



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.**

TESIS

PATOGENICIDAD DE *Vibrio harveyi* (CAIM 1792)  
ASOCIADA AL SÍNDROME DE ROJOS VIVOS EN EL  
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus*  
*vannamei*.

POR

L.B.A. Marco Antonio Beltrán Velarde

TESIS APROBADA POR LA:

UNIDAD MAZATLÁN  
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Mazatlán, Sinaloa, Febrero del 2011

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

Se permiten citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe del Área correspondiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C; apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, código postal, 83000, México, para citas o consultas más completas con fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.

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

---

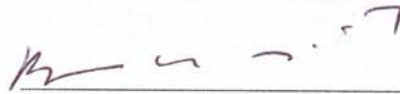
Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General del CIAD, A.C.

## APROBACIÓN

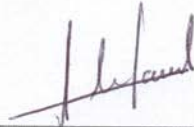
Los miembros de este comité designado para revisar la tesis de Marco Antonio Beltrán Velarde, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Acuicultura.



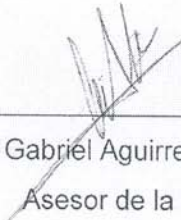
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez  
Director de Tesis



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
Asesor del CIAD



Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
Asesor del CIAD



Dr. Gabriel Aguirre Guzmán  
Asesor de la UAT

## **AGRADECIMIENTOS**

El primer agradecimiento es para CONACYT por la beca otorgada durante el periodo de mi maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por recibirme en sus instalaciones y hacer posible la culminación de mi postgrado.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la terminación de mi tesis.

A mi familia que en todos mis alti-bajos siempre estuvieron brindándome todo su apoyo y animándome para salir adelante muchas gracias.

A la Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez por ser mi directora de tesis y maestra muchas gracias por todo el apoyo brindado.

Al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala (CIAD), Dra. Silvia Alejandra García Gasca (CIAD) y Dr. Gabriel Aguirre Guzmán (UAT) por ser los asesores y ayudarme en la revisión de mi tesis, gracias.

Al M.V.Z. Rodolfo Lozano Olvera por su apoyo en toda la parte de histología, durante las infecciones, brindarme su amistad y confianza gracias.

Al I.P. Francis Isela Marrujo López por su apoyo durante las infecciones, por su amistad y por estar dispuesta ayudarme cuando la necesité muchas gracias.

A mis compañeros de maestría Ulises, Martha Olivia, Martha Daniela, Mauricio, Cecy, Katia y Héctor, por estar en esta etapa de mi vida.

## DEDICATORIA

Con todo mi cariño para mi mamá Esperanza Velarde Canizalez y mi esposa Guadalupe Avendaño Gaxiola, quienes pusieron su confianza en mí y me apoyaron en todo cuando las necesite, con el fin de que lograra una meta más en mi vida profesional.

Para mis hermanos, Judith, Roberto, Marlén y Amanda de quienes recibí ánimos y me han deseado lo mejor en la vida.

Para mis abuelos Malaquias y Alicia que me han brindado muchos consejos y me enseñaron a recorrer los caminos de la vida y siempre están apoyándome en todo.

Para el resto de mi familia y amigos que estuvieron cuando los necesité, con mucho cariño para todos.

*Marco Antonio Beltrán Velarde*

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> -----	6
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> -----	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> -----	9
<b>1. RESUMEN</b> -----	12
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> -----	13
<b>3. ANTECEDENTES</b> -----	16
3.1 Producción de camarón -----	16
3.2 Patogenicidad bacteriana -----	16
3.3 Estudios de patogenicidad con <i>V. harveyi</i> -----	18
3.4 Productos extracelulares (PECs) -----	19
3.5 Factores y mecanismos de patogenicidad-----	22
3.5.1 Proteasas bacterianas -----	22
3.5.2 Factores de adherencia -----	23
3.5.3 Mecanismos de adquisición de hierro -----	24
3.6 Histología-----	25
3.7 Síndrome de rojos vivos -----	26
3.8 Factores que afectan la virulencia -----	27
<b>4. HIPÓTESIS</b> -----	29
<b>5. OBJETIVOS</b> -----	30
5.1 Objetivo general -----	30
5.2 Objetivos particulares -----	30
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	31
6.1 Viabilidad (conteo total viable)-----	31
6.2 Crecimiento bacteriano-----	32
6.3 Productos extracelulares (PECs) -----	33
6.4 Factores y mecanismos de patogenicidad -----	33
6.4.1 Prueba de agregación de sal-----	33
6.4.2 Prueba de adhesión bacteriana a hidrocarburos (PABH) -----	34
6.4.3 Formación de biopelículas -----	35
6.4.4 Detección de sideróforos -----	36
6.4.5 Producción de proteasas -----	36
6.4.6 Producción de gelatinasas -----	37

6.4.7	Producción de ureasas-----	37
6.5	Desafíos experimentales -----	37
6.5.1	Organismos de prueba -----	38
6.5.2	Cepa e inóculo bacteriano -----	38
6.5.3	Infecciones experimentales con la bacteria -----	38
6.5.4	Desafío experimental con los PECs-----	40
6.5.5	Infección en camarones a diferentes salinidades-----	40
6.6	Histología -----	41
6.7	Análisis estadístico -----	42
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS -----</b>	<b>43</b>
7.1	Viabilidad de la bacteria-----	43
7.2	Crecimiento de <i>V. harveyi</i> -----	45
7.3	Productos extracelulares-----	47
7.4	Hidrofobicidad de la superficie celular de la cepa CAIM 1792 (PAS y PABH) -----	47
7.5	Formación de biopelículas -----	48
7.6	Detección de sideróforos -----	49
7.7	Producción de proteasas de la cepa CAIM 1792 y sus PECs-----	49
7.8	Producción de gelatinasas y ureasas -----	50
7.9	Infecciones experimentales con <i>V. harveyi</i> -----	50
7.10	Mortalidad con los PECs de <i>V. harveyi</i> -----	55
7.11	Análisis histopatológico -----	57
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN -----</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES -----</b>	<b>75</b>
<b>10.</b>	<b>RECOMENDACIONES -----</b>	<b>77</b>
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA -----</b>	<b>78</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS -----</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Factores de virulencia que promueven la colonización y supervivencia de las bacterias-----	17
2	Cepas de <i>V. harveyi</i> desafiadas en camarones juveniles-----	18
3	PECs de cepas de vibrios que causan mortalidad en camarones juveniles-----	20
4	Mecanismos de patogenicidad de <i>V. harveyi</i> -----	22
5	Criterios de hidrofobicidad celular-----	35
6	Halos de inhibición (mm) de los ensayos de producción de proteasas-----	50
7	Variables fisicoquímicas del agua durante los bioensayos-----	57



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prueba de viabilidad (conteo total viable) de la cepa CAIM 1792 cultivada en caldo peptonado-----	44
2	Prueba de crecimiento (CAIM 1792) evaluando la densidad bacteriana por espectrofotometría.-----	46
3	Adhesión bacteriana (%) de la cepa CAIM 1792 cultivada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ a hidrocarburos.-----	48
4	Formación de biopelículas a las 48 h de la cepa CAIM 1792.-----	48
5	Colonias de la cepa CAIM 1792 crecida en medio CAS a salinidad de 10 ‰ positiva a producción de sideróforos.-----	49
6	Signos gruesos observados en los camarones inyectados con la cepa CAIM 1792 y sus PECs-----	51
7	Mortalidad acumulada de <i>L. vannamei</i> desafiado con <i>V. harveyi</i> cepa CAIM 1792, dosis de $2 \times 10^2$ UFC/g y $2 \times 10^3$ UFC/g.-----	52
8	Mortalidad acumulada de <i>L. vannamei</i> infectado con <i>V. harveyi</i> cepa CAIM 1792 a dosis de $2.8 \times 10^4$ UFC/g, crecida en medios con diferente salinidad.-----	53
9	Gel de electroforesis de los aislados de hemolinfa de camarones moribundos inyectados con la cepa CAIM 1792.-----	54
10	Ensayo 1. Porcentaje de mortalidad acumulada de <i>L. vannamei</i> inyectado con los PECs de <i>V. harveyi</i> cepa CAIM 1792 crecida en medios con diferente salinidad.-----	55
11	Ensayo 2. Porcentaje de mortalidad acumulada de <i>L. vannamei</i> inyectado con los PECs de <i>V. harveyi</i> cepa CAIM 1792 crecida en medios con diferente salinidad.-----	56
12	Mortalidad acumulada de <i>L. vannamei</i> cultivado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ inyectado con <i>V. harveyi</i> cepa CAIM 1792 crecida a 25 ‰.-----	57

13	Microfotografía del sitio de inyección de los camarones infectados con la cepa CAIM 1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰.--	59
14	Microfotografía del corazón de los camarones infectados con la cepa CAIM1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰.-----	60
15	Microfotografía del corazón aparentemente sano de los organismos inyectados con el tratamiento de 20 ‰.-----	61
16	Microfotografía del órgano linfoide de los camarones inyectados con la cepa crecida a 10, 20 y 40 ‰.-----	62
17	Microfotografía del órgano linfoide de los camarones infectados con la cepa CAIM1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰.---	63
18	Microfotografía del sitio de inyección de los camarones inyectados con los PECs de la cepa CAIM1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰.-----	64
19	Microfotografía del corazón de los camarones inyectados con los PECs de la cepa CAIM1792.-----	65
20	Microfotografía del órgano linfoide de los camarones inyectados con los PECs de la cepa CAIM1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰.-----	66

