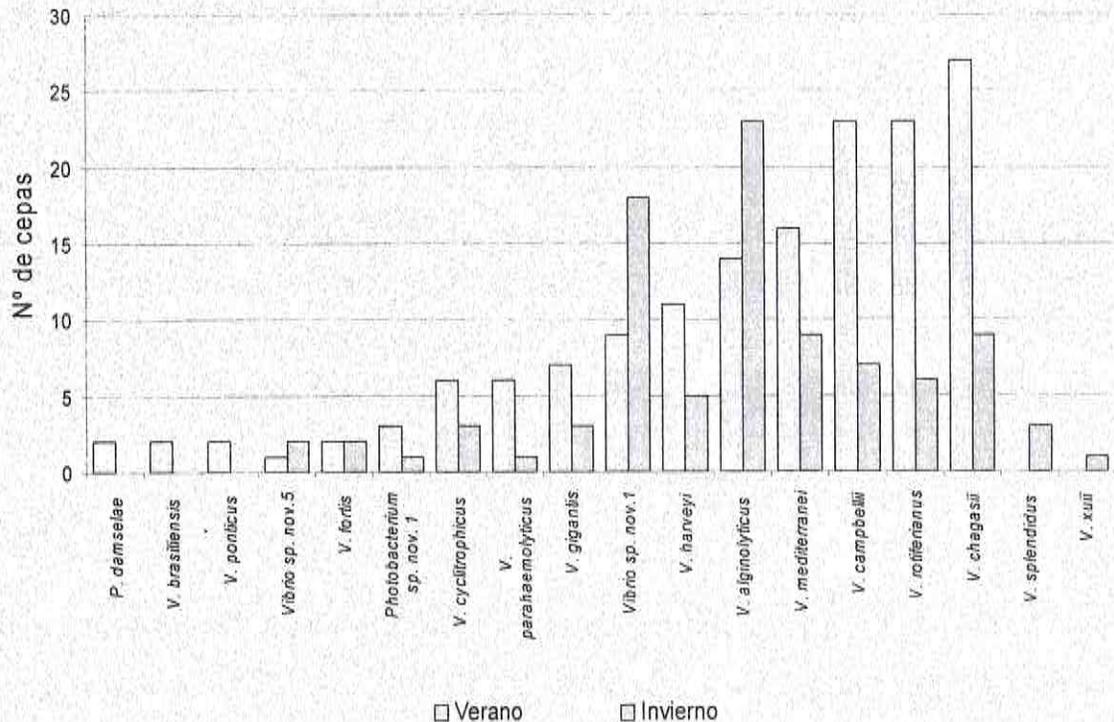


Figura 19. Especies identificadas durante el verano e invierno en el noroeste mexicano.

### Descripción de Especies Identificadas

#### **Photobacterium**

*P. damsela* (cluster 12). Fueron identificadas dos cepas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR las cuales fueron aisladas de las zonas BCI y BCS. La identificación de estas cepas sólo pudo realizarse cuando fueron analizadas en conjunto con toda la base de datos.

*Photobacterium sp. nov. 1* (cluster 15). Cluster compuesto por cuatro cepas que podrían representar una nueva especie debido a su baja similitud en la secuencia del gen 16S rARN. La cepa CAIM 1439<sup>T</sup> fue seleccionada como la cepa tipo, mostró una similitud del 97.0 % con *P. frigidophilum* (AY538749) en la

secuencia del 16S rARN. De este cluster también se secuenció el gen completo 16S rARN de la cepa CAIM 1206 propuesta como cepa de referencia, esta secuencia mostró una similitud del 99.7 % con la cepa tipo (CAIM 1439<sup>T</sup>) propuesta en este estudio.

Las cuatro cepas fueron aisladas de diversas zonas del noroeste mexicano: CAIM 1439<sup>T</sup> se aisló en la zona BCII, CAIM 1206 en SIN, CAIM 1119 en BCS y CAIM 1030 en BCI. No se registró ningún aislado de las zonas del delta del Ebro.

## Vibrio

*V. alginolyticus* (cluster 29). Se identificaron 40 aislados por (GTG)<sub>5</sub>-PCR, la cepa tipo (CAIM 516<sup>T</sup>, =LMG 4409<sup>T</sup>) que describe a esta especie se alojó en el cluster. La cepa CAIM 1219 (grupo F) no se alojó a ningún cluster, sin embargo presentó una similitud del 44.0 % al cluster 29.

Treinta y siete cepas se aislaron en el noroeste mexicano: nueve cepas de la zona BCI, tres en BCII, 16 en BCS, seis en SIN, una en SONIII y dos en SONIV. Solamente se obtuvieron tres cepas de ostiones cultivados en el delta del Ebro: dos cepas en la zona FAN y una en ALF.

La presencia de esta especie en *C. gigas* como parte de su flora es de especial importancia, ya que se ha reportado un patógeno oportunista que provoca severas mortalidades en los cultivos larvarios (incluyendo *C. gigas*) (Paillard *et al.*, 2004). La enfermedad producida es conocida como necrosis baciliar, la cual se caracteriza por la defoliación y la pérdida de células epiteliales (Paillard *et al.*, 2004).

Debido a que son muy escasos los trabajos de tipificación bacteriana en México, esta especie no es comúnmente reportada, sin embargo, Gómez-Gil *et*

*al.*, 2006 (en prensa), aislaron 11 cepas de *V. alginolyticus* a partir de órganos internos (hígado, riñón y bazo) y lesiones externas de pargo (*Lutjanus guttatus*) enfermos cultivado en jaulas flotantes en Manzanillo, Colima y de organismos silvestres procedentes de Mazatlán, Sinaloa.

Motilla *et al.* (1994) aislaron *V. alginolyticus* de ostiones (incluyendo *C. gigas*) cultivado en el delta del Ebro usando agar TCBS, no reportaron anomalías en los organismos hospederos. Esta especie también ha sido reportada en otras zonas costeras del mediterráneo (Pujalte *et al.*, 1999; Dumontet *et al.*, 2000).

***V. brasiliensis*** (cluster 10). Se identificaron dos cepas (CAIM 800 y CAIM 804) ambas fueron aisladas en la zona SIN. Esta especie puede ser considerada como rara ya que sólo se identificó en esta zona. La identificación de ambas cepas se realizó cuando fueron analizadas con toda la base de datos. *V. brasiliensis* es un taxón que fue descrito recientemente por Thompson *et al.* (2003c), quienes lo aislaron de larvas de *Nodipecten nodosus* en Brasil.

***V. campbellii*** (clusters 4 y 5). Se identificaron 52 aislados, distribuidos cuatro en el cluster 4 y 31 en el cluster 5, en este último se agruparon la cepa tipo (CAIM 519<sup>T</sup> =ATCC 25920<sup>T</sup>) y 4 cepas de referencia (CAIM 113, CAIM 128 =R-16623, CAIM 372 y CAIM 415 =LMG 21361), un aislado se agrupó en el cluster 7. Aunque el nivel de similitud fue alto, 16 aislados no formaron clusters; cuatro aislados se alojaron en el grupo A, uno en el grupo B, uno en el grupo C, cuatro en el grupo G, cuatro en grupo I y dos en el grupo F. Todos estos aislados fueron identificados con toda la base de datos mostrando una alta similitud por (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Se observó luminiscencia en 10 cepas identificadas como *V. campbellii* (CAIM 1043, CAIM 1045, R-290, R-298, R-353, R-376, R-503, R-633 y R-634).

Gomez-Gil *et al.* (2003, 2004) demostraron que *V. campbellii* es una especie muy heterogénea mostrando fenotipos casi indistinguibles a los de *V. harveyi* y *V. rotiferianus*. Los autores demostraron también que la similitud del gen 16S rARN de estas tres especies es mayor al 69 % y la reasociación ADN-ADN fue del 70 %, sin embargo, Thompson *et al.* (2001) mencionan que estas especies pueden ser claramente diferenciadas por AFLP. Los resultados de este estudio demuestran que (GTG)<sub>5</sub>-PCR puede diferenciar claramente *V. campbellii* de *V. harveyi* y *V. rotiferianus*, sin embargo también demuestra la heterogeneidad genotípica de la especie.

Estudios recientes de diversidad de vibrios asociados con el blanquecimiento del coral en arrecifes coralinos de Australia y Hawai indican que *V. campbellii* puede estar involucrado en estos procesos (Thompson *et al.*, 2004a). Por otro lado, esta especie ha sido aislada del hígado, riñón, bazo y de lesiones externas de pargos (*Lutjanus guttatus*) (Gomez-Gil *et al.*, 2006, en prensa), sin embargo, su acción patológica en estos peces aun no ha sido esclarecida.

*V. campbellii* se aisló de todas las zonas de estudio: una cepa de BCI, dos de BCII, dos de BCS, seis de SIN 10 de SON, cuatro de SONII, cuatro de SONIII, una de SONIV, 14 de ALF y ocho de FAN.

*V. chagasii* (clusters 23, 31 y 32). Se identificaron 215 cepas las cuales formaron 3 clusters principales. En el cluster 23 se alojaron 22 cepas, de este cluster se seleccionaron tres cepas (CAIM 964, CAIM 1108 y CAIM 1143) a las cuales se les secuenció el primer tercio del 16S rARN mostrando una similitud mayor al 98.0 % con la cepa tipo (CAIM 431<sup>T</sup> = LMG 21353<sup>T</sup>). En el cluster 31 se alojaron 75 cepas, de aquí fueron seleccionadas cinco cepas (R412, R550, R-559, R-571 y R-753) para secuenciarles el primer tercio 16S rARN mostrando una similitud mayor al 98.6 %, otras dos cepas (R-381 y R-410) se les

secuenció el 16S rARN completo (99.6 %). En el cluster 32 se alojaron 93 cepas, de las cuales se seleccionaron cinco cepas (R-554, R-600, R-657, R-718 y R-761) para secuenciarles el primer tercio 16S rARN, la similitud mostrada fue superior al 98.9 %, las cepas R-677 y R-719 pertenecientes a este cluster se les secuenció el primer y tercer tercio del 16S rARN, la similitud fue mayor al 98.9 % con respecto a la cepa tipo. Tres cepas identificadas como *V. chagasii* se alojaron en otros clusters: CAIM 1066 alojada en el cluster 7, CAIM 1130 en el cluster 20 y CAIM 1165 en el cluster 5, estas cepas mostraron una alta similitud (47.0 %, 51.7 % y 47.7% respectivamente) a los clusters que identificaron a esta especie por (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Otras 22 cepas identificadas como *V. chagasii* no se agruparon a ningún cluster, cayeron dispersas en todo el dendrograma, a tres de estas cepas les fue secuenciado el primer tercio 16S rARN mostrando una alta similitud (99 %) a la cepa tipo y el resto pudieron ser identificadas con la base de datos completa.

Se registró luminiscencia en siete cepas identificadas como *V. chagasii* (R-467, R-499, R-506, R592, R599, R-670 y R-693).

*V. chagasii* se aisló en todas las zonas de cultivo, en el noroeste mexicano se aislaron 13 cepas de BCII, siete de BCS, cuatro de BCI, tres de SIN, SONIII y SONIV respectivamente, en la zona SONI sólo se aisló una cepa. Mientras que en el delta del Ebro esta especie fue una de las más predominantes representando el 29 % (60 cepas) del total de las cepas identificadas en la zona ALF, y el 52 % (119 cepas) del total de cepas identificadas en la zona FAN.

*V. chagasii* fue descrita hace poco tiempo por Thompson *et al.* (2003b), los autores mencionan que esta especie tiene una similitud en la secuencia del 16S rARN mayor al 99 % con *V. kanaloae* y *V. pomeroyi* y por AFLP mayor al 97.4 %, mostrando las tres especies una fuerte similitud a *V. splendidus*. Sin

embargo, el estatus de nueva especie se lo dio la hibridación ADN-ADN mostrando una similitud del 72 % con *V. kanaloae* y *V. pomeroyi*, y menor al 65 % con otras especies de vibrios. Esto explica la heterogeneidad que presenta *V. chagasii* en este análisis, esta heterogeneidad también fue observada cuando miembros de esta especie fueron analizados por AFLP (Thompson *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2003b). Los resultados de este estudio sugieren que probablemente *V. chagasii* está compuesta por una o varias subespecies.

***V. coralliilyticus*** (grupo G). Una cepa (R347) fue aislada de ALF. La identificación se realizó con toda la base de datos. Esta especie es un patógeno de coral (*Pocillopora damicornis*) causando daño del tejido en el hospedero cuando la temperatura sobrepasa los 25 °C, se ha reportado que la bacteria esta presente en diferentes hospederos, incluyendo larvas de bivalvos (Ben-Haim *et al.*, 2003).

***V. cyclotrophicus*** (cluster 2). Nueve cepas fueron identificadas, de éstas siete cepas formaron el cluster 2. Sin embargo, dos cepas se alojaron en el cluster 31 el cual se identificó como *V. chagasii*. La identificación de *V. cyclotrophicus* se realizó con toda la base de datos mostrando una fuerte similitud por (GTG)<sub>5</sub>-PCR y formando en ese análisis un solo cluster.

Todas las cepas fueron aisladas del noroeste mexicano: tres cepas de la zona SONIII, dos en BCS y una en BCI, BCII, SIN, SONII.

***V. fortis*** (clusters 20 y 22). 17 cepas formaron 2 clusters, cada uno con una cepa de referencia; CAIM 631 (=LMG 21560) en el cluster 20, y CAIM 633 (=LMG 21562) en el cluster 22. La inclusión de la cepa tipo CAIM 629<sup>T</sup> (=LMG 21557<sup>T</sup>) no mejoró la resolución de estos clusters, por lo contrario, la cepa tipo no se alojó en ningún cluster.

*V. fortis* ha sido reportada como una especie genotípicamente variable formando 2 clusters en análisis por AFLP (Thompson *et al.*, 2003a). Los mismos resultados que se reportan en este trabajo se observaron con cepas aisladas de pargo cuando fueron analizadas por (GTG)<sub>5</sub>-PCR (Gomez-Gil *et al.*, 2006, en prensa). *V. fortis* y *V. pelagius* son especies relacionadas por el gen 16S rARN (98.8 %) y por hibridación ADN-ADN (65 %) (Thompson *et al.*, 2003a). Los resultados de este estudio y los de Gomez-Gil *et al.* (2006, en prensa), sugieren que es indispensable la realización de más análisis de tipificación e hibridación DNA-DNA con más cepas que esclarezca si este taxón se encuentra formado por una nueva especie o por una subespecie.

*Vibrio fortis* se aisló en tres zonas del noroeste mexicano: dos cepas en la zona SIN, una en SONI y SONIII. Mientras que en el delta del Ebro se aislaron cinco cepas en la zona ALF y ocho en FAN.