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
1	Protocolo para la preparación de las placas de agar CAS.-----	93
2	Deshidratación y embebido de parafina en los tejidos.-----	93
3	Protocolo de la tinción con hematoxilina (Harris) eosina-floxina.-----	94
4	Protocolo para la preparación de BFS.-----	94
5	Mortalidad (% y DS) de <i>L. vannamei</i> infectado con <i>V. harveyi</i> , dosis de $2 \times 10^2$ UFC/g y $2 \times 10^3$ UFC/g.-----	95
6	Mortalidad (% y DS) de <i>L. vannamei</i> infectado con <i>V. harveyi</i> a dosis de $2.4 \times 10^4$ UFC/g, crecida en medios con diferente salinidad.-----	95
7	Mortalidad (% y DS) de <i>L. vannamei</i> inyectado con los PECs de <i>V. harveyi</i> , crecida en medios con diferente salinidad. Primer ensayo-----	96
8	Mortalidad (% y DS) de <i>L. vannamei</i> inyectado con los PECs de <i>V. harveyi</i> , crecida en medios con diferente salinidad. Segundo ensayo-----	96
9	Mortalidad (% y DS) de <i>L. vannamei</i> cultivado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ inyectado con <i>V. harveyi</i> cepa CAIM 1792 crecida a 25 ‰.-----	97

## 1.- RESUMEN

Cepas de *Vibrio harveyi* se han relacionado con mortalidades significativas de camarón cultivado en diferentes partes del mundo. En años recientes se han observado brotes infecciosos en camarón cultivado al sur de Sinaloa, reportando organismos moribundos con opacidad y/o puntos rojizos en el abdomen, además de mortalidades, provocados por una cepa de *V. harveyi*. La virulencia de *V. harveyi* (cepa CAIM 1792) aislada de los brotes antes señalados y cultivada en medios a diferente salinidad (10, 20 y 40 ‰) fue estudiada en juveniles de *Litopenaeus vannamei*, usando las células bacterianas y sus correspondientes productos extracelulares (PECs). La cepa CAIM 1792 creció en medios de cultivo desde 0 hasta 100 ‰. Las células bacterianas y sus PECs fueron letales para *L. vannamei*, encontrándose mortalidades iguales inyectando las células bacterianas, sin embargo, la mortalidad producida por los PECs fue significativamente mayor en los obtenidos a 20 y 40 ‰. La cepa CAIM 1792 fue hidrofóbica por la prueba de adhesión bacteriana a hidrocarburos, formó biopelículas y produjo sideróforos, no presentando diferencias entre sus tratamientos (10, 20 y 40 ‰). Las células y los PECs fueron positivas a la producción de proteasas, encontrándose el tratamiento 10 ‰ mayor en ambos casos. Daños histológicos fueron encontrados en los organismos inyectados con las células bacterianas y sus PECs. Se concluye que la salinidad del medio donde se cultiva la cepa CAIM 1792 juega un papel importante en la virulencia de la misma.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, productos extracelulares, virulencia, *Vibrio harveyi*.

## 2.- INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la producción camaronícola en México se ha incrementado de manera considerable. Entre los diferentes problemas que enfrenta la industria acuícola destacan las enfermedades infecciosas causadas por virus y bacterias. Las epizootias bacterianas asociadas a *Vibrio*, pueden causar mortalidades importantes (Jayasree *et al.*, 2006; Rattanama *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010). Estas bacterias son microorganismos oportunistas que aprovechan los cambios en el medio para proliferar y afectar la supervivencia en los diferentes estadios del camarón cultivado produciendo pérdidas en la producción.

La familia *Vibrionaceae* son bacterias Gram negativas, presentes en los ambientes acuáticos. Las bacterias de esta familia muestran un alto grado de diversidad genética lo que les permite colonizar diferentes nichos, por lo que las podemos encontrar tanto en ambientes marinos como de agua dulce. Viven libremente en formas planctónicas, asociadas a biopelículas y como organismos patógenos, comensales o bacterias mutualistas (Thompson *et al.*, 2004).

Algunas especies y cepas de *Vibrio* causan mortalidades significativas en camarón, dentro de las cuales se incluye a *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo*, *V. parahaemolyticus* y *V. penaeicida* (Soto-Rodriguez *et al.*, 2003; Rattanama *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010). *V. harveyi* es una de las especies bacterianas que causan mortalidades al camarón, estas son bacterias marinas Gram negativas, que puede presentar el fenotipo de la luminiscencia, se desarrollan desde los 4 °C hasta 35 °C y en salinidades desde 5 hasta 100 ‰. *V. harveyi* puede ser encontrada en forma libre, formando biopelículas, comensal, oportunista y patógeno de organismos marinos (Owens y Busico-Salcedo, 2006).

*Vibrio harveyi* se ha relacionado con mortalidades significativas de camarón cultivado en Australia (Pizzutto y Hirst, 1995), Ecuador (Robertson *et al.*, 1998), Filipinas (Baticados *et al.*, 1990), India (Karunasagar *et al.*, 1994), Indonesia (Prayitno y Latchford, 1995), Tailandia (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) y Venezuela (Alvarez *et al.*, 1998). Para obtener su patogenicidad, *V. harveyi* activa diferentes mecanismos y factores de virulencia como: capacidad de adherencia, formación de biopelículas (Karunasagar *et al.*, 1994), lipopolisacáridos (Montero y Austin, 1999), producción de sideróforos (Owens *et al.*, 1996), producción de enzimas tóxicas (Lui *et al.*, 1996) y “quorum sensing” (Henke y Bassler, 2004). Diversos mecanismos y factores son activados por el medio ambiente y estrés al que están expuestas las bacterias (Prayitno y Latchford, 1995; Bordas *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2008).

En los últimos años, se han observado brotes infecciosos recurrentes en granjas de camarón del sur de Sinaloa, México. Los granjeros reportan camarones moribundos con opacidad y/o puntos de color rojizo principalmente en el abdomen, asociado a altas mortalidades, por lo cual se les ha llamado por los productores “camarones rojos vivos”. Muestras de camarones con estos signos han sido analizados desde el año 2005 en las instalaciones del CIAD, A.C. Unidad Mazatlán, donde se han realizado análisis en fresco, histopatológicos, bacteriológicos y moleculares (rep-PCR). A la fecha se ha identificado a una cepa de *V. harveyi* por rep-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos repetidos), como la responsable de este síndrome, designada como CAIM 1792 (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010b).

Debido a que el Síndrome de los Rojos Vivos se ha presentado de forma recurrente en las granjas de camarón de la región provocando mortalidades masivas, es importante realizar estudios encaminados a determinar la patogenicidad de *V. harveyi* cepa CAIM 1792 en camarones peneidos. En este trabajo se evaluó la relación entre la salinidad del medio y la virulencia de *V. harveyi* cepa CAIM 1792 causante del “Síndrome de los Rojos Vivos” en el camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*. Por lo que la información obtenida puede ser de gran ayuda para los acuicultores a fin de definir estrategias de control y/o medidas profilácticas que ayuden a evitar los problemas ocasionados por el Síndrome de los Rojos Vivos.

### 3.- ANTECEDENTES

#### 3.1.- Producción de camarón

La producción de camarón en México se ha llevado a cabo principalmente en varios de los estados costeros del noroeste, en el 2008 se registraron 72, 229 Ha (869 granjas), siendo 42, 239 Ha (462 granjas) del estado de Sinaloa en donde la principal especie de camarón cultivado es *L. vannamei* (CONAPESCA, 2010). En el año 2007, México fue uno de los principales productores de camarón cultivado ya que se ubicó en el séptimo lugar a nivel mundial con una producción de 112, 000 ton (CONAPESCA, 2010). El camarón es la principal especie cultivada en México, en el 2008 alcanzó una producción de 130, 049 ton. Entre los principales estados productores se encuentran Sonora, Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur, siendo Sonora el primer productor con 81, 322 ton (2008) y Sinaloa el segundo con 37, 413 ton en el mismo año, con un valor de producción de 1, 438, 141, 000 pesos. En ese año Sinaloa llegó a una participación del camarón cultivado en la producción pesquera nacional del 47.48 % (CONAPESCA, 2010).

El incremento en la producción de camarón cultivado ha generado problemas y estos se relacionan principalmente a enfermedades infecciosas (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010b). Entre las enfermedades que en los últimos años han azotado a la industria camaronícola en México provocando altas tasas de mortalidad y por consecuencia pérdidas económicas a los productores encontramos, síndrome del virus de la mancha blanca, virus de la necrosis infecciosa hipodermal hematopoyética, síndrome del virus de Taura, hepatopancreatitis necrotizante y vibriosis. En México la vibriosis es una de las enfermedades principales en el cultivo del camarón y en los últimos años ha presentado brotes recurrentes (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010a)



### 3.2.- Patogenicidad bacteriana

El término patogenicidad es definido como la habilidad de los organismos para causar una enfermedad y es medido por la virulencia, que es el grado de patogenicidad o la severidad de la enfermedad causada por el patógeno (Todar, 2009). La patogenicidad bacteriana está directamente relacionada con las características estructurales, genéticas y mecanismos bioquímicos de los microorganismos (Todar, 2009). Estos mecanismos pueden ser: presencia de cápsulas, lipopolisacáridos u otros componentes de la pared celular, capacidad de adherencia, secreción de sustancias extracelulares e intracelulares que permitan dañar a los tejidos del huésped (Tabla 1).