***V. gigantis*** (clusters 1 y 9; grupo Q). 10 cepas fueron identificadas formando dos clusters y un grupo; seis cepas formaron el cluster 1, del cual se seleccionó una cepa (CAIM 1129) para secuenciarle el primer tercio del 16S rARN mostrando una similitud del 99.1 % con la cepa tipo de *V. gigantis* (CAIM 25<sup>T</sup> = LMG 22741<sup>T</sup>). Las dos cepas que formaron el cluster 9 fueron secuenciadas del 16S rARN: a CAIM 1441 el primer tercio y CAIM 1442 el primer y tercer tercio, ambas mostraron una similitud del 100 % con respecto a la cepa tipo. Las cepas CAIM 1099 y CAIM 1481 no se agruparon a ningún cluster alojándose en el grupo Q. Sin embargo todas estas cepas formaron un solo clusters consistente cuando fueron analizadas con toda la base de datos.

*V. gigantis* es muy similar a *V. splendidus* (>98 % en el gen 16S rARN) (Le Roux *et al.*, 2005). Sin embargo, otros estudios han demostrado que técnicas de tipificación como AFLP logra diferenciar fácilmente *V. gigantis* de las especies más cercanas de vibrios (Thompson *et al.*, 2001).

La secuencia del gen 16S rARN de la cepa tipo que describe a la *V. gigantis* se reportó incompleta en la base de datos de GenBank, lo que dificultó la identificación, debido a que la región faltante muestra una región variable importante, por lo que en este estudio se secuenció nuevamente todo el gen 16S rARN de la cepa tipo *V. gigantis* (CAIM 25<sup>T</sup> = LMG 22741<sup>T</sup>).

Esta especie ha sido aislada de ostiones enfermos cultivados en el norte de Francia y reportada como causante de mortalidades en *C. gigas* (Le Roux *et al.*, 2004), sin embargo su acción patológica aún no ha sido del todo esclarecida. Esta especie sólo se aisló en el noroeste mexicano: seis cepas en la zona BCI, dos en BCII y una en SONIII.

***V. harveyi*** (Cluster 30). Se identificaron 65 cepas, la mayoría se agruparon en el cluster 30 (60 cepas) en el que también se incluyeron la cepa tipo (CAIM 513<sup>T</sup> = LMG 4044<sup>T</sup>) y dos cepas de referencia (CAIM 330 = LMG 7890, CAIM 529 = LMG 19643<sup>T</sup>). La cepa CAIM 1095 se alojó en el cluster 8 y la R611 en el cluster 32, tres cepas no se agruparon en ningún cluster (CAIM 1614 en el grupo E, CAIM 1091 en el grupo I y R380 en el grupo J), estas cinco cepas se agruparon en el cluster que identifica a *V. harveyi* cuando se analizaron con toda la base de datos.

*V. harveyi* sólo se aisló en seis zonas del noroeste mexicano: dos cepas en BCI, una en BCII, seis en SIN, cuatro en SONI, dos en SONII y cuatro en SONIV. Mientras que en el delta del Ebro se aislaron en ambas zonas: 15 cepas en ALF y 34 en FAN.

*Vibrio harveyi* ha sido frecuentemente aislada de moluscos bivalvos (incluyendo *C. gigas*) durante el verano en la costas españolas del mar mediterráneo (Arias *et al.*, 1999; Pujalte *et al.*, 1999). Esta especie es uno de los principales

patógenos de camarones (principalmente *Litopenaeus vannamei*), causando también mortalidades en los estadios larvarios de peces y moluscos (Thompson *et al.*, 2004a). Recientemente, esta especie fue aislada hígado, riñón, bazo de pargos sanos y de lesiones externas de pargos enfermos capturados en el noroeste mexicano (Gomez-Gil *et al.*, 2006, en prensa). Sin embargo, la acción patológica de esta especie sobre *C. gigas* es muy poco conocida.

***V. mediterranei*** (clusters 24, 26 y 27). Se identificaron 45 cepas distribuidas en tres clusters principales: cuatro cepas en el cluster 24, 16 en el cluster 26; del cual se seleccionaron dos cepas (R-841 y R-606) para secuenciar el primer tercio del 16S rARN; ambas secuencias mostraron una similitud del 99.3 % con la cepa tipo (CAIM 316<sup>T</sup> =LGM 11258<sup>T</sup>) quien describe a esta especie, y en el cluster 27 se agruparon 23 cepas; en este cluster también se agrupó la cepa tipo CAIM 316<sup>T</sup> =LGM 11258<sup>T</sup>. Dos cepas cayeron en otros clusters, sin embargo estas se agruparon mostrando una fuerte similitud por (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Se registró luminiscencia en una cepa (R-606).

Esta especie fue aislada de todas la zonas estudiadas: dos cepas se aislaron en BCI, tres en BCII, seis en BCS, dos en SIN, dos en SONI, cinco en SONII, dos en SONIII y tres en SONIV, esto en el noroeste mexicano. Mientras que el delta del Ebro se aislaron 14 cepas en ALF y seis en FAN. Esta especie ha sido frecuentemente aislada en las costas del mediterráneo durante el verano (Arias *et al.*, 1999; Pujalte *et al.*, 1999). Recientemente se aislaron cuatro cepas de pargos en el noroeste mexicano (Gomez-Gil *et al.*, 2006, en prensa). Esta especie también ha sido reportada como causante de blanquecimiento del coral, dependiendo su patogenicidad de la temperatura (Thompson *et al.*, 2004a)

***V. neptunius*** (cluster 19). Se identificaron siete cepas, en el cluster se agrupó la cepa tipo (CAIM 532<sup>T</sup> =LMG 20536<sup>T</sup>) que describe a la especie, también se secuenció el primer tercio del 16S rARN de dos cepas (CAIM 356 y CAIM 358) ambas mostraron una similitud del 100 % y 99.7%, respectivamente, con la cepa tipo. Todas las cepas fueron aisladas en la zona ALF, no se identificó esta especie en ninguna otra de las zonas estudiadas. Esta especie ha sido identificada recientemente por Thompson *et al.* (2003c), los autores la aislaron de rotíferos (*Brachionus plicatilis*), larvas de bivalvos (*Nodipecten nodosus*) y larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

***V. parahaemolyticus*** (cluster 21). Se identificaron siete cepas, en el cluster formado se alojó la cepa tipo (CAIM 320<sup>T</sup> =LMG 2850<sup>T</sup>) que describe a esta especie. Esta especie sólo se aisló en el noroeste mexicano: tres cepas en la zona BCI, dos en BCII y dos en SIN.

*V. parahaemolyticus* se encuentra ampliamente distribuida en ambientes marinos y estuarinos, y ha sido reportada como parte de la flora bacteriana normal de un gran número de especies marinas, incluyendo *C. gigas* (DePaola *et al.*, 1990; DePaola *et al.*, 2000). La población microbiana de esta especie se ve afectada por cambios en la temperatura, salinidad, disposición de nutrientes y la asociación con organismos marinos (Heitmann *et al.*, 2005).

Esta especie es ampliamente conocida por su patogenicidad en humanos, provocando principalmente gastroenteritis, sin embargo, la posesión de dos genes (*tdh* y *trh*) le confieren esta propiedad (Marshall *et al.*, 1999; FDA, 2000). Se ha reportado que *C. gigas* es uno de los principales vectores de la enfermedad debido principalmente al consumo crudo de este molusco (FDA, 2000).

En el 2003 y 2004 se reportaron más de 1230 casos de gastroenteritis en el sur del estado de Sinaloa, provocada por la ingesta de camarón crudo o mal cocido procedente del complejo lagunar Huizache-Caimanero, en el mismo estado (Cabanillas *et al.*, 2006). Los mismos autores demostraron que el agente causal de esta enfermedad fue la cepa pandémica O3:K6 *V. parahaemolyticus*.

Aunque muchos autores reportan a *C. gigas* como uno de los principales vectores de este patógeno a humanos, en la región no se han reportado casos de intoxicación por el consumo de este molusco, probablemente debido a que en la región la ostricultura en este complejo lagunar no es actividad comúnmente practicada. Por otro lado, es claro que en los ostiones analizados en este estudio, esta especie fue una de las menos frecuentes y la cepa pandémica no se registró, por lo que la probabilidad de una intoxicación por el consumo de este molusco es relativamente baja, sin embargo, es de vital importancia mantener un constante monitoreo de este patógeno en la región.

Esta especie no se registró en los ostiones cultivados en el delta del río Ebro, sin embargo, varios autores han reportado que *V. parahaemolyticus* ha sido aislado, aunque no con mucha frecuencia, de ostiones cultivados en el delta del Ebro durante el verano (Montilla *et al.*, 1994; Montilla *et al.*, 1995; Arias *et al.*, 1999; Pujalte *et al.*, 1999). Algunos autores coinciden en que la baja presencia de *V. parahaemolyticus* en ostiones y agua de las costas del mar Mediterráneo, se debe principalmente a que la salinidad de este es alta, en comparación a los sistemas estuarinos preferentes por esta especie (Arias *et al.*, 1999; Pujalte *et al.*, 1999).

***V. ponticus*** (clusters 8 y 14). Se identificaron seis cepas; en el cluster 8 se agruparon dos cepas, también se alojó la cepa tipo (CAIM 1731<sup>T</sup> =CECT 5869<sup>T</sup>) que describe a la especie; en el cluster 14 se agruparon cuatro cepas de las

cuales a una cepa (R-306) se le secuenció el primer tercio del 16S rARN mostrando un similitud del 99.7 % con la cepa tipo. Esta especie se aisló en dos zonas: en la zona ALF se aislaron cuatro cepas, mismas que formaron el cluster 14 y dos cepas que fueron aisladas de SON IV las cuales formaron el cluster 8.

Gomez-Gil *et al.* (2006, en prensa), aislaron bacterias de pargos identificándola como *V. ponticus* por 16S rARN (98.7 %). Sin embargo, *V. ponticus* es una especie que se describió recientemente por Macián *et al.* (2004), los autores la aislaron de agua de mar, mejillón y dorada (*Sparus aurata*) en las costas del mar mediterráneo de España. Los autores mencionan que esta especie tiene una similitud en el gen 16S rARN con *V. fluvilis* y *V. furnissii* del 97.1 % y 97.3 %, respectivamente. Sin embargo, mostró una baja similitud en la hibridación ADN-ADN, menor al 17 %. La fuerte similitud en el 16S con otras especies de vibrios y la formación de dos clusters por (GTG)<sub>5</sub>, hacen necesario la realización de otras técnicas de tipificación sobre más cepas identificadas como *V. ponticus*, para esclarecer si las cepas aisladas en el noroeste mexicano son una especie nueva o una subespecie.

***V. rotiferianus*** (clusters 7, 11 y 28). Se identificaron 113 cepas distribuidas en tres clusters: en el cluster 7 se agruparon 17 cepas, en el cluster 11 se agruparon tres cepas, y en el cluster 28 se agruparon 81 cepas; de este último se seleccionó una cepa (CAIM 1445) para secuenciar el primer tercio del 16S rARN mostrando una similitud del 99.5 %, además aquí se alojó la cepa tipo (CAIM 577<sup>T</sup> =LGM 21460<sup>T</sup>). 12 cepas cayeron dispersas en diferentes grupos (A, E, F, G, I, J y L) toda ellas mostraron una fuerte similitud (>42) por (GTG)<sub>5</sub>-PCR. *V. rotiferianus* es muy similar (16S rARN) a *V. campbellii* (99.8 %) y *V. harveyi* (99.1 %) (Gomez-Gil *et al.*, 2003). Sin embargo, técnicas de tipificación genómica como rep-PCR y FAFLP pueden distinguir claramente estos taxa (Gomez-Gil *et al.*, 2004). Los resultados de este estudio demuestran que estos

taxa pueden ser diferenciados por (GTG)<sub>5</sub>-PCR, sin embargo, la formación de varios clusters y el que varias cepas hayan distribuido en varios grupos del dendrograma sugieren que probablemente esta especie puede estar compuesta de una o varias subespecies.

Se registró luminiscencia en cinco cepas identificadas como *V. rotiferianus* (CAIM 1117, R 311, R-377, R-575 y R-683).

Esta especie se aisló en casi todas las zonas de estudio: tres cepas en BCI, siete en BCII, cuatro en BCS, nueve en SIN, tres en SONI, una en SONII y dos en SONIV. En el delta del Ebro fue una de las especies que más se identificó; en ALF el 26 % (53 cepas) de las cepas, mientras que en el FAN fue el 14 % (31 cepas) de total de las cepas identificadas en esta zona.

***V. splendidus*** (cluster 3). Se identificaron tres cepas, se secuenció el primer tercio del 16S rARN de una de estas cepas (CAIM 1479) mostrando una similitud del 98.9 % con respecto a la cepa tipo (CAIM 319<sup>T</sup> =LGM 19031<sup>T</sup>). Dos cepas se aislaron de la zona BCI y una de SONIII.

*V. splendidus* ha sido responsable de severas mortalidades de *C. gigas* (10 al 80 % del stock de producción) en el norte de Francia durante todos los veranos de la última década (Lacoste *et al.*, 2001).

En los 90's se reportaron mortalidades masivas de ostión en el estado de Baja California Sur y Sonora (Cáceres-Martínez, 2003). Los esfuerzos que se hicieron para esclarecer la causa de las mortalidades fueron insuficientes, sólo se reportaron dos trabajos por Vazquez-Yeomans *et al.*, (2004a; 2004b), en los que los autores no pudieron esclarecer el agente causal de las mortalidades. La presencia reportada en este estudio de *V. splendidus* en *C. gigas* cultivado en el

norroeste mexicano puede servir como un elemento importante para elucidar estas mortalidades. Sin embargo, actualmente no se encontraron estudios que reporten mortalidades anormales en los cultivos de ostión del norroeste mexicano.

*V. xuii* (cluster 18). Sólo se identificó una cepa (CAIM 1485), la cepa tipo (CAIM 467<sup>T</sup> = LMG 21346<sup>T</sup>) que describe a la especie mostró una similitud del 62.1 % por (GTG)<sub>5</sub>-PCR. La cepa se aisló en la zona BCS. Esta especie ha sido aislada recientemente de moluscos bivalvos (Thompson *et al.*, 2003c).

#### Especies de Vibrios Potencialmente Nuevas

*Vibrio* sp. nov. 1 (cluster 6). Se identificaron 31 cepas, las cuales formaron un cluster de 27 cepas del cual se seleccionaron tres cepas a las que se les secuenció el gen 16S rARN completo (CAIM 1569, 98.3 % y CAIM 1683, 98.1 %, CAIM 1653, 98.8 %), a otra cepa se le secuenció el primer tercio (CAIM 1621, 97.2 %). Todas estas secuencias fueron comparadas con la que propone como tipo (CAIM 48<sup>T</sup>, aislada de agua de mar en Mazatlán, Sinaloa). La cepa tipo propuesta para la descripción de esta especie tiene una similitud en el 16S rARN del 98.1 % con *V. alginolyticus* / *V. parahaemolyticus* (Gomez-Gil *et al.*, 2006 en prensa). La cepa CAIM 1683 es propuesta como cepa de referencia. Cuatro cepas se alojaron en los grupos R y T, pero mostraron una fuerte similitud por (GTG)<sub>5</sub>-PCR.

Todas las cepas fueron aisladas de casi todas las zonas de estudio del norroeste mexicano: una cepa se aisló en BCI, seis en BCS, seis en SIN, ocho en SONI, tres en SONII, dos en SONIII y una en SONIV. Del delta del Ebro se aislaron cuatro cepas, dos en ALF y dos en FAN.

***Vibrio* sp. nov. 4** (cluster 13). Sólo se identificó una cepa (R-397) cuando se analizó con la base de datos completa. R-397 mostró una similitud del 50.0 % por (GTG)<sub>5</sub>-PCR con las cepas CAIM 1349 y CAIM 1565 que fueron aisladas de pargos, e identificada como una especie potencialmente nueva (*Vibrio* sp. nov. 4) (Gomez-Gil *et al.*, 2006, en prensa). La cepa R397 fue aislada en la zona ALF, en el delta del Ebro.

***Vibrio* sp. nov. 5** (cluster 16). Se identificaron cuatro cepas, la cepa CAIM 1437<sup>T</sup> propuesta como cepa tipo tiene una similitud en el 16S rARN del 97.0 % con *V. hispanicus* (CAIM 525<sup>T</sup> =LGM 13240<sup>T</sup>). Las cepas fueron aisladas del noroeste mexicano: tres cepas de la zona SONIII y una de SONI.

***Vibrio* sp. nov. 6** (cluster 17 y cluster 25). Se identificaron 5 cepas, las cuales formaron dos clusters: el cluster 17 con dos cepas y el 25 con tres cepas. De este último se secuenció la cepa R339<sup>T</sup> propuesta como cepa tipo mostrando una similitud del 98.5 % con *V. mediterranei* (CAIM 316<sup>T</sup> =LGM 11258<sup>T</sup>). (GTG)<sub>5</sub>-PCR diferenció claramente *Vibrio* sp. nov. 6 de *V. mediterranei*. Todas las cepas fueron aisladas en la zona ALF, en el delta del Ebro.

### ***Vibrio* sp.**

Noventa y dos cepas sólo fueron identificadas como pertenecientes al género *Vibrio*. La mayoría formaron grupos en el dendrograma, sin embargo varias cepas se alojaron en diversos clusters mostrando una baja similitud (GTG)<sub>5</sub>-PCR con las cepas que formaron esos clusters, lo mismo se observó cuando se analizaron con toda la base de datos. Sin embargo, estas cepas generaron un patrón de bandas mayor a nueve por (GTG)<sub>5</sub>.

En este análisis se observó que cuando existen pocos genotipos de una especie en la base de datos su identificación se complica, por que no se forman

clusters consistentes de esos taxa, sin embargo, cuando incrementa el número de genotipos en la base de datos, muchas especies que aún no se han identificado empiezan a formar cluster consistentes. Es probable que muchos de estos taxa que se identificaron como *Vibrio* sp. pertenezcan a especies ya descritas o sean taxa que aún no han sido descritos, por lo que es necesario analizarlos con otros métodos de tipificación para elucidar su posición taxonómica.

#### **Cepas que No Pertenecen a la Familia Vibrionaceae**

Estas cepas no se incluyeron en el dendrograma. 15 cepas se identificaron como *Shewanella* sp., las cuales formaron un cluster cuando fueron analizadas con toda la base de datos. De estas se secuenciaron tres cepas (CAIM 1600, CAIM 1663 y CAIM 1680) las cuales mostraron una similitud del 98.4 % con *Shewanella algae* en el primer tercio del 16S rARN. Todas fueron aisladas del noroeste mexicano: 11 cepas en la zona SON, tres en BCI y una en BCS.

#### **Cepas No Identificadas.**

Doce cepas no pudieron ser identificadas. De las cuales ocho fueron Gram positivas (CAIM 1050, CAIM 1093, CAIM 1157, CAIM 1170, CAIM 1209, CAIM 1550, CAIM 1560 y CAIM 1590). Cuatro cepas no pudieron ser tipificadas CAIM 1132, CAIM 1315, CAIM1227 y CAIM 1308.

## CONCLUSIONES

La técnica de tipificación empleada en este estudio reveló que las especies presentes como parte de la flora normal de *C. gigas* son: *P. damselae*, *V. alginolyticus*, *V. brasiliensis*, *V. campbellii*, *V. chagasii*, *V. coralliilyticus*, *V. cyclotrophicus*, *V. fortis*, *V. harveyi*, *V. gigantis*, *V. mediterranei*, *V. neptunius*, *V. parahaemolyticus*, *V. ponticus*, *V. rotiferianus*, *V. splendidus*, *V. xuii*, *Shewanella* sp. y cinco especies potencialmente nuevas: *Vibrio* sp. nov. 1, *Vibro* sp. nov. 4, *Vibrio* sp. nov. 5, *Vibrio* sp. nov. 6 y *Photobacterium* sp. nov. 1.

Las especies de la familia Vibrionaceae amplifican un promedio de 19 bandas (n = 639) con un peso promedio de 1,414 pb (n= 12,638) cuando son caracterizadas por rep-PCR empleando en iniciador (GTG)<sub>5</sub>.

Se identificaron 22 especies de la familia Vibrionaceae representadas por 639 cepas de las cuales 20 son *Vibrio* y dos son *Photobacterium*; 18 especies se identificaron en el noroeste mexicano y 13 especies en el delta del río Ebro. Las granjas del noroeste mexicano que mostraron la mayor riqueza específica (12 especies) fueron Ostrícola Guevara S. A. de C.V. ubicada en la Cruz de Elota, Sinaloa y Agromarinos S. A. de C. V. ubicada en San Quintín, Baja California. La zona con mayor riqueza encontrada en este estudio fue la bahía de Alfacs con 13 especies identificadas, ubicada en el delta del río Ebro en Cataluña, España. Mientras que la zona más pobre fue el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora ubicado en Bahía de Kino con siete especies.

Los ostiones cultivados en granjas ostrícolas del noroeste mexicano comparten nueve especies de vibrios con los cultivados en el delta del río Ebro: *V. campbellii*, *V. chagasii*, *V. fortis*, *V. harveyi*, *V. mediterranei*, *V. ponticus*, *V. rotiferianus* y *Vibrio* sp. nov. 1. En el noroeste mexicano se identificaron nueve especies pertenecientes a Vibrionaceae: *P. damsela*, *Photobacterium* sp. nov. 1, *V. brasiliensis*, *V. cyclitrophicus*, *V. gigantis*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *Vibrio xuii*, *Vibrio* sp. nov. 5 y una a *Shewanella* sp., que no se identificaron en el delta del Ebro. Mientras que en los aislados bacterianos de ostiones cultivado en el delta del río Ebro se identificaron cuatro especies de vibrios: *V. coralliilyticus*, *V. neptunius*, *Vibrio* sp. nov. 4 y *Vibrio* sp. nov. 6 que no fueron identificadas en el noroeste mexicano.

De las 18 especies de bacterias aisladas en el noroeste mexicano e identificadas como pertenecientes a la familia Vibrionaceae 13 especies se identificaron durante el verano e invierno, mostrando mayor abundancia durante el verano, sin embargo, *V. alginolyticus*, *Vibrio* sp. nov. 1 y *Vibrio* sp. nov. 5 mostraron ser más abundantes durante el invierno.

Se identificaron tres taxa potencialmente nuevos empleando (GTG)<sub>5</sub>-PCR y el análisis de la secuencia del gen 16S rARN. El análisis filogenético del 16S rARN muestra que *Vibrio* sp. nov. 5 (CAIM 1437<sup>T</sup>) tiene una similitud del 97.0 % con *V. hispanicus* (AY254039) del 97.0 %, mientras que, *Vibrio* sp. nov. 6 (R-339<sup>T</sup>) tiene una similitud con *V. mediterranei* (X74710) del 98.5 %, aunque es alta la similitud (GTG)<sub>5</sub>-PCR tiene el poder para diferenciarlas claramente. *Photobacterium* sp. nov. 1 (CAIM 1439<sup>T</sup>) tiene una similitud con *P. frigidiphilum* (AY538749) del 97.0 %. Estos taxa potencialmente nuevos demuestran que la

flora bacteriana de *C. gigas* tienen especies o subespecies que aún no han sido descritos.

Los ostiones cultivados las ocho granjas ostrícolas y en las dos bahías del delta del Ebro analizadas en este estudio, no revelan la presencia de vibrios potencialmente patógenos en humanos. Sin embargo, es recomendable realizar estudios enfocados en la presencia de estos patógenos en organismos cultivados en ambas regiones geográficas.

## RECOMENDACIONES

Es necesario realizar más estudios sobre la presencia de organismos patógenos en el noroeste mexicano y en el delta del río Ebro, en los que se indague si la presencia de éstos es un riesgo a la industria ostrícola o si representan un riesgo a la salud pública. Debido a que ambas regiones geográficas son importantes zonas de producción y consumo de este molusco bivalvo.

Se necesario realizar las pruebas pertinentes a las cepas potenciales nuevas especies reportadas en este estudio con el fin de esclarecer su posición filogenética dentro de la familia Vibrionaceae.

REFERENCIAS

- Arias C. R., Macián M. C., Aznar R., Garay E. & Pujalte M. J.** 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. *Journal of Applied Microbiology* **86**:125-134.
- Austin B.** 1988. *Marine microbiology*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Bautista C.** 1989. *Moluscos: Tecnología de cultivo*. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- Belkum V. A., Struelens M., Visser A., Verbrugh H. & Tibayrenc.** 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical Microbiological Reviews*. **14**:547-560
- Ben-Haim Y., Thompson F. L., Thompson C. C., Cnockaert B. H. M. C., Swings J. & Rosenbeg E.** 2003. *Vibrio corallilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology* **53**:309-315.
- Berthe F.** 2006. Report about mollusc diseases. IFREMER, Institut Français de Recherche pour l' Exploitation de la Mer, Centre de Nantes, Département des Ressources Aquacoles, Rue du Mus du Loup, 17390 Ronce-les-Bains, France.  
[www.ressources.ciheam.org/om/pdf/b49/04600219.pdf](http://www.ressources.ciheam.org/om/pdf/b49/04600219.pdf)

- Blake J., Weaver R. E., & Hollis D. G.** (1970) Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Reviews of Microbiology*. **34**: 361-367.
- Bower S. M., McGladdery S. E. & Price I. M.** 1994. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*. **4**:1199.
- Cabanillas B. H.** 2005. Evaluación a la exposición a *Vibrio parahaemolyticus* patógeno por consumo de mariscos crudo en el Noroeste de México. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Pág. 137.
- Cabanillas-Beltrán H., LLausás-Magaña E., Romero R., Espinoza A., García-Gasca A., Nishibuchi M., Ishibashi M. & Gomez-Gil B.** 2006. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en México. *FEMS Microbiology Letters*. **265**:76-80.
- Cáceres-Martínez J. & Vázquez-Yeomans R.** 2003. Erosión Branquial en el Ostión Japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el NW de México. *Boletín del PRONALSA* 15-18.
- Colwell R. R. & Liston J.** 1959. Bacteriological study of the natural flora of pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Microbiology of Shellfish* **8**:104-109.
- Colwell, R. R.** 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*. **104**:410-433.

- DePaola A., Hopkins L. H., Peeler J. T., Wentz B. & McPhearson R. M. 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**:2299-2302.
- DePaola A., Kaysner C. A., Bowers J. & Cook D. W. 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 4649-4654.
- DePaola A., Ulaszek J., Kaysner C. A., Tenge B. J., Nordstrom J. L., Wells J., Pühr N. & Gendel S. M. 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3999-4005.
- DHHS. 1999. *Vibrio* surveillance system, summary data, 1997-1998. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
- Doll L., Moshitch S. & Frankel G. 1993. Poly(GTG)<sub>5</sub> associated profiles of *Salmonella* and *Shigella* genomic DNA. *Research in Microbiology*. **144**: 17-224
- Doolittle W. F. 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*. **284**:2124-2128.
- Dumontet S., Krovacek K., Svenson S. B., Pasquale V., Baloda S. B. & Figliuolo G. 2000. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* sp. in coastal waters of Southern Italy. *Comparative immunology, Microbiology and Infections Diseases* **23**:72.

- Dvorská L., Bartos M., Martin G., Elver W. & Pavlík I.** 2001. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. *Veterinary Medicine*. **46**:309-328.
- Elston A. P.** 1990. Mollusc diseases. Guide for the shellfish farmer. University of Washington. USA.
- Faisal M., MacIntyre E. A., Adham K. G., Tall B. D., Kothary M. H. & La Peyre J. F.** 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **121**:168.
- Fallarino A., Attridge S. R., Manning P. A. & Focareta T.** 2002. Cloning and characterization in *Vibrio cholerae* 01 that does not directly contribute to the virulence of the organism. *Microbiology*. **148**: 2181-2189.
- FAO.** 2003. Anuario de estadísticas de pesca. Capturas y Acuicultura. Vol.96/1
- Finkelstein R., Edelstein S. & Mahamid G.** 2002. Fulminant wound infections due to *Vibrio vulnificus*. *The Israel Medical Association Journal*. **4**:654-655.
- Gallo M. C., García-Ulloa M., Godínez D. & Rivera K.** 2001. Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. *Universidad y Ciencia*. **17**:83-91.
- Gay M., Berthe F. & Le Roux F.** 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **59**:49-56.

- Gay M., Renault T., Pons A. M. & Le Roux F.** 2004b. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alteration. *Diseases of Aquatic Organisms* **62**:65-74.
- Gevers D., Huys G. & Swings J.** 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* **205**:31-36.
- Gevers D., Cohan F. M., Lawrance J. G., Spratt B. G., Coenye T., Fiel E. J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F. L. & Swings J.** Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*. 2005. **3**:733-739.
- Gomez-Gil B., Thompson F. L., Thompson C. C. & Swings J.** 2003. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**:239-243.
- Gomez-Gil B., Soto-Rodríguez S., García-Gasca A., Roque A., Vazques-Juarez R., Thompson F. L. & Swings J.** 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* **150**:1769-1777.
- Gomez-Gil B. & Roque A.** 2006. Isolation, Enumeration, and Preservation of the Vibrionaceae , p. 15-24. En F.L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (eds.), *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington D.C.
- Gomez-Gil B., Fajer-Avila E. & García-Vargas F.** 2006. Vibrios of the spotted rose snaper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. *Journal of Applied Microbiology*. En prensa.

- Griffing D. W., Donaldson K. A., Paul J.H. & Rose J. B.** 2003. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. *Clinical Microbiology Reviews* **16**:129-143.
- Guerra, A.** 2002. La ostricultura. Técnicas de producción, p. 37-72. *In* Elisa Polanco (ed.), Impulso, desarrollo y potenciación de la ostricultura en España. Madrid.
- Gürtler, V. & Mayall B. C.** 2001. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**:3-16.
- Healy M., Huang J., Bittner T., Lising M., Frye S., Raza S., Schrock R., Manry J., Renwick A., Nieto R., Woods C., Versalovic J. & Lupski R.** 2005. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**:199-207.
- Heitmann I., Jofré L., Hormázabalo J.C., Olea A., Vallebuona C. & Valdés C.** 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infectología*. **22**:131-140.
- Hernandez-Zarate G. & Olmos-Soto J.** 2006. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* **100**:664-672.
- Holt J. G., Krieg R. N., Sneath P. H. A., Staley J. T. & Williams S. T.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Ed. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland, USA. Pag. 190-194.