Los factores de virulencia pueden ser clasificados por la capacidad de permitir la colonización e invasión de los tejidos del huésped, dañar los tejidos y enfermar al huésped.

Tabla 1.- Factores de virulencia que promueven la colonización y supervivencia de las bacterias (Todar, 2009).

Factores de virulencia	Función
Pilis	Adherencia a la superficie de las mucosas.
Adhesinas no fibrilares	Unión a las células del huésped.
Motilidad y quimiotaxis	Ayuda a la fijación de las superficies de las mucosas en áreas de fluido rápido.
Sideróforos	Permiten la adquisición de hierro.
Cápsulas (polisacáridos)	Evitan la fagocitosis.
Proteínas tóxicas	Protegen de la muerte por fagocitosis, reducen la intensidad del choque oxidativo.
Antígenos	Permite evadir la respuesta de anticuerpos.

Al ingresar un patógeno capaz de causar daño en un huésped se inicia el proceso de infección, el cual comprende las etapas de entrada, adhesión,

colonización, multiplicación, persistencia e infección. En ocasiones el huésped tolera la etapa de colonización por un patógeno restringiéndolo a regiones donde no cause daño, pero si este patógeno logra avanzar del punto de infección original y evade las defensas, puede producir daños significativos sobre el organismo propiciando una enfermedad (Salyers y Whitt, 1994).

### 3.3.- Estudios de patogenicidad con *V. harveyi*

Debido a los problemas recurrentes de enfermedades de tipo bacteriano en los laboratorios de producción de postlarvas y granjas camaronícolas, se han realizado diferentes infecciones experimentales con camarones juveniles probando las cepas y especies de vibrios aisladas de camarones enfermos (Tabla 2).

Tabla 2.- Cepas de *Vibrio harveyi* desafiadas en camarones juveniles.

Cepa	Especie de camarón	Mortalidad (%)	Tiempo (h)	Dosis (UFC/g)	Referencia
S-2	<i>P. monodon</i>	86	24	$3.6 \times 10^3$	Jiravanichpaisal <i>et al.</i> 1994
B-4	<i>P. monodon</i>	80	20	$2.1 \times 10^4$	Jiravanichpaisal <i>et al.</i> 1994
770527	<i>P. monodon</i>	50	Nd	$8.2 \times 10^4$	Liu <i>et al.</i> 1996
820514	<i>P. monodon</i>	50	Nd	$8.7 \times 10^4$	Liu <i>et al.</i> 1996
A1	<i>P. monodon</i>	50	Nd	$4.9 \times 10^4$	Lui <i>et al.</i> 1996
ACE	<i>P. monodon</i>	53	168	$1.0 \times 10^5$	Alapide y Dureza 1997
ACE	<i>P. monodon</i>	50	48	$1.0 \times 10^3$	Jayasree <i>et al.</i> 2006
ACE	<i>P. monodon</i>	50	48	$2.5 \times 10^4$	Jayasree <i>et al.</i> 2006
ACE	<i>P. monodon</i>	100	168	$1.5 \times 10^3$	Manilal <i>et al.</i> 2010
CAIM	<i>L. vannamei</i>	100	48	$8.1 \times 10^3$	Soto-Rodriguez <i>et al.</i> 2010

ACE = aislada de camarones enfermos; Nd = no disponible; UFC = unidades formadoras de colonias.

Además de desafíos experimentales en camarones juveniles, en los estadios larvales también se tienen reportes de mortalidades provocadas por cepas de *V. harveyi*. Karunasagar *et al.* (1994) encontraron cepas que causan mortalidades entre 44 y 80 % en postlarvas de *P. monodon* a los cinco días de exposición, encontraron DL<sub>50</sub> de  $2.6 \times 10^3$  UFC/ml, además en protozoos de la misma especie de camarón, *V. harveyi* provocó mortalidades del 50 y 100 % en 40 h a densidades bacterianas de  $10^4$  y  $10^6$  UFC/ml respectivamente (Harris y Owens, 1999). En el mismo estadio larval pero de *L. vannamei*, *V. harveyi* (cepa STD3-101) produce mortalidades del 51 y 90 % con densidades bacterianas de  $10^4$  y  $10^7$  UFC/ml durante 2 h de inmersión, respectivamente (Robertson *et al.*, 1998), lo que puede sugerir un mayor grado de virulencia de esta última cepa o menor resistencia de la especie de camarón a esta bacteria.

Las cepas de *V. harveyi* presentan diferentes perfiles genéticos y proteicos, algunos de ellos conocidos como factores de virulencia, que le permiten ser patógena para un amplio número de organismos marinos, esta diversidad genética se debe probablemente a que obtienen elementos móviles como plásmidos y bacteriófagos, lo cual dificulta la distinción entre las cepas virulentas y las no virulentas (Pizzutto y Hirst, 1995). Se ha encontrado en infecciones experimentales con vibrios una correlación positiva entre la mortalidad de nauplios de *Artemia franciscana* y la producción de proteasas, fosfolipasas y sideróforos, sugiriendo que la virulencia está relacionada principalmente con la producción de algunas exoenzimas (Soto-Rodriguez *et al.*, 2003). En nauplios de *A. franciscana* se reportaron mortalidades del 90 % a las 48 h postinfección con *V. harveyi* (cepa BB120) cuando se infectaron con una densidad bacteriana de  $10^4$  UFC/ml (Defoirdt *et al.*, 2005). En abulón juvenil *Haliotis tuberculata* de 35 mm, se reportaron tasas de mortalidad arriba del 80 % cuando se infectó con tres cepas patógenas de *V. harveyi* aisladas de abulones enfermos, reportando una DL<sub>50</sub> de  $2.5 \times 10^2$  UFC/ml (Travers *et al.*, 2009).

### 3.4.- Productos extracelulares (PECs)

Algunas cepas de especies de *Vibrio* producen productos extracelulares (PECs) tóxicos. Entre ellos se encuentran factores de virulencia como las citolisinas, proteasas, lipasas, sideróforos, hemolisinas y exopolisacáridos (Shinoda, 1999; Su *et al.*, 2004; Zhang y Austin, 2005; Croxatto *et al.*, 2007; Wyckoff *et al.*, 2007). Los PECs de algunas especies de *Vibrio* son tóxicos cuando son inyectados en el camarón y otras especies de organismos marinos (Tabla 3).

Tabla 3.- PECs de cepas de *Vibrio* que causan mortalidad en camarones juveniles.

Especie bacteriana	Cepa	Especie	DL <sub>50</sub> *	Referencia
<i>V. harveyi</i>	ATCC25919	<i>P. monodon</i>	2.7	Liu <i>et al.</i> (1996)
<i>V. harveyi</i>	ATCC14226 <sup>T</sup>	<i>P. monodon</i>	2.34	Liu <i>et al.</i> (1996)
<i>V. harveyi</i>	820514	<i>P. monodon</i>	1.2-1.5	Liu <i>et al.</i> (1996)
<i>V. alginolyticus</i>	Val	<i>P. monodon</i>	0.23	Lee <i>et al.</i> (1996)
<i>V. alginolyticus</i>	Val	<i>P. japonicus</i>	0.63	Lee <i>et al.</i> (1996)
<i>V. alginolyticus</i>	Swy	<i>P. japonicus</i>	0.27	Lee <i>et al.</i> (1997)
<i>V. harveyi</i>	47666-1	<i>P. monodon</i>	3.5	Harris y Owens (1999)
<i>V. harveyi</i>	ACMM642	<i>P. monodon</i>	3.3	Harris y Owens (1999)
<i>V. harveyi</i>	Vb5	<i>P. monodon</i>	< 10	Manilal <i>et al.</i> 2010
<i>V. alginolyticus</i>	Vb11	<i>P. monodon</i>	32	Manilal <i>et al.</i> 2010
<i>V. fischeri</i>	Vb17	<i>P. monodon</i>	38	Manilal <i>et al.</i> 2010

\* (µg de proteína/g)

Lee *et al.* (1996) reportan mortalidades con los PECs y una proteína purificada (proteasa) extraídos de *V. alginolyticus* cepa SWY en juveniles de 12 g de *Marsupenaeus japonicus* (anteriormente llamado *P. japonicus*), sugieren que esta proteína es la principal responsable de la toxicidad de los PECs de esta cepa. Liu *et al.* (1996) encontraron que cepas de *V. harveyi* aisladas de

camarones enfermos son más patógenas que las cepas aisladas de agua de mar, en ensayos con la bacteria viable o sus PECs y mencionan que las proteasas, fosfolipasas y hemolisinas provenientes de la bacteria tienen un papel muy importante en la patogenicidad sobre el camarón tigre *P. monodon*.

Harris y Owens (1999) aislaron dos proteínas de dos cepas de *V. harveyi* aisladas de larvas enfermas de *P. monodon*, demostrando que estas son causa de mortalidad en camarón juvenil *P. monodon* y en ratón CBA, concluyen que las dos proteínas son exotoxinas y son probablemente los factores de virulencia de las respectivas cepas de *V. harveyi*. La cisteína proteasa extracelular producida por *V. harveyi*, cepa 820514, aislada de camarones *P. monodon* enfermos, es letal para juveniles de 10 g de esta especie de camarón, sugiriendo que esta proteasa es la principal toxina producida por la bacteria (Liu y Lee, 1999). Por otro lado, se ha reportado que las proteínas extracelulares de *V. harveyi* son factores de virulencia para los peneidos (Montero y Austin, 1999). Además, la virulencia de cepas bacterianas se ha relacionado a la producción de sideróforos (Owens *et al.*, 1996).

En trabajos más recientes se ha demostrado que los PECs de algunas cepas de vibrios son letales para diferentes organismos marinos como camarón, ostión, anguilas y peces (Binesse *et al.*, 2008; Valiente *et al.*, 2008; Won y Park, 2008).

Binesse *et al.* (2008) reportan mortalidades del 93.3 % a las 24 h con los PECs de *V. splendidus* inyectados en el ostión *Crassostrea gigas*. Por otro lado, los resultados de Hasegawa *et al.* (2008), coinciden con esto ya que encontraron que la metaloproteasa extracelular de *V. tubiashii* es el mayor factor de virulencia para las larvas de ostión del Pacífico *C. gigas*. Se ha demostrado que la Vsm, una metaloproteasa producida por *V. splendidus* (cepa LGP32), es un determinante esencial de la virulencia cuando los PECs son inyectados en los ostiones *C. gigas* (Gay *et al.*, 2004; Le Roux *et al.*, 2007).

Valiente *et al.* (2008) probaron la virulencia de la bacteria *V. vulnificus* y sus PECs en la anguila (*Anguilla anguilla*), encontrando que la virulencia no se debe a la septicemia en sangre y órganos internos, sino más bien al efecto de factores tóxicos de las metaloproteasas y reportan una DL<sub>50</sub> de 1.7 UFC/g en anguilas de 9 g. Las cepas de *V. harveyi* aisladas de peces enfermos, son causa de mortalidad para *Paralichthys olivaceus* (lenguado olivo) y *Sebastes schlegeli* (pez roca negro) con valores de DL<sub>50</sub> desde 2.48×10<sup>5</sup> hasta 8.76×10<sup>7</sup> UFC/g y desde 2.0×10<sup>4</sup> hasta 2.52×10<sup>6</sup> UFC/g respectivamente. En el caso de los PECs reportaron valores de la DL<sub>50</sub> desde 7.98 hasta 11.4 y desde 1.83 hasta 7.7 µg de proteína/g de pez, respectivamente (Won y Park, 2008).

Los mecanismos de patogenicidad de *V. harveyi* no son bien conocidos a la fecha, sin embargo; diferentes trabajos reportan factores de virulencia relacionados con cepas de *V. harveyi* (Tabla 4).

Tabla 4.- Mecanismos de patogenicidad de *Vibrio harveyi*

Mecanismos de patogenicidad	Referencia
Producción de exoenzimas	Lui <i>et al.</i> (1996) y Soto-Rodríguez <i>et al.</i> (2003)
Hemolisinas	Zhang y Austin (2000)
Lipopolisacáridos	Montero y Austin (1999)
Bacteriófagos	Oakey y Owens (2000)
Quorum sensing	Henke y Bassler (2004)
Sideróforos	Owens <i>et al.</i> (1996)
Formación de biopelículas	Karunasagar <i>et al.</i> (1994)

Tomada de Austin y Zhang 2006.

### 3.5.- Factores y mecanismos de patogenicidad bacterianas

#### 3.5.1.- Proteasas bacterianas

La producción de proteasas está considerada como un factor de virulencia importante en las bacterias patógenas. En general, las proteasas catalizan la hidrólisis de proteínas grandes en pequeños péptidos y aminoácidos para facilitar su absorción por la célula bacteriana. Existe una gran variedad de enzimas proteolíticas clasificadas en familias, entre las más importantes secretadas por bacterias se encuentran; las proteasas dependientes de la serina o de la cisteína, proteasas alcalinas de la serina, subtilisinas y metaloproteasas; dentro de este grupo se localizan las colagenasas, gelatinasas y elastasas (Neurath, 1989).

Proteasas dependientes de cisteína y serina, metaloproteasas y hemolisinas han sido aisladas de *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi* y *V. penaeicida* (Stensvag *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Harris y Owens, 1999). *Vibrio harveyi* produce una proteína extracelular de 38 kDa con actividad de proteasa, fosfolipasa y hemolítica y una proteasa alcalina de serina, que induce mortalidades en el camarón *P. monodon* (Liu *et al.*, 1996; 1997).

#### 3.5.2.- Factores de adherencia.

La hidrofobicidad es generalmente considerada como un factor muy importante en la virulencia de las cepas bacterianas (Lee y Yii, 1996). Se reporta que los microorganismos patógenos deben tener la capacidad de adherirse y colonizar superficies bióticas y abióticas para poder sobrevivir en los diferentes ambientes (Kirn *et al.*, 2005). Para muchas bacterias patógenas el primer paso para afectar la salud de un hospedero es la capacidad de adherirse

a la superficie de este, logrando una colonización, esta interacción esta mediada por macromoléculas llamadas colectivamente adhesinas.

La adhesión bacteriana es un proceso muy importante en la patogenicidad de bacterias ya que este proceso les permite la formación de biopelículas, que es un mecanismo de defensa contra desinfectantes y antibióticos (Dass *et al.*, 2007). Manilal *et al.* (2010) reporta que 29 cepas de *Vibrio* presentan alta adherencia a hidrocarburos, esta alta afinidad ha hidrocarburos es inherente para la formación de biopelículas que son un fuerte problema en acuicultura. La formación de biopelículas de *V. harveyi* en los sistemas de cultivo de peneidos y langostinos está altamente relacionada con mortalidades masivas en ambos crustáceos (Karunasagar *et al.*, 1994; Tonguthai, 1995).

### 3.5.3.- Mecanismos de adquisición de hierro

El hierro es de los cuatro elementos más abundantes en la corteza terrestre (Sandy y Butler, 2009). La adquisición de hierro del ambiente es indispensable para todos los organismos, debido a que tiene un papel muy importante en muchos procesos vitales para el desarrollo de la vida como lo son: reacciones de óxido-reducción, síntesis de adenosintrifosfato (ATP), destoxicación de radicales de oxígeno, transporte de electrones y otras reacciones bioquímicas (Guan *et al.*, 2001).

La adquisición de hierro es difícil para los microorganismos marinos debido a que las concentraciones de este elemento en el agua de mar son muy bajas. Por ello, los microorganismos requieren de mecanismos eficientes de captación de hierro. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (< 1,000 D) que tienen una alta afinidad por el hierro y pueden extraerlo de



complejos minerales o de proteínas acarreadoras, como la lactoferritina y la ferritina (Litwin y Calderwood, 1993).

Uno de los factores de virulencia implicados en la vibriosis es la habilidad para usar el hierro del medioambiente adyacente por sistemas de adquisición de hierro (Lorenzo *et al.*, 2004). Las bacterias del género *Vibrio* producen por lo general sideróforos del tipo catecolato (Cabaj y Kosakowska, 2009), como la vibriobactina. Aunque recientemente se ha demostrado que pueden producir varios tipos, en aislados de *V. harveyi* se ha reportado la producción de sideróforos de tipo catecolato, hidroxamatos y carboxilatos (Murugappan *et al.*, 2010).

### 3.6.- Histología

La enfermedad causada por vibrios en camarones juveniles y adultos se manifiesta por un nado errático seguido de una etapa letárgica, anorexia, lesiones multifocales en la cutícula del exoesqueleto y apéndices de color negro o café, debido al depósito de melanina sintetizada por el hospedero, las cuales erosionan la cutícula. Cuando la vibriosis es recurrente, el caparazón se torna de una apariencia rugosa y blanda lo que facilita lesiones mecánicas. Si las defensas del organismo son capaces de eliminar a las bacterias que producen este tipo de infección, después de la muda, los camarones recuperaran su exoesqueleto normal (Lightner, 1996). Camarones afectados por vibriosis presentan una expansión de los cromatóforos que se observa como una coloración rojiza en todo el cuerpo y opacidad del músculo. Internamente, hay formación de nódulos hemocíticos multifocales, encontrados generalmente en el órgano linfoide, hepatopáncreas, glándula antenal, corazón, branquias y músculo (Lightner, 1996).

Además de los estudios histopatológicos realizados en camarones infectados por vibrios de manera natural en las granjas de camarón cultivado, a nivel laboratorio se han realizado diferentes desafíos experimentales reportando los cambios a nivel tisular provocados por estas bacterias. Robertson *et al.* (1998) en su trabajo donde realizaron infecciones experimentales con *V. harveyi* en larvas de camarón blanco *L. vannamei* reportan la presencia de tejidos melanizados, nódulos hemocíticos y necrosis en las paredes del hepatopáncreas. En pruebas de inmunohistoquímica encontraron la presencia de bacterias en el intestino y túbulos del hepatopáncreas.

En camarones juveniles de *L. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus* cepa HL57 (CAIM 170) presentaron filamentos melanizados en las branquias, granulomas en las branquias y hepatopáncreas, moderada infiltración hemocítica, degeneración vacuolar, células picnóticas y colonias de bacteria en hepatopáncreas (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010). Daños similares fueron encontrados por Jiravannichpaisal *et al.* (1994) y Khuntia *et al.* (2008) en camarón *P. monodon* y *Macrobrachium rosenbergii* infectado con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* respectivamente.

En *L. vannamei* de 6-7 cm y *Farfantepenaeus brasiliensis* de la misma talla infectados con *V. alginolyticus* se reportaron cambios a nivel tisular similares en el hepatopáncreas de ambas especies, este órgano presentó necrosis, núcleos picnóticos, infiltración hemocítica y nódulos hemocíticos con bacterias en su interior (Esteve y Herrera, 2000a, 2000b). Estas lesiones coinciden con lo reportado por Sharshar y Azab (2008) en *M. rosenbergii* infectado con *V. vulnificus*. En el camarón juvenil *L. vannamei* de 4-5 g infectado con *V. alginolyticus* se observó en el músculo la presencia de bacterias, necrosis e infiltración hemocítica (Liu *et al.*, 2004).

### 3.7.- Síndrome de Rojos Vivos

En México, desde el 2005 se empezó a observar mortandad de 20 al 70 % en estanques de cultivo donde se observaban camarones con manchas rojas focales y multifocales en la cutícula, presentando lesiones en el epitelio cuticular, tejido conectivo y músculo, dándole al organismo una coloración rojiza, por lo que los acuicultores les llamaron “rojos vivos”. En desafíos experimentales con la cepa CAIM 1792 de *V. harveyi* se han encontrado mortalidades del 90 y 100 % cuando se inyectaron camarones *L. vannamei* a dosis de  $10^4$  UFC/g (Soto-Rodriguez *et al.*, 2010b).

### 3.8.- Factores ambientales que afectan la virulencia

La mayoría de las granjas de cultivo de camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* están estrechamente relacionadas con sistemas estuarinos, los cuales pueden variar su salinidad debido a la temporada de lluvias y al gran aporte de agua dulce que reciben por efluentes continentales. Estos cambios de salinidad en los sistemas de producción causan estrés a los organismos en cultivo, además de generar un ambiente adecuado para la proliferación de microorganismos oportunistas como las bacterias patógenas para el camarón. En las últimas décadas se han presentado diferentes epizootias bacterianas en los sistemas de producción relacionados a especies del género *Vibrio*, causando grandes mortalidades y por lo tanto pérdidas económicas a los productores (Soto-Rodriguez *et al.*, 2010a).

Las variables fisicoquímicas del agua en la que los organismos son cultivados pueden ser factores importantes que deprimen el sistema inmune de los crustáceos. Kautsty *et al.* (2000) encontraron que las fluctuaciones en la salinidad, oxígeno y temperatura del agua, pueden aumentar la susceptibilidad a enfermarse de los camarones. En bioensayos con camarón azul del Pacífico

*L. stylirostris* Harris y Owens (1999) y Saulnier (2000), sugieren que la virulencia de cepas de *Vibrio* está estrechamente relacionada con los cambios de factores bióticos y abióticos como: temperatura, salinidad, eutroficación, presencia de otros patógenos, estrés por manejo y estado fisiológico de los hospederos. La eutroficación del agua puede inducir un aumento en la densidad bacteriana de *V. nigripulchritudo* en el agua y puede inducir a activar los factores de virulencia (Lemonnier *et al.*, 2006).

Shivappa (1997) reporta que las fluctuaciones de las condiciones del medio ambiente como la temperatura, salinidad y oxígeno, tienen un efecto significativo en la virulencia de *V. harveyi*, siendo las variaciones de salinidad más letales que las de temperatura para las postlarvas de camarón *L. vannamei*. Prayitno y Latchford (1995) compararon las mortalidades de larvas y postlarvas de *P. monodon* inoculadas con *V. harveyi* cultivada a salinidades de 27, 20, 15 y 10 ‰ y pH de 5.5, 6.0, 7.2 y 9.0, encontrando que la bacteria provocó mortalidades significativas más altas en bajas salinidades (10 y 15 ‰) y en los pH más altos (6.0, 7.2 y 9.0), sugiriendo que el estrés provocado por salinidad y pH puede inducir a la bacteria a expresar genes de virulencia.

#### **4.- HIPÓTESIS**

La virulencia de *Vibrio harveyi*, cepa CAIM 1792, causante del Síndrome de los Rojos Vivos en *Litopenaeus vannamei* está relacionada con la concentración de sal del medio en el cual se cultiva la bacteria.

## 5.- OBJETIVOS

### 5.1.- Objetivo general

Evaluar el efecto de la salinidad del medio de crecimiento sobre la virulencia de *Vibrio harveyi*, cepa CAIM 1792 y los daños histológicos que provocan las células bacterianas y sus PECs en el camarón juvenil *Litopenaeus vannamei*.

### 5.2.- Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad de la cepa CAIM 1792 cultivada en medios bacteriológicos a salinidades de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ‰.
- Evaluar la virulencia de *V. harveyi*, cepa CAIM 1792, y toxicidad de sus productos extracelulares cultivada en medios bacteriológicos a salinidades de 10, 20 y 40 ‰, en desafíos experimentales con juveniles de *L. vannamei*.
- Evaluar la mortalidad del camarón juvenil *L. vannamei* infectado con *V. harveyi* mantenido a diferentes salinidades.
- Estimar la producción de diversos factores de virulencia de *V. harveyi*, cepa CAIM 1792 al crecerla a diferentes salinidades.
- Evaluar el proceso histopatológico en juveniles de camarón *L. vannamei* inyectados con las células viables y los PECs de *V. harveyi*, cepa CAIM 1792.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1.- Viabilidad (conteo total viable)

La cepa bacteriana CAIM 1792 identificada como *V. harveyi* por rep-PCR (Gomez-Gil *et al.*, 2004a; Lin *et al.*, 2010) fue obtenida de la colección de microorganismo de importancia acuática (CAIM, CIAD Mazatlán). La cepa CAIM 1792, fue aislada originalmente de lesiones de *L. vannamei* afectados por el síndrome de los rojos vivos de granjas del sur de Sinaloa (Soto-Rodriguez *et al.*, 2010b).

*Vibrio harveyi*, cepa CAIM 1792, fue reactivada de su criopreservación inoculando la cepa en 5 ml de caldo de soya tripticasa (TSB) + 2.0 % de NaCl (Bioxon ®), incubándose toda la noche a 30 °C sin agitación. Para obtener la suspensión bacteriana, se inocularon 100 µl de este caldo bacteriano en 10 ml de TSB + 2.0 % de NaCl (Bioxon ®) y se incubó durante la noche a 30 °C. Posteriormente se hicieron dos ensayos, el primero, por triplicado y el segundo con cinco réplicas para disminuir el error por muestreo, donde tubos de ensaye conteniendo 5 ml de caldo peptonado (Dibico ®) ajustados a salinidades de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ‰ con NaCl, fueron inoculados con 100 µl de la suspensión bacteriana.

Los tubos se incubaron a 30 °C durante 24 h y en todos los tratamientos con excepción del tratamiento con 0 ‰ (debido que a simple vista no se observó crecimiento bacteriano), se hicieron diluciones seriales agregando 100 µl de la suspensión original en 900 µl de solución salina estéril. De cada dilución se inoculó con un rastrillo de vidrio estéril 100 µl en placas de agar tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS Bioxon ®), las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C. Posteriormente a simple vista se contó el número de colonias reportándose en UFC/ml.

## 6.2.- Crecimiento bacteriano

Se inoculó la cepa CAIM 1792 en 10 ml de TSB + 2.0 % de NaCl y se incubó durante la noche a 30 °C. Posteriormente se hicieron dos ensayos, con cinco réplicas cada uno, en el primero, se inocularon tubos con 5 ml de caldo peptonado (Dibico ®) ajustados a salinidades de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ‰ con 100 µl de la suspensión incubada durante una noche. Luego se incubaron los tubos a 30 °C durante 24 h.

En el segundo ensayo se inocularon tubos con 5 ml de TSB (Bioxon ®) ajustados a salinidades de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ‰ con 100 µl de la suspensión incubada durante una noche a 30 °C. Luego se incubaron a 30 °C por 24 h. Posteriormente se midió la absorbancia de cada tubo a 610 nm con un espectrofotómetro Hach modelo DR/2010, usando como blanco un tubo similar sin inocular.

## 6.3.- Productos extracelulares (PECs)

Para la obtención de los PECs de la cepa CAIM 1792 se utilizó la técnica de extracción en medio sólido descrita por Zhang y Austin (2000). Primero se prepararon placas de 24 x 24 cm con 200 ml de agar de soya tripticasa (TSA Dibico ®) ajustando la salinidad a 10, 20 y 40 ‰ que se recubrieron con una membrana de papel celofán dulce estéril.

El inculo bacteriano se preparó incubando la bacteria toda la noche a 30 °C en 10 ml de TSB + 2.0 % de NaCl (Bioxon ®). Se inocularon 3 ml en cada placa previamente preparada empleando un rastrillo de vidrio estéril. Se incubaron las placas a 30 °C por 24 h, se lavaron las membranas de celofán con 15 ml de buffer fosfato salino (BFS) estéril, pH 7.2 (Anexo 4). Del producto del lavado se obtuvieron las suspensiones que se centrifugaron a 8, 500 rpm



durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de membranas estériles de celulosa de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore) para remover las células bacterianas. Todos los productos filtrados se sometieron a una prueba de esterilidad para asegurar que no hayan quedado células bacterianas viables, sembrando 20 µl en placa de agar TCBS (Dibico ®) que se incubaron toda la noche a 30 °C. En el caso de que las placas presentaran crecimiento se repetía el proceso de filtrado hasta que se aseguró la total esterilidad de los PECs. Se realizaron alícuotas de 1.5 ml de los PECs extraídos y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La concentración de proteínas presente en los PECs se cuantificó por el método de Bradford (1976). Se utilizó seroalbúmina de bovino (Sigma ®) como estándar para elaborar una curva de calibración empleando concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 µg/ml de seroalbúmina de bovino con tres réplicas por tratamiento.

A 100 µl de cada concentración de seroalbúmina, así como de las muestras de prueba y control (agua destilada) se añadieron 5 ml del reactivo de Bradford (Biorad ®). Una vez que las muestras fueron homogenizadas durante 15 min, se midió la absorbancia a 595 nm ( $A_{595}$ ). Los valores de absorbancia obtenidos de la curva de calibración se ajustaron a una recta para calcular la concentración de proteína total de las muestras de prueba.

#### 6.4.- Factores y mecanismos de patogenicidad

##### 6.4.1.- Prueba de agregación de sal

La hidrofobicidad de las células de *V. harveyi* se determinó por la prueba de agregación de sal (PAS). La cepa CAIM 1792, se sembró por estría en TSA ajustado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ y se incubaron a 30 °C por 24 h. Las

colonias crecidas se recogieron y se suspendieron en buffer fosfato de sodio (BFS) 0.002 M pH 6.8, se lavaron dos veces por centrifugación a 8, 500 rpm, 10 min a temperatura ambiente. Se ajustó la absorbancia a 1.00, con un espectrofotómetro Hach modelo DR/2010 a una longitud de onda de 420 nm(Lee y Yii, 1996).

A partir de esta suspensión bacteriana, se mezclaron alícuotas de 0.5 ml con un volumen igual de sulfato de amonio a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 M en tubos de ensayo de vidrio estériles por triplicado. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 h en reposo. Se observó a contra luz la agregación de células bacterianas en cada tubo.

La lectura se comparó con un control negativo, que consistió en la suspensión bacteriana mezclada con BFS 0.002 M. La reacción se consideró como positiva cuando se observó la formación de un agregado blanco en el fondo del tubo y la solución se presentó clara, mientras que como una reacción negativa se consideró cuando no se presentaron agregados visibles. El valor de PAS, se define como la molaridad más baja de sulfato de amonio que causa una agregación visible de la cepa prueba.

#### 6.4.2.- Prueba de adhesión bacteriana a hidrocarburos (PABH)

La prueba de PABH fue calculada por el método de Rosenberg *et al.* (1980). La cepa CAIM 1792 se sembró por estría en placas de TSA ajustada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰, se incubó a 30 °C durante 24 h. Se recogieron las colonias, se preparó una suspensión bacteriana en BFS 0.002 M, ajustando la absorbancia a 0.16 en un espectrofotómetro Hach modelo DR/2010 a una longitud de onda de 600 nm. La prueba se realizó por triplicado, transfiriendo 1 ml de la suspensión en tubos de ensayo de vidrio de 10 ml estériles, se

agregaron 3.335 ml de n-octano (Sigma ®). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 1 min y se mantuvieron luego en reposo durante 15 min para permitir la separación de las fases. Finalmente se registró la absorbancia de la fase acuosa a 600 nm y se calculó el porcentaje de partición en la fase de hidrocarburos para cada tratamiento aplicando la siguiente fórmula (Rosenberg *et al.*, 1980):

$$\text{PABH (\%)} = \frac{\text{A600 suspensión bacteriana original} - \text{A600 fase acuosa}}{\text{A600 suspensión bacteriana original}} \times 100$$

Donde A600 es la absorbancia a una longitud de onda de 600nm.

El criterio de hidrofobicidad propuesto por Santos *et al.* (1990) fue usado para evaluar la hidrofobicidad de la cepa CAIM 1792 con sus respectivos tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Criterios de hidrofobicidad celular propuestos por Santos *et al.* 1990.

Prueba	Valores	Hidrofobicidad	
PAS	0.0 - 1.0 M	Fuerte	Positivo
	1.0 - 2.0 M	Moderada	Positivo
	2.0 - 4.0 M	Débil	
	>4.0 M	No hidrofóbica	
PABH	> 50 %	Fuerte	Positivo
	20 – 50 %	Moderada	Positivo
	< 20 %	No hidrofóbica	

#### 6.4.3- Formación de biopelículas

La prueba de formación de biopelículas se realizó de acuerdo al protocolo de Won y Park (2008). Tubos conteniendo 5 ml de TSB (Bioxon ®) a salinidad ajustada de 10, 20 y 40 ‰ fueron inoculados con una suspensión bacteriana crecida durante una noche de la cepa CAIM 1792, con tres réplicas por tratamiento. Como control negativo se tomó un tubo con 5 ml de TSB

(Bioxon ®) sin inocular, se incubaron 48 h a 30 °C con agitación constante a 900 rpm. Los tubos se enjuagaron con agua destilada y se agregaron cinco gotas de solución cristal violeta para teñir las células adheridas. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, los tubos nuevamente se enjuagaron con agua destilada, se les agregó 3 ml de etanol 96°.

La biomasa de células adheridas (formación de la biopelícula) fue cuantificada por solubilización del colorante en alcohol. Para esto se midió la absorbancia en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR/2010 a una longitud de onda de 610 nm, tomando como blanco el control negativo (Won y Park, 2008).

#### 6.4.4.- Detección de sideróforos

Se aplicó el método de cromo azurol S (CAS) descrito originalmente por Schwyn y Neilands (1987) y modificado por Soto-Rodríguez *et al.* (2003). Para estimar la producción de sideróforos de la cepa CAIM 1792 cultivada a salinidades de 10, 20, y 40 ‰ se comparó con la cepa 775 Sid<sup>+</sup> (productora de sideróforos) de *Listonella anguillarum* como control (Soto-Rodríguez 2002). Los tratamientos (seis réplicas) fueron inoculados en forma de círculo en agar MM9 previamente preparado de acuerdo al protocolo descrito en el anexo 1. Se incubaron por 72 h a 30 °C. A las 48 y 72 h se observó la formación de un halo alrededor de las colonias. Una producción de sideróforos positiva (Sid<sup>+</sup>) se consideró cuando se observó la presencia del halo color naranja alrededor de las colonias.

#### 6.4.5.- Producción de proteasas

Se elaboraron placas de agar TSA (Dibico ®) ajustadas a 10, 20 y 40 ‰ como medio basal, se les adicionó 2.5 % de leche desnatada (Dibico ®), para evaluar la actividad de las proteasas en los PECs y las células bacterianas de la cepa CAIM 1792.

La cepa se inoculó en las placas de agar previamente preparadas, se incubaron toda la noche a 30 °C. Una azada de este cultivo o 20 µl de los PECs se inocularon en forma de círculo sobre las placas de TSA con leche desnatada previamente preparadas, con seis réplicas por tratamiento. Las placas se incubaron por 48 h a 30 °C y a las 24 y 48 h se midió el halo lítico alrededor de los inóculos (Soto-Rodríguez 2002).

#### 6.4.6.- Producción de gelatinasas

Se elaboraron placas de agar TSA (Dibico ®) ajustadas a 10, 20 y 40 ‰ como medio basal, a las cuales se les adicionó 1 % de gelatina bacteriológica (Dibico ®) para evaluar la actividad de las gelatinasas en los PECs y las células bacterianas de la cepa CAIM 1792.

La cepa se inoculó en estas placas de agar, se incubaron toda la noche a 30 °C. Una azada de este cultivo o 20 µl de los PECs se inocularon en forma de círculo sobre las placas de TSA con gelatina bacteriológica con seis réplicas por tratamiento. Las placas se incubaron por 48 h a 30 °C. A las 24 y 48 h se midió el halo lítico alrededor de los inóculos previa incubación en refrigeración durante 15 min (Soto-Rodríguez 2002).

#### 6.4.7.- Producción de ureasas

Se prepararon tubos con 5 ml de caldo de urea de acuerdo al protocolo el fabricante (Dibico ®) ajustado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ para evaluar la producción de ureasas de la cepa CAIM 1792 con cinco réplicas por tratamiento. La cepa se inoculó en agar TSA (Dibico ®) ajustado a 10, 20 y 40 ‰, se incubó toda la noche a 30 °C. Una azada de este cultivo se inoculó en los tubos con caldo de urea previamente preparados. Los tubos se incubaron a 30 °C por 24 h, donde se observó el cambio de color del medio inoculado comparándolo con un medio sin inocular (control negativo).

#### 6.5.- Desafíos experimentales

##### 6.5.1.- Organismos de prueba

Para este estudio se usaron juveniles de camarones *L. vannamei* provenientes de un laboratorio de producción comercial de larvas de la región. Estos fueron transportados en agua de mar con suficiente aireación al laboratorio de Bacteriología CIAD unidad Mazatlán, donde se aclimataron bajo condiciones de laboratorio para su posterior uso en los desafíos experimentales.

##### 6.5.2.- Cepa e inóculo bacteriano

La cepa experimental fue reactivada como se mencionó anteriormente. A partir de la suspensión bacteriana en la que se reactivó, se prepararon los inóculos sembrando 100 µl de esta en tubos con 5 ml de TSB ajustado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ que se incubaron 24 h a 30 °C. Se preparó una suspensión bacteriana que consistió en lavar por centrifugación (8, 500 rpm, 10

min, temperatura ambiente) las células bacterianas con solución salina estéril (SSE, 2.5 % NaCl) y de nuevo resuspenderlas en SSE. La suspensión bacteriana se ajustó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 1.00 a una longitud de onda 610 nm, lo que equivale a una densidad aproximada de  $10^8$  UFC/ml (Soto-Rodriguez *et al.*, 2003). De esta suspensión se realizaron diluciones seriales en SSE para alcanzar densidades de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml que se utilizaron posteriormente como inóculos en los desafíos experimentales.

### 6.5.3.- Infecciones experimentales con la bacteria

Se llevaron a cabo dos desafíos experimentales en juveniles de camarón *L. vannamei* con la cepa CAIM 1792; el primero con la bacteria cultivada en medio TSA (Dibico ®) con la salinidad estándar para bacterias marinas (25 ‰), con el fin de probar 2 inóculos ( $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC/ml) para conocer una dosis subletal y evaluar la mortalidad. Se realizó un segundo ensayo con la cepa cultivada en medio TSA (Dibico ®) ajustado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ a una densidad del inóculo de  $2 \times 10^5$  UFC/ml.

Los dos desafíos experimentales con las células bacterianas se realizaron en acuarios de 54 l con 10 organismos por acuario, el primero con camarones de  $14.92 \pm 0.82$  g y el segundo con organismos de  $6.12 \pm 0.77$  g usando tres réplicas por tratamiento. Cada camarón se pesó, desinfectó e inyectó en el tercer somite abdominal, con 100 µl de la suspensión bacteriana previamente preparada. El grupo control consistió en inyectar a los camarones con 100 µl de SSE manteniendo las mismas condiciones experimentales que los organismos infectados. Los camarones inyectados fueron colocados aleatoriamente en el sistema de acuarios. El agua de los acuarios se filtró a 5 micras y se mantuvo un volumen de recambio diario de 400 %. La alimentación de los organismos se realizó dos veces al día *ad libitum* con un alimento comercial para camarón con 35 % de proteína (Purina ®). Durante los

bioensayos se midió temperatura, salinidad, nitritos y amonio del agua del sistema.

En el transcurso de los ensayos donde se inyectaron las células bacterianas, muestras de hemolinfa de los camarones moribundos fueron tomadas para reaislar la cepa CAIM 1792; donde 100 µl de hemolinfa fueron sembradas en placas de agar TCBS (Bioxon ®) que se incubaron a 30 °C durante 24 h. Dos colonias por placa, seleccionadas al azar, fueron resembradas en agar TSA + 2.0 % de NaCl (Bioxon ®), se incubaron a 30 °C por 24 h. El ADN genómico se extrajo por medio del kit purificación de ADN genómico (Wizard ®) siguiendo el protocolo del fabricante. La identificación de los aislados bacterianos se realizó por rep-PCR (Cabanillas-Beltran *et al.*, 2006), comparando los aislados con un control positivo, que consistió en extraer el ADN genómico de la cepa CAIM 1792 cultivada directamente de los criopreservadores en agar TSA + 2.0 % de NaCl (Bioxon ®).

#### 6.5.4.- Desafío experimental con los PECs

Se llevó a cabo un desafío experimental en juveniles de  $4.6 \pm 0.76$  g de camarón *L. vannamei* con los PECs obtenidos de la cepa CAIM 1792 cultivada en medios a salinidades de 10, 20 y 40 ‰. El desafío experimental se realizó en el mismo sistema de acuarios mencionado anteriormente con la misma densidad de siembra con tres replicas por tratamiento. Se inyectaron 100 µl de la suspensión de los PECs en el tercer segmento abdominal previa desinfección del área. Para el ensayo se corrió un grupo control el cual consistió en inyectar a los camarones con 100 µl de buffer fosfato salino y se mantuvieron las condiciones experimentales como en los organismos con los diferentes tratamientos.



Los camarones inyectados fueron colocados aleatoriamente en el sistema de acuarios. El agua de los acuarios se filtró a 5 micras y se mantuvo un volumen de recambio diario de 400 %. La alimentación se realizó dos veces al día *ad libitum* con un alimento comercial para camarón con 35 % de proteína (Purina ®). Durante el bioensayo se midió temperatura, salinidad, nitritos y amonio del agua del sistema.

#### 6.5.5.- Infección en camarones a diferente salinidad

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar la susceptibilidad que el estrés por cambios de salinidad genera en el camarón juvenil *L. vannamei*.

En el desafío experimental se usó la cepa CAIM 1792 cultivada en medio TSA (Dibico ®) con la salinidad estándar para bacterias marinas (25 ‰), a una densidad del inóculo de  $2 \times 10^5$  UFC/ml. El ensayo se realizó en acuarios de 54 l con 10 organismos por acuario con pesos de  $7.3 \pm 1.10$  g con tres réplicas por tratamiento. Se aclimataron los organismos logrando las salinidades del agua de cultivo (10, 20 y 40 ‰) en un periodo de 8 h. Cada camarón se pesó, desinfectó e inyectó en el tercer somite abdominal. Se inyectaron 100 µl de la suspensión bacteriana previamente preparada. El grupo control consistió en inyectar a los camarones con 100 µl de SSE manteniéndolos a 34 ‰.

Los camarones inyectados fueron colocados aleatoriamente en el sistema de acuarios. El agua de los acuarios se filtró a 5 micras, se ajustó la salinidad a 10, 20 y 40 ‰ y se mantuvo un volumen de recambio diario del 100 %. La alimentación de los organismos se realizó dos veces al día *ad libitum* con un alimento comercial para camarón con 35 % de proteína (Purina ®). Durante el bioensayo se midió temperatura, nitritos y amonio del agua del sistema.

## 6.6.- Histología

A partir de cada bioensayo se fijaron los camarones moribundos con solución Davidson (Bell y Lightner, 1988). Esto consistió en inyectar a los organismos con 10 ml aproximadamente del fijador empezando por la parte del cefalotórax y músculo. Se realizó un corte longitudinal para asegurar la impregnación del fijador en el organismo y se sumergió en el fijador (Bell y Lightner, 1988). Después de 24-48 h se sumergieron en etanol al 70 % para su preservación. Una vez fijadas las muestras, estas se deshidrataron e impregnaron en parafina de acuerdo a la metodología de rutina de Bell y Lightner (1988) para los camarones peneidos (Anexo 2). Una vez incluida la parafina en los tejidos se elaboraron los bloques de parafina empleando el embebedor (Leica ® modelo histoembedder) para después realizar los cortes histológicos por medio de un micrótopo manual marca Leica modelo JM2125RT.

El grosor de las laminas obtenidas fue de 5 micras, que fueron teñidas con hematoxilina & eosina-floxina (H&E) (Anexo 3). Las láminas histológicas fueron examinadas en un microscopio óptico (Olympus Optical Co. LTD. modelo CX31RBSF) donde se observaron a nivel tisular los cambios causados por la bacteria y los PECs para cada ensayo realizado.

## 6.7.- Análisis estadístico

Se calcularon los valores promedio y desviación estándar de cada ensayo realizado. Se realizó la estadística descriptiva en cada caso, se compararon los datos mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía (ONE-WAY) y se aplicaron pruebas *a posteriori* de comparación (Tukey y Dunnett's) con respecto a un control. La estadística se realizó por medio del software SigmaPlot 11.0.

## 7.- RESULTADOS

### 7.1.- Viabilidad bacteriana

En la Figura 1A se puede observar que no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los tratamientos ( $1 \times 10^6$  UFC/ml) donde la bacteria se cultivó desde las 10 ‰ hasta las 60 ‰. El tratamiento que significativamente ( $p < 0.05$ ) presentó mayor densidad bacteriana fue el de 70 ‰ en el primer ensayo, con un orden de magnitud de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Las densidades bacterianas significativamente más bajas, se encontraron en los tratamientos donde se cultivó la bacteria a salinidades de 80, 90 y 100 ‰, en el tratamiento de 0 ‰ no se encontró crecimiento bacteriano.

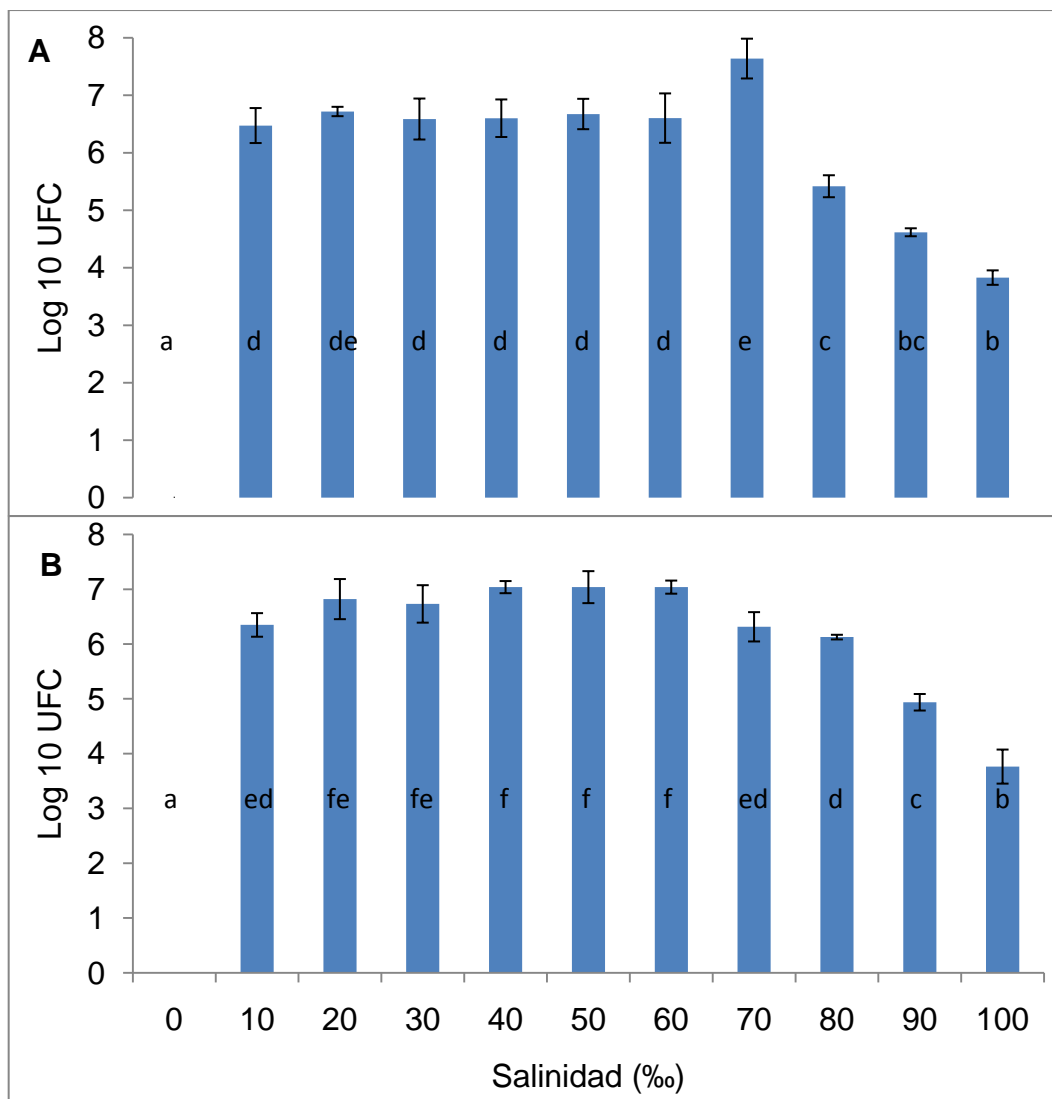


Figura 1.- Prueba de viabilidad (conteo total viable) de la cepa CAIM 1792 cultivada en caldo peptonado. A.- Tres réplicas por tratamiento. B.- Cinco réplicas por tratamiento. Columnas con letras diferentes representan diferencias significativas.

En la Figura 1B se puede observar que, al igual que en el ensayo anterior, los tratamientos que significativamente presentaron una mayor densidad bacteriana fueron los tratamientos donde se cultivó la bacteria a salinidades desde 10 hasta 60, en este caso incluyendo el tratamiento de 70 ‰ no encontrándose diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ). De la misma forma que en el primer ensayo se comportaron los tratamientos de 0, 80, 90 y 100 ‰, no encontrándose crecimiento bacteriano en el tratamiento de 0 ‰ y los

otros tres presentaron la misma tendencia con una densidad decreciente del tratamiento 80 > 90 > 100 ‰.

## 7.2.- Crecimiento de *V. harveyi*

Se encontró que la cepa presenta su mejor crecimiento en las salinidades de 30, 40 y 50 ‰, seguida por un crecimiento medio en las salinidades de 5, 10, 20 60, 70 y 80 ‰, por último el resto de las salinidades 0, 90 y 100 ‰ presentó un crecimiento menor (Figura 2A).

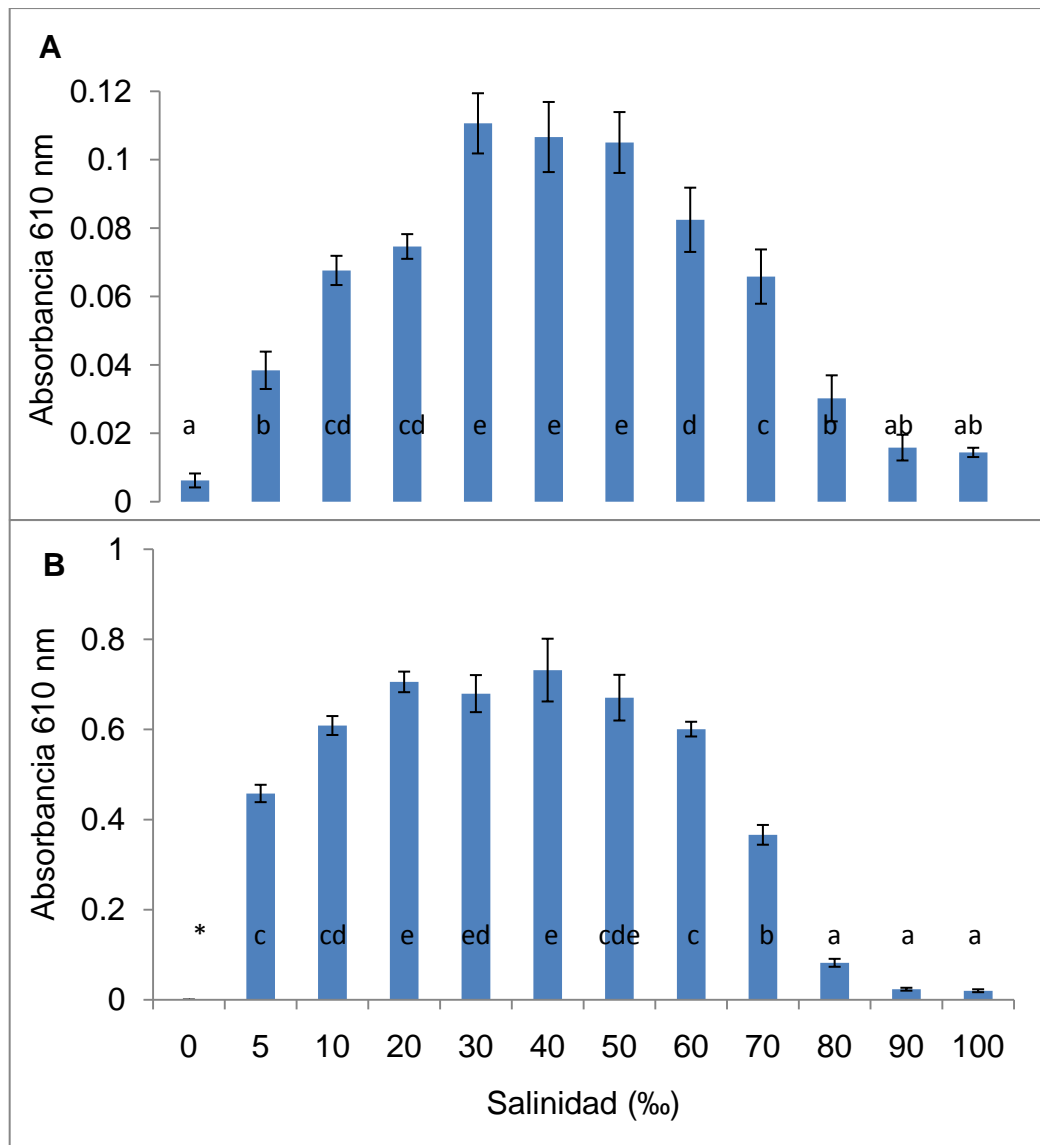


Figura 2.- Prueba de crecimiento. A.- Cepa cultivada en caldo peptonado. B.- Cepa cultivada en caldo TSB. \* Dato no disponible. Columnas con letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Se realizó otro ensayo para observar el crecimiento bacteriano, en éste se cambió el medio de cultivo a TSB ya que contiene más nutrientes por lo que la bacteria creció mejor. Se encontró que los tratamientos que presentaron densidad bacteriana mayor fueron 10, 20, 30, 40, 50 y 60 %, encontrándose traslapados los tratamientos 10 y 60 % con 5 y 70 %. Al igual que en los otros ensayos, los tratamientos que significativamente se encontraron con menor densidad bacteriana fueron 80, 90 y 100 % (Figura 2B).

### 7.3.- Productos extracelulares

Al medir la concentración de proteína total de los tratamientos por triplicado con la bacteria cultivada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ se obtuvieron concentraciones promedio de  $63.52 \pm 2.6$ ,  $60.88 \pm 8.3$  y  $59.87 \pm 3.1$   $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. No se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la concentración total de proteínas de los tres tratamientos.

### 7.4.- Hidrofobicidad de la superficie celular de la cepa CAIM 1792 (PAS y PABH)

La cepa CAIM 1792 cultivada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ presentó con la prueba de PAS en sus tratamientos como no hidrofóbicos. En contraste, en el ensayo de PABH los tres tratamientos fueron fuertemente hidrofóbicos, presentando un porcentaje de partición mayor al 50 % con n-octano, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el porcentaje de partición de los tres tratamientos (Figura 3).