- Kosman E. & Leonard K. J.** 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid and polyploid species. *Molecular Ecology* **14**:415-424.
- Kuninaga S.** 1996. DNA base sequence complementary analyses. Pag. 73-80. En: Sneh, B., Jabaji-Hare S., Neate S., Dijst G. Kluwer (Eds)., *Rhizoctonia Species. Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Academic Publishers. London.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gélébart F., Cordevant C., Lange M. & Poulet S. A.** 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*. **46**:145.
- Lambert C., Nicolas J. L. & Bultel V.** 2001. Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. *Journal of Invertebrate Pathology*. **77**:165-172.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Jean-Louis N. & Berthe F.** 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostreae gigas* mortality events. *Aquatics Living Resources* . **15**:251-258.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Jean-Louis N., Gouy M. & Berthe F.** 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms*. **58**:143-150.
- Le Roux F., Goubet A., Thompson F. L., Faury N., Gay M., Swings J. & Saulnier D.** 2005. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the

haemolymph of cultured oysters (*Crassostreae gigas*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **55**:2251-2255.

**Ludwig W. & Schleifer K. H.** 1999. Phylogeny of *Bacteria* beyond the 16S rRNA standard. ASM News. **65**:752-757.

**MacFadin J. F.** 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana, S. A. de C. V. Pág. 207-226.

**Macian M. C., Garay E., Grimont A. P. & Pujalte M. J.** 2004. *Vibrio ponticus* sp. nov., a neighbour of *V. fluvialis*-*V. furnissii* clade, isolated from gilthead sea bream, mussels and seawater. Systematic and Applied Microbiology. **27**:535-540.

**Macián M. C., Ludwig W., Aznar R., Grimont P., Schleifer K. H., Garay E. & Pujalte M. J.** 2001. *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **51**:1449-1456.

**Matté G. R., Matté M. H., Rivera I. G. & Martins M. T.** 1994. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from a tropical region. Journal of Food Protection. **57**:870-873.

**Montilla R., Palomar J., Santmarti M., Fuste C. & Viñas M.** 1994. Isolation and characterization of halophilic *Vibrio* from bivalves bred in nurseries at the Ebre delta. Journal of Invertebrate Pathology. **63**:178-181.

**Montilla R., Palomar J., Fuste C. & Viñas M.** 1995. Taxonomy and protein fingerprinting of halophilic *Vibrio* isolates from bivalves of the Ebre delta. Canadian Journal Microbiology. **41**:64-69.

- Moreno C. E.** 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T Manuales y Tesis SEA. Vol. 1. Zaragoza. Pág. 84.
- Morris C. E., Bardin M., Berge O., Frey-Klett P., Fromin N., Girardin H., Guinebretiére M-H., Lebaron P., Thiéry J. M. & Troussellier M.** 2002. Microbial Biodiversity: Approaches to Experimental Design and Hypothesis Testing in Primary scientific Literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **66**:592-616.
- Marshall S., Clark C. G., Wang G., Mulvey M., Kelly M. T. & Johnson W. M.** 1999. Comparasion of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology.* **37**:2473-2478.
- Newkirk, G.** 1993. Do aquaculture projects fail by design?. *World Aquaculture.* **24**:12-18
- Nishibuchi A.** 2006. Molecular Identification, p. 44-57. En F.L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (eds.), *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington D.C.
- Olive D. M. & Bean P.** 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology.* **37**:1661-1669.
- Paillard C., Le Roux F. & Borrego J. J.** 2004. Bacterial diseases in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquatic Living Resources.* **17**:477-498.
- Polanco E. & Corral M. A.** 2002a. La ostricultura en el mundo. Pág. 1-10. En Elisa Polanco (ed.), *Impulso, desarrollo y potenciación de la ostricultura en España*. Madrid.

- Polanco E. & Corral M. A.** 2002b. Biología: Análisis y desarrollo biológico. Pág. 11-31. En Elisa Polanco (ed.), Impulso, desarrollo y potenciación de la ostricultura en España. Madrid.
- Pujalte, M. J., Ortigosa M., Macian M. C. & Garay E.** 1999. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *International Microbiology*. 2:259-266.
- Rademaker J. L. W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Wings J. S, Auterin L., Vauterin P. & De Bruijn F. J.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:665-677.
- Rademaker J. L. W & De Bruijn F. J.** 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. En *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews*. G. Caetano-Anollés & P. M. Gresshoff. New York: John Wiley. Pag. 151-171.
- Raimondi F., Joseph P, Kao Y., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A. & Fasano A.** 2000. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermoestable direct hemolysin *in vitro* systems. *Infection and Immunity*. 68:3180-3185.
- Renault T., Le-Deuff R. M., Chollet B., Cochonnec N. & Gérard A.** (2000). Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42:173-183.

- Renault T. C., Lipart C. & Arzul I.** (2001). A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*. **24**:369-376.
- Roselló-Mora R. & Amann R.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**:39-67.
- Savkoul P. H. M., Aarts H.J., De Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J. L. W., Schouls L. & Lenstra J. A.** 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**:3083-3091.
- Sawabe, T., Thompson F. L., Heyrman J., Cnockaert M., Hayashi K., Tanaka R., Yoshimizu M., Hoste B., Swings J. & Ezura Y.** 2002. Fluorescent amplified fragment length polymorphism and repetitive extragenic palindrome-PCR fingerprinting reveal host-specific genetic diversity of *Vibrio haliotocoli*-like strains isolated from the gut of Japanese abalone. *Applied Environmental Microbiology*. **68**:4140-4144.
- Stackebrandt E. & Rainey F. A.** 1995. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. *Molecular Microbial Ecology Manual*. **3.1.1**:1-17.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A. D., Kämpfer P., Maiden M. C. J., Nesme X., Roselló-Mora R., Swings J., Trüper H. G., Auterin L. V., Ward A. C. & Whitman W. B.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:1043-1047.

- Stackebrandt E.** 2006. From species definition to species concept: population genetics is going to influence the systematics of Prokaryotes. <http://www.wfcc.info/NEWSLETTER/newsletter35/a1.pdf>
- Thompson, F. L., Hoste B., Vandemeulebroecke K. & Swings J.** 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology*. **24**:520-538.
- Thompson, F. L., Thompson C. C., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Gullian M. & Swings J.** 2003a. *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**:1495-1501.
- Thompson, F. L., Thompson C. C., Li Y., Gomez-Gil B., Vandenberghe J., Hoste B. & Swings J.** 2003b. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**:753-759.
- Thompson, F. L., Li Y., Gomez-Gil B., Thompson C. C., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Rupp G. S., Pereira A., De Bem M. M., Sorgeloos P. & Swings J.** 2003c. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**:245-252.
- Thompson F. L., Iida T. & Swings J.** 2004a. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**:403-431.

- Thompson, C. C., Thompson F. L., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Dawyndt P. & Swings J.** 2004b. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54**:919-924.
- Thompson F. L. & Swings J.** 2006. Taxonomy of the Vibrios. En F.L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (eds.). *The biology of Vibrios*. ASM Press, Washington, DC. Pag. 29-41.
- Urakawa H., Kita-Tsukamoto K. & Ohwada K.** 1997. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiology Letters*. **152**:125-132.
- Urakawa H. & Rivera I. N. G.** 2006. Aquatic Environment. En F.L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (eds.). *The biology of Vibrios*. ASM Press, Washington, DC. Pag. 175-189.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. & Swings J.** 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews* **60**:407-438.
- Vandenberghe J., Verdonck L., Robles-Arozarena R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., Gomez-Gil B., Calderon J., Zorrueles P. & Swings J.** 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:2592-2597.
- Vasconcelos G. J. & Lee S.** 2005. Microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Applied Microbiology*. **23**:11-16.

- Vázquez-Yeomans R. & Cáceres-Martínez J.** 2004a. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in México. *Journal of Shellfish Research*. **23**(2):417-419.
- Vázquez-Yeomans R., Cáceres-Martínez J. & Figueras A. H.** 2004b. Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. *Anales del Instituto de Biología* **75**:237-243.
- Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J. R.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. **19**:6823-6831.
- Versalovic J., Scheneider M., de Bruijn F. J. & Lupski J. R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. **5**:25-40
- Waechter M., Le Roux F., Nicolas J. L., Marissal E. & Berthe F.** 2002. Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Biologies*. **325**:231-238.
- Wong H. C. & Lin C. H.** 2001. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**:4233-4240.

# **ANEXOS**

Anexo 1

Ostrícola Guevara S. A. de C. V.

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en la granja "Ostrícola Guevara S. A. de C. V. ubicada en la Cruz de Elota, Sinaloa. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

CAIM	Acronimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
1209	CG 11(1)		No tipificado	2004	GTG5, Bioq	
1227	CG 7(4)		No tipificado	2004	GTG5	
1670	Cul 4 4 (2)		No tipificado	2004	GTG5	a
1206	CG 3(2)	15	<i>Photobacterium</i> sp. nov. 1	2004	GTG5, 16S C	v
1570	Cul G2 4(3)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	a
1571	Cul G2 2(2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	a
1591	Cul G 1(1)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	v
1592	Cul G 1 (2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	v
1630	Cul G 1a 1(3)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	a
1631	Cul G 1b 1(3)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	v
800	C-12(4)	10	<i>V. brasiliensis</i>	2003	GTG5	
804	C-12(4)	10	<i>V. brasiliensis</i>	2003	GTG5	
757	C-13(3) T	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	
1233	CG 2(1)	B	<i>V. campbellii</i>	2004	GTG5	a
1551	CulG2 2(1)	5	<i>V. campbellii</i>	2004	GTG5	v
1556	CulG2b 2(3)	4	<i>V. campbellii</i>	2004	GTG5	v
1557	CulG 3 4(1)	5	<i>V. campbellii</i>	2004	GTG5	v
1558	CulG1 1(4)	5	<i>V. campbellii</i>	2004	GTG5	v
755	C-10(3)	32	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5, Bioq	G-, Ox+, O/129(10ng; 7ml)(150ng; 10ml), OF++, Mott+
1186	CG 3(5)	W	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	v
1190	CG 11(3)	32	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	a

1187	CG 7(1)	2	<i>V. cyclitrophicus</i>	2004	GTG5	a
1204	CG 2(2)	22	<i>V. fortis</i>	2004	GTG5	v
1207	CG 3(3)	22	<i>V. fortis</i>	2004	GTG5	v
646	C-2(5)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	
803	C-10(4)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	
807	C-2(3)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	
1103	Cul 2(4)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	a
1228	CG 7(5)	30	<i>V. harveyi</i>	2004	GTG5	a
1627	Cul 2 2(4)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	a
805	C-13(1)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	
1188	CG 7(2)	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
645	C-2(2)	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2003	GTG5	
1205	CG 2(3)	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2004	GTG5	
291	C-2(1)	11	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	v
292	C-2(1)	11	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
644	C-13(5)	L	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
730	C-12(5) T	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
754	C-10(2) T	I	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
799	C-10(1)	L	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
801	C-13(2)	11	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
802	C-2(5)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
806	C-13(4)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
756	C-12(1) T		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	
794	C-12(3)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	
1104	Cul 10(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
1183	CG 2(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	v
1184	CG 2(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng; 13ml)(150ng; 19ml), OF++, Mot+
1185	CG 3(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng; 16ml)(150ng; 20ml), OF++, Mot+
1189	CG 11(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	a
1226	CG 3(1)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng; 6ml)(150ng; 15ml), OF++, Mot+
1229	CG 11(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng; 5ml)(150ng; 10ml), OF++, Mot+



**Ostrícola del Sol S. C. de R. L.**

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en la granja "Ostrícola del Sol S. C. de R. L." ubicada en Huatabampo, Sonora. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

Cepa	Acronimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
1068	H 2(3)a		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5, Bioq	G-, Ox+, O/129(10ng; 19ml)(150ng; 24ml), OF++, Mot+
1057	H 2(1)	F	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1058	H 5(5)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1073	H 4(3)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1074	H 5(1)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1041	H 5(3)	22	<i>V. fortis</i>	2003	GTG5	v
1075	H 5(2)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	v
1309	H 1(5)	A	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	v
1039	H 5(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1311	H 2(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1312	H 2(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1314	H 5(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1488	H 6(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1684	H 7 (3)a		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng; 17ml)(150ng; 20ml), OF++, Mot+
1685	H 7 (3)b		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1723	H 14(4) b		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1043	H 4(4)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v, Lum
1045	H 4(5)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v, Lum
1063	H 1(1)	4	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	a
1070	H 2(5)	A	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	a
1072	H 4(2)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	a
1066	H 1(5)	7	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	a
1065	H 1(4)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	a
1064	H 1(3)a	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a

1071	H 4(1)	7	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	a
1067	H 2(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
1310	H 2(1)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng, 10ml)(150ng, 15ml), OF++, Mot+
1313	H 2(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng, 16ml)(150ng, 20ml), OF++, Mot+
1069	H 2(4)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	a
1654	H 7(2)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1656	H 12 (3)a		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1657	H 12 (5)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1658	H 14 (2)b		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1661	H 12 (1)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1662	H 12 (4)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1663	H 12 (2)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5, 16S 1	v
1680	H 14 (1) b		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5, 16S 1	v
1678	H 14 (4) a	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	v
1721	H 4(3)a		No tipificadas	2004	GTG5	a
1721	H 4(3)a		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	a
1712	H 14 (3)b	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	a
1659	Cul 2(4)	30	<i>V. harveyi</i>	2004	GTG5	a
1652	H 7(1) a	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	a
1679	H 14 (1) a	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	a
1681	H 7(4) b	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	a
1682	H 7(4)a	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	a
1683	H 1(5)a	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5, 16S 1	a
1653	H 7(1) b	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5, 16S 1	a
1308	H 1(1)		No tipificadas	2003	GTG5	a-v
1315	H 6(4)		No tipificadas	2003	GTG5	
1047	H 1(2)	1	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	
1035	H 1(3)b	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	
1048	H 2(3)b	G	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
1678	H 14 (4) a		<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	
1679	H 14 (1) a		<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	
1712	H 14 (3)b		<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	
1437	H 1(3)	16	<i>Vibrio</i> sp. nov.5	2003	GTG5, 16S 1	

- Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.
- GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Bioq, Pruebas bioquímicas. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN.
- v, forma colonias de color verde en agar TCBS
- a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS
- Lum, luminiscencia
- G, Ox, O/129(10ng)(150ng), OF, Mot, Resultados las pruebas bioquímicas empleadas
  - G, prueba de Gram
  - Ox, Oxidasa
  - O/129, Agente vibriostático
  - OF, Oxido-Fermentación
  - Mot, Motilidad

### Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora ubicado en Bahía de Kino, Sonora. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

Cepa	Acrónimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
1093	BK 13(1)a		No tipificado	2003	GTG5, Bioq	
1037	BK 14(2)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1038	BK 14(1)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1054	BK 13(2)	7	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1088	BK 11(1)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	a
1049	BK 14(5)a	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v

1051	BK 14(5)b	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1316	BK 2(4)	31	<i>V. cyclitrophicus</i>	2003	GTG5	a
1091	BK 11(4)	1	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	v
1095	BK 13(4)	8	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	a
1056	BK 14(4)	24	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1086	BK 10(4)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1089	BK 11(2)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1092	BK 11(5)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1094	BK 13(3)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1096	BK 13(5)	7	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	a
1052	BK 10(1)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1061	BK 13(1)b		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1085	BK 10(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
1317	BK 11(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng; 18ml)(150ng; 22ml), OF++, Mot+
1483	BK 2(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	v
1087	BK 10(5)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1	2003	GTG5	a
1090	BK 11(3)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1	2003	GTG5	a
1097	BK 14(3)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1	2003	GTG5	a

• Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.

• GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR, Bioq, Pruebas bioquímicas.

• v, forma colonias de color verde en agar TCBS

• a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS

• G, Ox, O/129(10ng)(150ng), OF, Mot, Resultados las pruebas bioquímicas empleadas

G, prueba de Gram

Ox, Oxidasa

O/129, Agente vibriostático

OF, Oxido-Fermentación

Mot, Motilidad

S. C. P. P. E. Bahía de San Jorge S. C. L.

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en "S. C. P. P. E. Bahía de San Jorge S. C. L." ubicado en Caborca, Sonora. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

Cepa	Acronimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
958	K-11(2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	v
811	K-10(2)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	
924	K-12(1)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
960	K-12(4)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
962	K-13(2)	5	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
812	K-11(1)	32	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	
959	K-11(3)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
964	K-12(5)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5, 16S 1	a
980	K-13(1)	2	<i>V. cyclitrophicus</i>	2003	GTG5	a
981	K-13(4)	2	<i>V. cyclitrophicus</i>	2003	GTG5	a
982	K-13(5)	2	<i>V. cyclitrophicus</i>	2003	GTG5	v
290	K-10(4)	22	<i>V. fortis</i>	2003	GTG5	
1099	K 12(3)	Q	<i>V. gigantis</i>	2003	GTG5	a
944	K-10(5)	I	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	
963	K-13(3)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
942	K-10(1)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	
943	K-10(3)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	
961	K-11(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
978	K-11(5)b		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
979	K-11(5)c		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
1482	K 1(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	
899	K-12(2)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1	2003	GTG5	
925	K-12(1)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1	2003	GTG5	a
1440	K 14(3)	Q	<i>Vibrio</i> sp. nov. 5	2004	GTG5	a

1443	K 14(2)	16	<i>Vibrio</i> sp. nov.5	2004	GTG5	a
1479	K 4(2)	3	<i>V. splendidus</i>	2004	GTG5, 16S 1	v

- Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.
- GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN.

- v, forma colonias de color verde en agar TCBS
- a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS

### Coop. Única de Mujeres

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en "Coop. Única de Mujeres" ubicada en Puerto Peñasco, Sonora. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

Cepa	Acrónimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
1050	PP 14(2)b		No tipificado	2003	GTG5, Bioq	
1170	PP 8(3)		No tipificado	2003	GTG5, Bioq	
1040	PP 5(5)a	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	v
1042	PP (5)b	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	v
1020	PP 14(3)	I	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	v
1077	PP 7(1)	H	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1120	PP 14(2)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1126	PP 14(1)a	H	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1059	PP 8(1)	30	<i>V. harveyi</i>	2003	GTG5	
1055	PP 5(4)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	
1081	PP 8(4)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1084	PP 14(5)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1079	PP 8(3)a	8	<i>V. ponticus</i>	2003	GTG5	v

1080	PP 8(3)b	8	<i>V. ponticus</i>	2003	GTG5	v
1060	PP 7(3)	J	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	
1083	PP 14(4)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	a
1036	PP 5(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1044	PP 14(1)b		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	v
1053	PP 7(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	
1062	PP 7(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	
1076	PP 5(1)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng: 5ml)(150ng: 15ml), OF++, Mot+
1078	PP 7(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng: 13ml)(150ng: 22ml), OF++, Mot+
1082	PP 8(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
1161	PP 8(3)c		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
1318	PP 9(1)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng: 15ml)(150ng: 22ml), OF++, Mot+
1319	PP 9(3)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	a
1320	PP 10(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng: 18ml)(150ng: 20ml), OF++, Mot+
1382	PP 1(3)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng: 0ml)(150ng: 7ml), OF++, Mot+
1046	PP 5(3)	T	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2003	GTG5	

• Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.

• GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Bioq, Pruebas bioquímicas. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN.

• v, forma colonias de color verde en agar TCBS

• a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS

• G, Ox, O/129(10ng)(150ng). OF, Mot, Resultados las pruebas bioquímicas empleadas

G, prueba de Gram

Ox, Oxidasa

O/129, Agente vibriostático

OF, Oxido-Fermentación

Mot, Motilidad

**Agromarinos S. A. de C. V.**

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en la granja "Agromarinos S. A. de C. V." ubicada San Quintin, Baja California. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

Cepa	Acronimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
1132	SQ 13(5)		No tipificado	2003	GTG5	
1157	SQ 4(5)b		No tipificado	2003	GTG5, Bioq	
1550	SQ 4(4)		No tipificado	2004	GTG5, Bioq	
1672	SQ 5 (5)		No tipificado	2004	GTG5, Bioq	
1305	SQ 4(3)	12	<i>P. damsela</i>	2003	GTG5	
1030	SQ 4(4) T	15	<i>Photobacterium</i> sp. nov. 1	2003	GTG5	
1595	SQ 4 (3)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	
1600	SQ 5(4)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5, 16S 1	
1620	SQ 5(1)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	
1596	SQ 4 (4)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1597	SQ 4 (1)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1608	SQ 5 (2) b	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1610	SQ 5(2) a	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1623	SQ 4(2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1673	SQ 7 (4)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1673	SQ 7 (4)		<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1674	SQ 9(3) a	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1674	SQ 9(3) a		<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1675	SQ 9(3) b	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1675	SQ 9(3) b		<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1727	SQ 4(5)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	
1026	SQ 13(1) T	1	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5	
1027	SQ 13(2) T	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	
1098	SQ 8(3)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	

1115	SQ 8(2)b	J	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5, 16S 1	v
1130	SQ 8(5)	20	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5, 16S 1	v
1347	SQ 8(1)	31	<i>V. cyclitrophicus</i>	2004	GTG5	a
1128	SQ 4(1)a	1	<i>V. gigantis</i>	2003	GTG5	a
1129	SQ 4(1)B	1	<i>V. gigantis</i>	2003	GTG5, 16S 1	a
1131	SQ 13(4)	1	<i>V. gigantis</i>	2003	GTG5	a
1155	SQ 4(5)c	1	<i>V. gigantis</i>	2003	GTG5	a
1156	SQ 4(5)a	1	<i>V. gigantis</i>	2003	GTG5	a
1158	SQ 8(4)	1	<i>V. gigantis</i>	2003	GTG5	a
1614	SQ 9 (2)	E	<i>V. harveyi</i>	2004	GTG5	a
1638	SQ 6(3)	30	<i>V. harveyi</i>	2004	GTG5	a
1601	SQ 6(1)	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
1612	SQ 9 (2)	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
1029	SQ 1(4) T	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2003	GTG5	v
1114	SQ 13(3)	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2003	GTG5	v
1127	SQ 1(1)	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2003	GTG5	v
1028	SQ 1(3) T	7	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	v
1113	SQ 1(5)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	v
1445	SQ 7(3)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2004	GTG5, 16S 1	a
1164	SQ 8(2)a		<i>Vibrio</i> sp.	2003	GTG5	a
1599	SQ 4(1)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng; 5ml)(150ng; 16ml), OF++, Mot+
1632	SQ 6(2)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng; 18ml)(150ng; 22ml), OF++, Mot+
1633	SQ 6(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	v
1672	SQ 5 (5)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng; 13ml)(150ng; 20ml), OF++, Mot+
1584	SQ 6(4)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1	2004	GTG5	a
1377	SQ 9(1)b	3	<i>V. splendidus</i>	2004	GTG5	a
1383	SQ 9(1)a	3	<i>V. splendidus</i>	2004	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng; 15ml)(150ng; 23ml), OF++, Mot+

• Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.

• GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Bioq, Pruebas bioquímicas. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN.

• v, forma colonias de color verde en agar TCBS

• a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS

- G, Ox, O/129(10ng)(150ng), OF, Mot, Resultados las pruebas bioquímicas empleadas

G, prueba de Gram  
 Ox, Oxidasa  
 O/129, Agente vibriostático  
 OF, Oxido-Fermentación  
 Mot, Motilidad

### Sol Azul S. A. de C. V. (Ensenada)

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en la granja "Sol Azul S. A. de C. V." ubicada Ensenada, Baja California. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

Cepa	Acronimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
1590	LM 13(3)		No tipificado	2004	GTG5, Bioq	a
1439	LM 7(4)	15	<i>Photobacterium</i> sp. nov. 1	2003	GTG5, 16S C	v
1112	LM 11(2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	v
1154	LM 11(3)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1607	LM 13 (5)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	v
1163	LM 6(3)	A	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng; 5ml)(150ng; 13ml), OF++, Mot+
1593	LM 13 (1)	4	<i>V. campbellii</i>	2004	GTG5	v
1034	LM 6(4) T	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1105	LM 6(1)	J	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	a
1106	LM 6(5)b	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1107	LM 7(2)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1108	LM 7(5)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5, 16S 1	v
1110	LM 8(4)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v

1140	LM 6(5)a	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1143	LM 8(5)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5, 16S 1	a
1162	LM 6(2)	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	a
1384	LM 7(5)	23	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	v
1438	LM 7(2)	D	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5, 16S 1	a
1603	LM 11(5)	23	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	v
1619	LM 13(4)	23	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	v
1487	LM 4(3)	2	<i>V. cyclitrophicus</i>	2004	GTG5	a
1441	LM 5(3)	9	<i>V. gigantis</i>	2004	GTG5, 16S 1	a
1442	LM 12(3)	9	<i>V. gigantis</i>	2004	GTG5, 16S 1, 3	v
1660	LM 5(3)	30	<i>V. harveyi</i>	2004	GTG5	a
1141	LM 7(5)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1142	LM 8(1)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	v
1585	LM 5 (4)	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
1111	LM 11(1)	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2003	GTG5	v
1144	LM 11(1)b	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2003	GTG5	v
1033	LM 7(5) T	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	v
1109	LM 8(2)	7	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	v
1139	LM 6(3)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	a
1402	LM 12 5	28	<i>V. rotiferianus</i>	2004	GTG5	a
1587	LM 11(1)	7	<i>V. rotiferianus</i>	2004	GTG5	a
1589	LM 5(5)	7	<i>V. rotiferianus</i>	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Ox+, O/129(10ng: 9ml)(150ng: 15ml), OF++, Mot+ a, G-, Ox+, O/129(10ng: 5mm)(150ng: 7mm), OF++, Mot+
1598	LM 5 (1)	F	<i>V. rotiferianus</i>	2004	GTG5, Bioq	a, G-, Ox+, O/129(10ng: 15ml)(150ng: 17ml), OF++, Mot+
1484	LM 7(3)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v
1486	LM 5(5)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5	

- Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.
- GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Bioq, Pruebas bioquímicas. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN. 16S C, secuencia completa del gen 16S rARN. 16S 1, 3, secuencia del primer y tercer tercio del gen 16S rARN.

- v, forma colonias de color verde en agar TCBS
- a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS

- G, Ox, O/129(10ng)(150ng), OF, Mot, Resultados las pruebas bioquímicas empleadas

G, prueba de Gram  
 Ox, Oxidasa  
 O/129, Agente vibriostático  
 OF, Oxido-Fermentación  
 Mot, Motilidad

### Sol Azul S. A. de C. V. (Mulegé)

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en la granja "Sol Azul S. A. de C. V." ubicada Mulegé, Baja California Sur. Todos fueron aislados, purificados por Cabanillas (2005), y caracterizados en este estudio.

Cepa	Acronimo	Cluster	Especie	Año de aislamiento	Método de identificación	Observaciones
1560	BCS 10(4)		No tipificado	2004	GTG5, Bioq	a
1133	BCS 4(1)	12	<i>P. damselae</i>	2003	GTG5	a
1119	BCS 6(5)	15	<i>Photobacterium</i> sp. nov. 1	2003	GTG5	v
1655	BCS 9 (5)		<i>Shewanella</i> sp.	2004	GTG5	v
1134	BCS 4(5)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1136	BCS 6(1)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1138	BCS 6(4)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1149	BCS 1(2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1150	BCS 1(3)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1151	BCS 4(2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1152	BCS 5(1)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1153	BCS 5(3)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1219	BCS 5(2)	F	<i>V. alginolyticus</i>	2003	GTG5	a
1586	BCS 9(3)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	v
1604	BCS 12(5)a	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	a

1605	BCS 12 5)b	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	v
1606	BCS 9(4)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	a
1609	BCS 4 (2)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	a
1611	BCS 14 (5)b	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	v
1613	BCS 14 (5)	29	<i>V. alginolyticus</i>	2004	GTG5	a
1135	BCS 5(5)b	1	<i>V. campbellii</i>	2003	GTG5, Bioq	v, G-, O/129(10ng: 13ml)(150ng: 18ml), OF++, Mot+
1626	BCS 9 (1)	5	<i>V. campbellii</i>	2004	GTG5	v
1031	BCS 5(4) T	23	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	a
1116	BCS 1(1)	J	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	v
1165	BCS 1(5)	5	<i>V. chagasii</i>	2003	GTG5	a
1495	LM 5(4)	23	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	a
1588	BCS 4 (5)	31	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	v
1616	BCS 14 (4)	23	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	v
1624	BCS 12 (4)	23	<i>V. chagasii</i>	2004	GTG5	a
1137	BCS 6(2)	2	<i>V. cyclitrophicus</i>	2003	GTG5	a
1480	BCS 3(1)	2	<i>V. cyclitrophicus</i>	2004	GTG5	v
1481	BCS 12(3)	Q	<i>V. gigantis</i>	2004	GTG5	v
1118	BCS 6(3)	27	<i>V. mediterranei</i>	2003	GTG5	a
1594	BCS 4 (3)	26	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5, Bioq	a, G-, Oxt, O/129(10ng: 17ml)(150ng: 25ml), OF++, Mot+
1602	BCS 9(2)	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
1617	BCS 4(4)	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
1618	BCS 12 (3)a	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
1628	BCS 12 (3) b	27	<i>V. mediterranei</i>	2004	GTG5	a
1032	BCS 1(4) T	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	a
1117	BCS 4(4)	7	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	v, Lum
1169	BCS 4(3)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2003	GTG5	a
1615	BCS 4(1)	28	<i>V. rotiferianus</i>	2004	GTG5	a
1444	BCS 14(4)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	G-, Oxt, O/129(10ng: 5ml)(150ng: 15ml), OF++, Mot+
1625	BCS 12 (1)		<i>Vibrio</i> sp.	2004	GTG5, Bioq	v, G-, Oxt, O/129(10ng: 28ml)(150ng: 40ml), OF++, Mot+
1168	BCS 5(5)a	R	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2003	GTG5	a
1174	BCS 5(5)b	R	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2003	GTG5	v
1356	BCS 3(5)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	v
1621	BCS 14(1)	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5, 16S 1	v

1676	BCS 14 (2)a	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	v
1677	BCS 14 (2)b	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	a
1676	BCS 14 (2)a		<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	v
1677	BCS 14 (2)b		<i>Vibrio</i> sp. nov.1	2004	GTG5	a
1485	BCS 12(5)	18	<i>V. xiii</i>	2004	GTG5	

- Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.
- GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR: Bioq, Pruebas bioquímicas. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN.
- v, forma colonias de color verde en agar TCBS
- a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS
- G, Ox, O/129(10ng)(150ng), OF, Mot, Resultados las pruebas bioquímicas empleadas

G, prueba de Gram  
Ox, Oxidasa  
O/129, Agente vibriostático  
OF, Oxido-Fermentación  
Mot, Motilidad

## Anexo 2

## Bahía Alfacs

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en la bahía de Alfacs ubicada en el delta del río Ebro en Cataluña, España.

Cepa	Acrónimo	Cluster	Especie	Método de identificación	Observaciones
R289	1 AM 6S1-1		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R290	2 AM 6S1-2	F	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R294	6 AM 6S1-6	G	<i>V. campbellii</i>	GTG5	a
R295	7 AM 6S1-7	14	<i>V. ponticus</i>	GTG5	a
R296	8 AM 6S1-8	14	<i>V. ponticus</i>	GTG5, 16S 1	a
R298	10 AM 6S1-10	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R299	11 AM 6S1-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R300	12 AM 6S1-12	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R301	13 AM 6S1-13	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R302	14 AM 6S1-14	K	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R303	15 AM 6S1-15	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R304	16 AM 6S1-16	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R305	17 AM 6S1-17	14	<i>V. ponticus</i>	GTG5	a
R306	18 AM 6S1-18	14	<i>V. ponticus</i>	GTG5, 16S 1	a
R307	19 AM 6S1-19	19	<i>V. neptunius</i>	GTG5	a
R308	20 AM 6S1-20	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R309	21 AM 6S2-1	20	<i>V. fortis</i>	GTG5	v
R310	22 AM 6S2-2	29	<i>V. alginolyticus</i>	GTG5	a
R311	23 AM 6S2-3	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a, Lum
R312	24 AM 6S2-4	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R313	25 AM 6S2-5	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R314	26 AM 6S2-6	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R316	28 AM 6S2-8	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R317	29 AM 6S2-9	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R318	30 AM 6S2-10	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R319	31 AM 6S2-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R320	32 AM 6S2-12	G	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R321	33 AM 6S2-13	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R322	34 AM 6S2-14	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R324	36 AM 6S2-16	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R325	37 AM 6S2-17	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R326	38 AM 6S2-18	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R327	39 AM 6S2-19	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R328	40 AM 6S2-20	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R330	42 AM 6S3-2	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a

R331	43	AM 6S3-3	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R332	44	AM 6S3-4	19	<i>V. neptunius</i>	GTG5	v
R333	45	AM 6S3-5	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R335	47	AM 6S3-7		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R336	48	AM 6S3-8	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R337	49	AM 6S3-9	19	<i>V. neptunius</i>	GTG5	a
R339	51	AM 6S3-11	25	<i>Vibrio</i> sp. nov.6	GTG5, 16S C	a
R341	53	AM 6S3-13	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R342	54	AM 6S3-14	19	<i>V. neptunius</i>	GTG5	a
R343	55	AM 6S3-15	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R344	56	AM 6S3-16		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R345	57	AM 6S3-17	N	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R346	58	AM 6S3-18	N	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R347	59	AM 6S3-19	19	<i>V. neptunius</i>	GTG5	a
R348	60	AM 6S3-20	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R350	62	AM 6F1-2	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R351	63	AM 6F1-3	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v-a
R352	64	AM 6F1-4	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R353	65	AM 6F1-5	4	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R354	66	AM 6F1-6	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R355	67	AM 6F1-7	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R356	68	AM 6F1-8	19	<i>V. neptunius</i>	GTG5, 16S 1	a
R358	70	AM 6F1-10	19	<i>V. neptunius</i>	GTG5, 16S 1	a
R359	71	AM 6F1-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R360	72	AM 6F1-12	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R361	73	AM 6F1-13	27	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R362	74	AM 6F1-14	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R363	75	AM 6F1-15	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R364	76	AM 6F1-16	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R365	77	AM 6F1-17	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R366	78	AM 6F1-18	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R367	79	AM 6F1-19	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R370	82	AM 6F2-2	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	
R373	85	AM 6F2-5	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R374	86	AM 6F2-6	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R375	87	AM 6F2-7	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R376	88	AM 6F2-8	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R377	89	AM 6F2-9	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v, Lum
R378	90	AM 6F2-10	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R379	91	AM 6F2-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R380	92	AM 6F2-12	J	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R381	93	AM 6F2-13	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S C	a
R382	94	AM 6F2-14	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R383	95	AM 6F2-15	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R384	96	AM 6F2-16		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R385	97	AM 6F2-17	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R386	98	AM 6F2-18	20	<i>V. fortis</i>	GTG5	v

R387	99	AM 6F2-19	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R388	100	AM 6F2-20		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R389	101	AM 6F3-1	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R390	102	AM 6F3-2	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R391	103	AM 6F3-3		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R392	104	AM 6F3-4	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R393	105	AM 6F3-5	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R394	106	AM 6F3-6	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	GTG5	v
R395	107	AM 6F3-7	24	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R396	108	AM 6F3-8	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R397	109	AM 6F3-9	13	<i>Vibrio</i> sp. nov.4	GTG5	v
R399	111	AM 6F3-11	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R400	112	AM 6F3-12	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R401	113	AM 6F3-13	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R403	115	AM 6F3-15	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R404	116	AM 6F3-16		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R405	117	AM 6F3-17		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R406	118	AM 6F3-18	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R407	119	AM 6F3-19	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R408	120	AM 6F3-20	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R409	121	AM 26S1-1	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R410	122	AM 26S1-2	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S C	a
R411	123	AM 26S1-3	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R412	124	AM 26S1-4	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	v
R413	125	AM 26S1-5	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R414	126	AM 26S1-6	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R415	127	AM 26S1-7	17	<i>Vibrio</i> sp. nov.6	GTG5	v
R416	128	AM 26S1-8	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R417	129	AM 26S1-9	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R419	131	AM 26S1-11		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R420	132	AM 26S1-12		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R421	133	AM 26S1-13	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R422	134	AM 26S1-14	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R423	135	AM 26S1-15	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R424	136	AM 26S1-16	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R425	137	AM 26S1-17	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R426	138	AM 26S1-18	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R427	139	AM 26S1-19		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R428	140	AM 26S1-20	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R429	141	AM 26S2-1	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R430	142	AM 26S2-2	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R431	143	AM 26S2-3		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v-a
R433	145	AM 26S2-5		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v-a
R434	146	AM 26S2-6	20	<i>V. fortis</i>	GTG5	a
R435	147	AM 26S2-7	C	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R436	148	AM 26S2-8	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	GTG5	v
R437	149	AM 26S2-9	G	<i>V. corallililycus</i>	GTG5	a

R439	151	AM 26S2-11		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R441	153	AM 26S2-13	A	<i>V. campbellii</i>	GTG5	a
R442	154	AM 26S2-14	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R443	155	AM 26S2-15		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R444	156	AM 26S2-16	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R445	157	AM 26S2-17	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R446	158	AM 26S2-18	20	<i>V. fortis</i>	GTG5	a
R447	159	AM 26S2-19	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R448	160	AM 26S2-20	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R449	161	AM 26S3-1		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R450	162	AM 26S3-2	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R451	163	AM 26S3-3	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R452	164	AM 26S3-4	E	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R453	165	AM 26S3-5	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R454	166	AM 26S3-6	24	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R455	167	AM 26S3-7	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R456	168	AM 26S3-8	G	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R457	169	AM 26S3-9	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R458	170	AM 26S3-10	17	<i>Vibrio</i> sp. nov.6	GTG5	a
R459	171	AM 26S3-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R460	172	AM 26S3-12	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R461	173	AM 26S3-13	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R462	174	AM 26S3-14		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R463	175	AM 26S3-15	L	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R464	176	AM 26S3-16		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R465	177	AM 26S3-17	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	a
R466	178	AM 26S3-18		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R467	179	AM 26S3-19	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v, Lum
R468	180	AM 26S3-20	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R469	181	AM 26F1-1	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R473	185	AM 26F1-5	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R474	186	AM 26F1-6		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v-a
R475	187	AM 26F1-7	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R477	189	AM 26F1-9	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	v
R478	190	AM 26F1-10	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R479	191	AM 26F1-11	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R480	192	AM 26F1-12	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R481	193	AM 26F1-13	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5, 16S 1	v
R482	194	AM 26F1-14	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R483	195	AM 26F1-15	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R484	196	AM 26F1-16	P	<i>Vibrio</i> sp. nov.6	GTG5	v
R485	197	AM 26F1-17	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R486	198	AM 26F1-18	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R487	199	AM 26F1-19	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R490	202	AM 26F2-2		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R491	203	AM 26F2-3	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R492	204	AM 26F2-4	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a

R493	205	AM 26F2-5	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R495	207	AM 26F2-7	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R497	209	AM 26F2-9	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	a
R498	210	AM 26F2-10	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R499	211	AM 26F2-11	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v, Lum
R500	212	AM 26F2-12	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	a
R501	213	AM 26F2-13	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R502	214	AM 26F2-14	G	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R503	215	AM 26F2-15	G	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R504	216	AM 26F2-16	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	a
R505	217	AM 26F2-17	28	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	v-a
R506	218	AM 26F2-18	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v, Lum
R507	219	AM 26F2-19	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R508	220	AM 26F2-20	24	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	v
R511	223	AM 26F3-3		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R513	225	AM 26F3-5		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R514	226	AM 26F3-6	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R517	229	AM 26F3-9	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v-a
R519	231	AM 26F3-11	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R520	232	AM 26F3-12	22	<i>V. fortis</i>	GTG5	a
R521	233	AM 26F3-13	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v-a
R522	234	AM 26F3-14	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R523	235	AM 26F3-15	I	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R524	236	AM 26F3-16	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R525	237	AM 26F3-17	25	<i>Vibrio</i> sp. nov.6	GTG5	v
R526	238	AM 26F3-18	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R527	239	AM 26F3-19	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R528	240	AM 26F3-20	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R529	241	sin acrónimo	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v

- Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.
- GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Bioq, Pruebas bioquímicas. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN. 16S C, secuencia completa del gen 16S rARN.
- v, forma colonias de color verde en agar TCBS
- a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS
- Lum, Luminiscencia

**Bahía Fangar**

Aislados obtenidos de *C. gigas* cultivado en la bahía de Fangar ubicada en el delta del río Ebro en Cataluña, España.

Cepa	Acrónimo	Cluster	Especie	Método de identificación	Observaciones
R530	242 FM 106S1-1	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	
R531	243 FM 106S1-2	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R532	244 FM 106S1-3	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R533	245 FM 106S1-4	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R534	246 FM 106S1-5	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R535	247 FM 106S1-6	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R536	248 FM 106S1-7	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R537	249 FM 106S1-8	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R538	250 FM 106S1-9	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R539	251 FM 106S1-10	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R540	252 FM 106S1-11	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R541	253 FM 106S1-12	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R542	254 FM 106S1-13	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R543	255 FM 106S1-14	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R545	257 FM 106S1-16	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R546	258 FM 106S1-17	G	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R547	259 FM 106S1-18	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R548	260 FM 106S1-19	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R549	261 FM 106S1-20	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	
R550	262 FM 106S2-1	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	a
R551	263 FM 106S2-2	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R552	264 FM 106S2-3	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R553	265 FM 106S2-4	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R554	266 FM 106S2-5	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	v
R555	267 FM 106S2-6	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R556	268 FM 106S2-7	22	<i>V. fortis</i>	GTG5	v
R557	269 FM 106S2-8	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R558	270 FM 106S2-9	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R559	271 FM 106S2-10	K	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	v
R560	272 FM 106S2-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R561	273 FM 106S2-12		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R562	274 FM 106S2-13	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R563	275 FM 106S2-14	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R566	278 FM 106S2-17	A	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R567	279 FM 106S2-18	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R569	281 FM 106S2-20		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R570	282 FM 106S3-1	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R571	283 FM 106S3-2	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	a

R572	284	FM 106S3-3	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R573	285	FM 106S3-4	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R574	286	FM 106S3-5	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R575	287	FM 106S3-6	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v, Lum
R576	288	FM 106S3-7	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R577	289	FM 106S3-8	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R578	290	FM 106S3-9	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R579	291	FM 106S3-10	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R580	292	FM 106S3-11	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R581	293	FM 106S3-12	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R582	294	FM 106S3-13	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R583	295	FM 106S3-14	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R584	296	FM 106S3-15	29	<i>V. alginolyticus</i>	GTG5	v
R585	297	FM 106S3-16	29	<i>V. alginolyticus</i>	GTG5	v
R586	298	FM 106S3-17	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R587	299	FM 106S3-18	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R588	300	FM 106S3-19	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R589	301	FM 106S3-20	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R590	302	FM 106F1-1	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R591	303	FM 106F1-2	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R592	304	FM 106F1-3	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v, Lum
R593	305	FM 106F1-4	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	v
R595	307	FM 106F1-6	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R596	308	FM 106F1-7	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R597	309	FM 106F1-8	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R598	310	FM 106F1-9	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R599	311	FM 106F1-10	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v, Lum
R600	312	FM 106F1-11	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	v
R601	313	FM 106F1-12	C	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R602	314	FM 106F1-13	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R603	315	FM 106F1-14	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R604	316	FM 106F1-15		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v, Lum
R605	317	FM 106F1-16	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R606	318	FM 106F1-17	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5, 16S 1	v, Lum
R607	319	FM 106F1-18	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R608	320	FM 106F1-19	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R609	321	FM 106F1-20	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R610	322	FM 106F2-1	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R611	323	FM 106F2-2	32	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R612	324	FM 106F2-3	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R613	325	FM 106F2-4	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R614	326	FM 106F2-5	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R615	327	FM 106F2-6	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R616	328	FM 106F2-7	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R617	329	FM 106F2-8	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R618	330	FM 106F2-9	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R619	331	FM 106F2-10	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v

R620	332	FM 106F2-11	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R621	333	FM 106F2-12	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R622	334	FM 106F2-13		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R624	336	FM 106F2-15	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R625	337	FM 106F2-16	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R626	338	FM 106F2-17	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R627	339	FM 106F2-18		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R628	340	FM 106F2-19	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R629	341	FM 106F2-20	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R630	342	FM 106F3-1	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5, 16S 1	a
R631	343	FM 106F3-2	G	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R632	344	FM 106F3-3	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R633	345	FM 106F3-4	G	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R634	346	FM 106F3-5	C	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v, Lum
R635	347	FM 106F3-6	N	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R636	348	FM 106F3-7	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R637	349	FM 106F3-8	I	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R638	350	FM 106F3-9	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R639	351	FM 106F3-10	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R640	352	FM 106F3-11		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R641	353	FM 106F3-12	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R642	354	FM 106F3-13	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R643	355	FM 106F3-14	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R644	356	FM 106F3-15	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R645	357	FM 106F3-16	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R646	358	FM 106F3-17	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R647	359	FM 106F3-18	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R648	360	FM 106F3-19	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	a
R650	362	FM 71S1-1	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R651	363	FM 71S1-2	W	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R652	364	FM 71S1-3	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R653	365	FM 71S1-4	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v-a
R654	366	FM 71S1-5	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R655	367	FM 71S1-6	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R656	368	FM 71S1-7	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R657	369	FM 71S1-8	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	v
R658	370	FM 71S1-9	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R660	372	FM 71S1-11	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R661	373	FM 71S1-12	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R662	374	FM 71S1-13	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R663	375	FM 71S1-14		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R664	376	FM 71S1-15	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R665	377	FM 71S1-16	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5, 16S 1	v
R666	378	FM 71S1-17	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R667	379	FM 71S1-18	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R668	380	FM 71S1-19	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R669	381	FM 71S1-20	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v

R670	382	FM 71S2-1	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a, Lum
R671	383	FM 71S2-2	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R672	384	FM 71S2-3	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R674	386	FM 71S2-5	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R675	387	FM 71S2-6	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R676	388	FM 71S2-7		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R677	389	FM 71S2-8	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1, 3	a
R678	390	FM 71S2-9	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R679	391	FM 71S2-10	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v-a
R680	392	FM 71S2-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R682	394	FM 71S2-13	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R683	395	FM 71S2-14	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a, Lum
R684	396	FM 71S2-15	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R685	397	FM 71S2-16	20	<i>V. fortis</i>	GTG5	a
R686	398	FM 71S2-17	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R687	399	FM 71S2-18	A	<i>V. campbellii</i>	GTG5	v
R688	400	FM 71S2-19	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R689	401	FM 71S2-20	22	<i>V. fortis</i>	GTG5	v
R690	402	FM 71S3-1	22	<i>V. fortis</i>	GTG5	v
R691	403	FM 71S3-2	5	<i>V. campbellii</i>	GTG5	a
R692	404	FM 71S3-3	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R693	405	FM 71S3-4	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v, Lum
R694	406	FM 71S3-5	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R695	407	FM 71S3-6	22	<i>V. fortis</i>	GTG5	v
R696	408	FM 71S3-7	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R697	409	FM 71S3-8	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R698	410	FM 71S3-9	6	<i>Vibrio</i> sp. nov. 1	GTG5	v
R699	411	FM 71S3-10	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R700	412	FM 71S3-11	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v-a
R701	413	FM 71S3-12	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R702	414	FM 71S3-13	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R703	415	FM 71S3-14		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R704	416	FM 71S3-15	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R705	417	FM 71S3-16	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R706	418	FM 71S3-17		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	a
R707	419	FM 71S3-18	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R708	420	FM 71S3-19	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R709	421	FM 71S3-20	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R710	422	FM 71F1-1	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R711	423	FM 71F1-2		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R713	425	FM 71F1-4	B	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R714	426	FM 71F1-5	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R715	427	FM 71F1-6	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R716	428	FM 71F1-7	20	<i>V. fortis</i>	GTG5	v
R717	429	FM 71F1-8	1	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R718	430	FM 71F1-9	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	v
R719	431	FM 71F1-10	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1, 3	v

R720	432	FM 71F1-11	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	v
R721	433	FM 71F1-12	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R722	434	FM 71F1-13	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R723	435	FM 71F1-14	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R724	436	FM 71F1-15	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R725	437	FM 71F1-16	20	<i>V. fortis</i>	GTG5	v
R726	438	FM 71F1-17	7	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R727	439	FM 71F1-18	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R728	440	FM 71F1-19	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R729	441	FM 71F1-20	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	a
R730	442	FM 71F2-1	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R731	443	FM 71F2-2	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R732	444	FM 71F2-3	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	v
R733	445	FM 71F2-4	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R734	446	FM 71F2-5	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R735	447	FM 71F2-6	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	v
R736	448	FM 71F2-7		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	v
R737	449	FM 71F2-8	22	<i>V. fortis</i>	GTG5	a
R738	450	FM 71F2-9	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	a
R739	451	FM 71F2-10	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	v
R740	452	FM 71F2-11	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R741	453	FM 71F2-12	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R742	454	FM 71F2-13		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	
R743	455	FM 71F2-14	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R744	456	FM 71F2-15	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	
R745	457	FM 71F2-16	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R746	458	FM 71F2-17	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R747	459	FM 71F2-18	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R748	460	FM 71F2-19	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R749	461	FM 71F2-20	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	
R750	462	FM 71F3-1	6	<i>Vibrio</i> sp. nov.1	GTG5	
R751	463	FM 71F3-2	30	<i>V. harveyi</i>	GTG5	
R752	464	FM 71F3-3	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R753	465	FM 71F3-4	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	
R754	466	FM 71F3-5	A	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R755	467	FM 71F3-6	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R756	468	FM 71F3-7		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	
R757	469	FM 71F3-8	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	
R758	470	FM 71F3-9	31	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R759	471	FM 71F3-10	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	
R760	472	FM 71F3-11		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	
R761	473	FM 71F3-12	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5, 16S 1	
R762	474	FM 71F3-13	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R764	476	FM 71F3-15		<i>Vibrio</i> sp.	GTG5	
R766	478	FM 71F3-17	28	<i>V. rotiferianus</i>	GTG5	
R768	480	FM 71F3-19	26	<i>V. mediterranei</i>	GTG5	
R769	481	FM 71F3-20	32	<i>V. chagasii</i>	GTG5	

- Cluster: número, número del cluster que formó en el dendrograma; letra, letra de grupo que se formó en el dendrograma.
- GTG5, (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Bioq, Pruebas bioquímicas. 16S 1, secuencia del primer tercio del gen 16S rARN. 16S 1, 3, secuencia del primer y tercer tercio del gen 16S rARN. 16S C, secuencia completa del gen 16S rARN
- v, forma colonias de color verde en agar TCBS
- a, forma colonias de color amarillo en agar TCBS
- Lum, luminiscencia

### Anexo 3

#### Secuencias

##### Cluster 1

CAIM 1129, primer tercio del 16S rARN

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACA $\hat{C}$ TAACAATCC  
TTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCT  
TGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAA  
GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT  
GGA $\hat{A}$ CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG  
CGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTT  
TCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAGYGTAAATAGCGCTATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGA  
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA

##### Cluster 3

CAIM 1479, primer tercio del 16S rARN

TGCT $\hat{c}$ AGATTGAACGCTGGCGGCAGG $\hat{c}$ CTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTA  
ACAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAA  
ATTGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAA $\hat{a}$ CGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACG  
GGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTA  
GTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG  
CCACACTGGA $\hat{A}$ CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
ACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGG $\hat{c}$ CTTCGGGTTGTA  
AAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGT $\hat{a}$ gt $\hat{c}$ GTTAATAGC $\hat{g}$ CTATCTCTTGACGTTAGC  
AACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG $\hat{a}$ gGGT

##### Cluster 6

CAIM 1569, secuencia completa del 16S rARN

GATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCATGAA  
CCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC  
CCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGA $\hat{A}$ CTGAGACACG $\hat{S}$ TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG $\hat{a}$ ATATTGCACAAT  
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGATGAAGAAGACTATCAGGTTGTAAAGC  
TACTATTTCAGTCGATGARGAAGCTAGCTGTCAGTTAATAGCTGCAGTTAGTTGACGTTAG

CGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGT GCGAG  
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAA  
 AGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGG  
 GGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGa  
 AGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCC  
 GTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACC GGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTTAAA  
 ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCcGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCA  
 ACGcGAaGAaCCTtAcCTACTCTTgACATCcAGAGaAaCTTtCCAGAGATGgATTgGTGCc  
 TTCGGGAaCTCTgAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGTGAaaTGTTGG  
 GTtaAGTCCCgCAACGAGCGCAaCcCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTcGGgAAC  
 TCCAGGGAGACTGcCGGTGATAAAcCGGaGGaaGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGG  
 CCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTaCAATGGCGCATAcAGAGGGCGGCCAACTTGC  
 GAqAGTGAGCGAATCCcAAaAAGTgCGTCGTAGTcCGGATTGGAGTCTGcAACTCGACTC  
 CATGAAGTCGgAATCGCTAGtAATCGTGGATCAGAATgCCACGGTGAATaCGTtCcCGGG  
 CCTTGTACACCCGCCCGTCAcCaTGGGAGTGGGCTGcaaaAGaAGTaggTAGTTTaa  
 CTTCCGGGGGACGCTTACACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAcaa

#### CAIM 1621, primer tercio del 16S rARN

ACCCTCCGTATTACCGGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTTGCTAAC  
 GTCAAGAGATAGCGCTATTAACGACTACCCCTTCTCACAACGAAAGTACTTTACAAC  
 CCGAAGGCCTTCTTCATACACGGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATA  
 TTCCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATC  
 ATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTA  
 ATCCACCTAGGCATATCTTGACCGGAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGCCCGTAGG  
 CATCATGCGGTATTAGCCATCGTTCCAATGGTTATCCCCACATCAAGGCAATTTCTCTAG  
 GCATTACTCACCCGTCCGCC

#### CAIM 1653, secuencia completa del 16S rARN

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC  
 GGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAG  
 TAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG  
 CATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCC TAG  
 GTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG  
 AGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
 TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAGTGAAGAAG  
 GCCTTCGGGTTGTAAAGCTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCTGAGTGTCTGTTAATAGCTGC  
 ATCTAGTTTGACGTTAGCTGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGG  
 TAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATtACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGTT  
 TGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGA  
 CTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG  
 AAGGAATACCGGTGGCGAAGGCCGCCCTTgGACAGATACTgACACTCAGATGCGAAAGC  
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGG  
 AGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACC GGCTGGGGAG  
 TACGGTCGCAAGATTTAAACTCAAATgAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCAT  
 GTGGTTTAATTCGATGCAACGcGAAGAaCCTtACCTACTCTTgACATCcAGAGaAaCTTtc  
 CAqAGATgGATtGgTGCCtTCGGgaACTcTgAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCT

CGTGTGTGAAaTGtGGGtAaGTCCCGCAaCGAGCGCAaCCCTTAtCcTTgTTTGCCA  
 GCGAGTAAATGTCGGGAaCTCCAGGGAGACTGCcGgTgATAAACCgGAGGAAGGTGGGGaC  
 GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTAcAATGGCGCATAc  
 AGAGGGCaGCCAACTTGGCAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGGGtCGTAGTCCGGATTG  
 GAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCgAATCGCTAGTAATCGTGGATcAGAATGCCAC  
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAa  
 aAGAaGTAGGTAGTTTAcCTTCGGGGGgACGCTTACACTTTGTGGTTCATgACTGGggt  
 gaagtcgtaa

### CAIM 1683, secuencia completa del 16S rARN

AGTTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAAC  
 CTTCGGGAACGATAACGGCGTFCGAGCGGCGGAGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATGCC  
 CTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCACGGGCCAA  
 AGAGGGGACCTCCGGCCTCCTCGCGTCAGGATCATGCCTAGGTAGGATTAGCTAGTTGG  
 TSWGTAATGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGCAGATGATCAGCCAC  
 ACTGGAGACWGAGgCgCGGTcAGACTCCTACGGRAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA  
 ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAWGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAG  
 TACTWTCAGTCGTGAGGAAGGCGTTGTCTTAATAGCGGCATCGTTTACGTTAGCGACA  
 GAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGtGCGAGCGTTA  
 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCC  
 GGGGCTCAACCTCGGAATaGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTA  
 GAATTTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGGC  
 GCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGC  
 TTTTCGGAGCTAACCGTAAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACACTCA  
 AATGAATTGACGGGGGcCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGGC  
 AAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG  
 GAATCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGgaAaTgtTGGgtTAA  
 GTCCCGcAACgAGCGCAaCCctTATCcTtGTTTgcCAgCgAGTAaTgtCGGgAACTCcAG  
 GgAGACTgCcGGTgATAAACCgGAGgAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGgCCCTT  
 ACGAGTAGGgCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAcAGaGGgCGGCCAACTTGCGAaAG  
 TGAGCGAATCCCAAAAAGTGGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGA  
 AGTCCgAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGgCCTTG  
 TACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGgCTGCAAAAGAAGTAGGTAGTTTAcCTTC  
 GGGGgACgcTTACACTTTGTGGTtCATGACTGGgTgaagtc

### Cluster 9

#### CAIM 1441, primer tercio del 16S rARN

ACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTTCTGCAGCTAAC  
 GTCAAACGAGCACGCTATTAACGTACCCGCCTTCTCACTGCTGAAAGTGTCTTACAACC  
 CGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCTAGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTTGTGCAATAT  
 TCCCCACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCA  
 TCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTGCCTTGGTGGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAA  
 TCCACCTGGGCATATCTGACCGGAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGCCCGAAGGC  
 ATTATGCGGTATTAGCCATCGTTTCCAATGGTTATCCCCACATCAGGGCAATTTCCAG  
 GCATTACTACCCGTCGGCCGCTCGACGCGTAAACGTAACCCGAAGGGTCAGTTAACTC

GTTTCCGCTCG

#### CAIM 1442, primer tercio del 16S rARN

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTAA  
CAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAA  
TTGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGG  
GCCAAGAGGGGGACCTTCGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAG  
TTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC  
CACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA  
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAA  
AGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAGTGTTAATAGCGCTATCTCTTGACGTTAGCAA  
CAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA

#### CAIM 1442, tercer tercio del 16S rARN

GGGAGCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTT  
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTTTGGCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCC  
AGGGAGACTGCCGGTGATAAACCCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCATCATGGCCC  
TTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGAT  
AGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT  
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT  
TGTACACACC GCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAGAAGTGGGTAGTTAACCT  
TTCGGGGAGGACGCTCACCACCTTGTGGTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA

#### Cluster 14

#### R-306, primer tercio del gen 16S rARN

TTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCA  
GCGACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT  
GCCTAGGAAATTTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATACCGCATG  
ATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGG  
GATTAGCTAGTTGGTGAGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG  
GATGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG  
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT  
CGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTAGGGAGGAAGGTTTCATGCGTTAATAGCGTATGGATTG  
ACGTTACCTACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA

#### Cluster 15

#### CAIM 1206, secuencia completa del 16S rARN

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGAAGTAGCTT  
GCTACTTTCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATATGCCTTGATGTGG  
GGGATAACTATTGAAACGATAGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGA

TCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATTAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG  
 GCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAECTGA  
 GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACC  
 CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCAG  
 TGAGGAAGGTGGTGTAGTGTAAATAGCACTATCATTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACC  
 GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGCGTTAATCGGAATTAC  
 TGGGCGTAAAGCGCATGCAGGCGGTCTGTTAAGCAAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACC  
 TCGGAACAGCATTGAACTGGCAGACTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTTTCAGGT  
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGAC  
 AAAGACTGACGCTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT  
 CCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTGGTGTCTTGAACACTGGCTTTTCGGAGCTA  
 ACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATAAAACACTCAAATGAATTGAC  
 GGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC  
 CTACTCTTGACATCCAGAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCCTTCGGGAACCTCTGAGA  
 CAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG  
 AGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCG  
 GTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGC  
 TACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGGCTGCCAACAGCGATGGTGGAGCGAATCC  
 CAGAAAGTACGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG  
 CTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGT

#### CAIM 1437, secuencia completa del 16S rARN

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTT  
 ATCTGAACCTTCGGGGAAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTG  
 ATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTTCGGGCCAAAGAGGGGGACCTTC  
 GGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACG  
 ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC  
 AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG  
 GTTGTAAAGTACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAG  
 AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGCGTTAATCGGAATTACT  
 GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCAT  
 TTGAAACTGGTGGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT  
 CTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAG  
 CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGgCCTTGAGCCG  
 TGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATAAAACACTCAAATGAAT  
 TGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCT  
 TGACATCCAGAGAAGCagCAGAGATGcAggtGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT  
 CGTCAGCtCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTCyAGCG  
 AGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGgAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATC  
 ATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCCAACCTTGGCAAAGTG  
 AGCGAaTCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGT  
 AGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATaCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGG  
 GAGTGGGCTGCAAAAGAAGTAGGTAGTTTAAcCTTCGGGAGAACGCTTACCCTTTGTGGTTCATGACTg  
 ggtgaagtcgtaacaa

#### Cluster 19

R-356, primer tercio del gen 16S rARN

ACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGCTAAC  
GTCAAATGATGCCGCTATTAACGACACCACCTTCCTCACTGCTGAAAGTACTTTACAACC  
CGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATAT  
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCA  
TCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAA  
TCCCACCTGGGCATATCCTGACGCGAGAGGCCGAAGGTCCCCCTCTTTGAGCCGAAGCT  
ATTATGCGGTATTAGCCATCGTTCCAATGGTTATCCCCACATCAGGGCAATTTCCCAG  
GCATTACTACCCGTCCGCCGCTCGACGCCGTTATCTCCACCCGAAGGCTTTGATAACTC  
GTTTCCGCTCGACTTGCATGTGTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAAT

### R-358, primer tercio del gen 16S rARN

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCAAAGCC  
TTCCGGTGGAGATAACGGCGTCGAGCGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCC  
TGATGTGGGGGATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAA  
GAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT  
GGACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGSCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACT  
TTCAGCAGTGAGGAAGGTGGTGTCTTAATAGCGGCATCATTGACGTTAGCTGCAGAAG  
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

### Cluster 20

### CAIM 1130, primer tercio del gen 16S rARN

agATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAA  
CCTTCGGGGAACGaTAAcGGCGTCGAGCGCGGACCGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC  
CTTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAAcGCCTACGGGCCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAACAGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGCGCAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA  
CTTTAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTCTTAATAGCGGCATcTCTTGACGTTAGCAACAGA  
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA

### Cluster 23

### CAIM 964, primer tercio del gen 16S rARN

GATCATGGCTSCAGATTGAACGCTGGCGGCAGgcCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAC  
GACTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAAGCGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG  
CCTAGGAAATTGCCTTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAA  
TGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGG  
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG  
ATGATCAGCCACACTGGAACAGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG  
GGTTGTAAAGTACTTTAGTTGTGAGGARGGGGTGTCTTAATAGCGGCATCTCTTGAC

GTtAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGCTAATACGgAGgg  
t

### CAIM 1108, primer tercio del gen 16S rARN

tgatcatggctcagATTGAACGCTGGCGGCAGGsCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAC  
GAGTTATCTGAACCTTCGGGGgACGWTAASGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC  
CTAGGAAATTGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAAc  
GCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGA  
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA  
TGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA  
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCTTCGG  
GTTGTAAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGTGTCTGTTAATAGCGGCATcTCTTGACC  
TTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

### CAIM 1143, primer tercio del gen 16S rARN

acaattgacatgctagATTGAACGCTGGCGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAA  
CGAcTTACTGACCTTCGGGAACGTAAGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG  
GAAATTGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAA†GCTA  
CGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGC  
TAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  
AGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCTTCGGGTTG  
TAAAGTACTTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGTGTCTGTTAATAGCGGCATcTCTTGACGTTAG  
CtAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGTGCC

### Cluster 25

#### R-339, secuencia completa del 16S rARN

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGACCC  
TTCGGGTGACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCC  
TGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTTCGGGCCAAA  
GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTA  
AGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGWWCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT  
GGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAAGCACT  
TTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTGCTTGACGTTAGCGACAGAAG  
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCG  
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGG  
CTCAACCTCGGAACTGCATTTGAAACTGGCGGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAAT  
TTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  
CCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACCGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTC  
GGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAATG  
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGA

ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAGC  
TCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCC  
CGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAG  
ACTGCCGGTGATAAACCCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGA  
GTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCAGCCAACCTTGCGAAAAGTGAG  
CGAATCCCAAAAAGTGCGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA  
CACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGA  
GGACGCTCACCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA

### Cluster 26

#### R-481, primer tercio del gen 16S rARN

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAC  
CCTTCGGGTGACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGC  
CCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTTCGGGYCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCA  
CTTTCAGCAGTGAGGAAGGCGGGTACGTTAATAGCGTGCTCGTTTGACGTTAGCTGCAGA  
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGT

#### R-606, primer tercio del gen 16S rARN

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTAGA  
CCCTTCGGGTGACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTG  
CCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTTCGGGCC  
AAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA  
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGC  
ACTTTCAGCAGTGAGGAAGGCGGGTACGTTAATAGCGTGCTCKTTTGACGTTAGCTGCAG  
AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGT

### Cluster 28

#### CAIM 1445, primer tercio del gen 16S rARN

TTGATCATGgCTCAGATTGAaCGTGgCGGCAGGCCTAaCACATGCAAGTCGAGCGGAAA  
CGAGTTATCTGAACCTTCGGGGaACGATAACGsCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG  
CCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGgATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAA  
yGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACcTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGG  
ATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG  
ATGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG  
AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC

GGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTACTTGA  
CGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGgaggg  
T

### Cluster 31

#### R-381, secuencia completa del 16S rARN

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACC  
TTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTCCT  
TGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAA  
GAGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT  
GGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  
GCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACT  
TTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTCTTAATAGCGGCATYTCTTGACGTTAGCAACAGAAG  
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCG  
GAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGG  
CTCAACCTCGGAACTGCATTTGAAACTGGTGAAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAAT  
TTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCC  
CCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTC  
GGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAATG  
AATTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAGC  
TCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCC  
CGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTGTGGTTCAGCGAGTAATGTCCGGAACCTCCAGGGAG  
ACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGA  
GTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCAAACCTGCGAGAGTGAG  
CGAATCCAAAAAGTGGCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA  
CACCGCCCTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGG  
AGCTATACACA

#### R-410, secuencia completa del 16S rARN

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAA  
CCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTC  
CTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAAYGCTACGGGCCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA  
CTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTCTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGA  
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAAT  
CGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGG  
GGCTCAACCTCGGAACTGCATTTGAAACTGGTGAAGTACTGTAGAGGGGGGTAGA  
ATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGG  
CCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC

CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTT  
TCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAA  
TGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAA  
GAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGA  
GCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGT  
CCCCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGG  
AGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC  
GAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCDGCGAACTTGCGAGAGTG  
AGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG  
TCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA  
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGTTTAACTTTTCG  
GGGCGTGCATCACATCTTGTGTATAT

**R-412, primer tercio del gen 16S rARN**

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACC  
TTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCT  
TGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCCCAA  
GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT  
GGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  
GCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACT  
TTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAG  
AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

**R-550, primer tercio del gen 16S rARN**

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAA  
CCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC  
CTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA  
CTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGA  
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

**R-559, primer tercio del gen 16S rARN**

ATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTT  
ATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG  
AAATTGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAAYGCCTA  
CGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGC  
TAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  
AGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTG  
TAAAGTACTTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAG  
CAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGA

R-571, primer tercio del gen 16S rARN

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAA  
CCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC  
CTTGATGTGGGGGATAACCATTGAAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGGCGAAAGCCTGATGCACCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC  
TTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCGTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGAA  
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

R-753, primer tercio del gen 16S rARN

ACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCCTTCTTCTGTTGCTAAC  
GTCAAGAGATAGCGCTATTAACGCTACCCCTTCTCACAACGAAAGTACTTTACAACC  
CGAAGGCCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATGTGCAATAT  
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGATCA  
TCCTCTCAGACCAGTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAA  
TCCCACCTAGGCATATCTTGACGCGAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTTTGGCCCGTAGGC  
ATTATGCGGTATAGCCATCGTTCCAATGGGTTATCCCCACATCAAGGCAATTTCCCTAG  
GCATTACTACCCGTCGCCCGCTCGACGCCCGTATCGTCCCCGAGTCAGTACTCGTTCCG  
TCGCTGCATGTGTTAGGCTGCCGCACGTCATCT

Cluster 32

R-554, primer tercio del gen 16S rARN

ATTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA  
AACGAGCTTAATCTGAACCTTCGGGGAACGTTAASGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGCCTAGGAAATTGCCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGAAAACGATGGCTAATACCGC  
ATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGG  
TGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA  
GAGGATGATCAGCCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC  
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCGTTAATAGCGGCATCTC  
TTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG  
A

R-600, primer tercio del gen 16S rARN

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGCTTAACTGA  
ACCTTCGGGGAACGTTAASGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTG  
CCTTGATGTGGGGGATAACCATTGAAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCC  
AAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC

ACTGGAAGCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA  
TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGT  
ACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCGTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAG  
AAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG

**R-657, primer tercio del gen 16S rARN**

GATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAAC  
CTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCC  
TTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAA  
AGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGT  
GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC  
TGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG  
GGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC  
TTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCGTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGAA  
GAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

**R-677, primer tercio del gen 16S rARN**

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTAATCTGAAC  
CTTCGGGGAACGTTAASGGSCGTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC  
CTTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCC  
AAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGAAGCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA  
TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGT  
ACTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTGCGTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAG  
AAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

**R-677, tercer tercio del gen 16S rARN**

TACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAGCTCTGAGAC  
AGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGA  
GCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCAGGGAGACTGCCCG  
TGATAAACC GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGGGCGGCGCACTTCCGAGAGTGAGCGAATCC  
CAAAAAGTGGCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG  
CTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCC GGCCCTGTACACACCGCC  
CGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGTGGGTAGTTTAACTTTCGGGGAGGACG  
CTCACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA

**R-718, primer tercio del gen 16S rARN**

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGASTTATCTGAA

CCTTCGGGGAACGWTAASGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC  
CTTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA  
CTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTCTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGA  
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAG

**R-719, primer tercio del gen 16S rARN**

GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTATCTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGG  
CGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCTTGATGTGGGGGATAACCA  
TTGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC  
TCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCTCACCAAG  
GGCAGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC  
CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTTGTGAGGAAGGG  
GGTGTCTGTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

**R-719, tercer tercio del gen 16S rARN**

ACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAGCTCTGAGACA  
GGTGTGTCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCCTTATCCTTGTTTGGCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGCT  
GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCAATCATGAGGCTTACGAGTAGGGCTA  
CACACGTGCTACAATGGCGCATACAGATGGCAGCGAACTTGCAGAGTGAGCGAATCCCA  
AAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA

**R-761, primer tercio del gen 16S rARN**

GATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTATCTGAAC  
CTTCGGGGAACGTTAASGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCC  
TTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAA  
AGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGT  
GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC  
TGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG  
GGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC  
TTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTCTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGAA  
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT

Grupo D

## CAIM 1438, primer tercio del gen 16S rARN

at ttgatcaTGgCTcAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA  
AACGACACTAACAAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA  
TGCCTAGGAAATTGCCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCAT  
AATgcCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTG  
GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA  
GGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG  
GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCT  
TCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAGcGTTAATAGCGCTATCTCTT  
GACGTTAGCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG  
GT

Grupo J

## CAIM 1115, primer tercio del gen 16S rARN

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAA  
CCTTCGGGGAACGATAAGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC  
CTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAAYGCCTACGGGCCA  
AAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAAGTGAAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT  
GGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTA  
CTTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTCTGTTAATAGCGGCATCTCTTGACGTTAGCAACAGA  
AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG

*V. gigantis*CAIM 25<sup>T</sup>, secuencia completa del gen 16S rARN

ATGgCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACT  
AACAAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAA  
ATTGCCCTTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGG  
GCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGT  
TGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA  
CACTGGAAGTGAAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA  
TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTA  
CTTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAGYGTAAATAGCGCTATCTCTTGACGTTAGCAACAGAA  
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCG  
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGC  
TCAACCTCGGAAGTGCATTTGAAACTGGTGAAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTT  
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGCCGAAGGCGGCCCT  
GGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT

AGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGC  
TAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGA  
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTAC  
CTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAGCTCTGAGAC  
AGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAG  
CGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTG  
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA  
CACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAA  
AGTGGCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA  
ATCGTGAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCAGGGCCTTGACACACCGCCCGTACA  
CCATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGTTTAACTTTCGGGGAGGACGCTCACCAC  
TTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA

*V. crassostreae*

CAIM 1405<sup>T</sup>, secuencia completa del gen 16S rARN

GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACTAA  
CAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTTCGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAAT  
TGCCTTGATGTGGGGGATAACCATTTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGC  
CAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA  
CTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG  
GGCGAAAGCCTGATGCGAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACT  
TTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTAKHGTTAATAGCGCTATCTCTTGACGTTAGCAACAGAAGA  
AGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGA  
ATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTC  
AACCTCGGAACCTGCATTTGAAACTGGTGAACCTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCA  
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTÁGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG  
ACAGATACTGACACTCAGATGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTA  
ACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGACG  
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCT  
ACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCGAGGTGTCCTTCGGGAGCTCTGAGACAG  
GTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCG  
CAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTGT  
AAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACA  
CGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAG  
TGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  
CGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCAGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACC  
ATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGTTTAACTTTCGGGGAGGACGCTCACCCTT  
TGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAA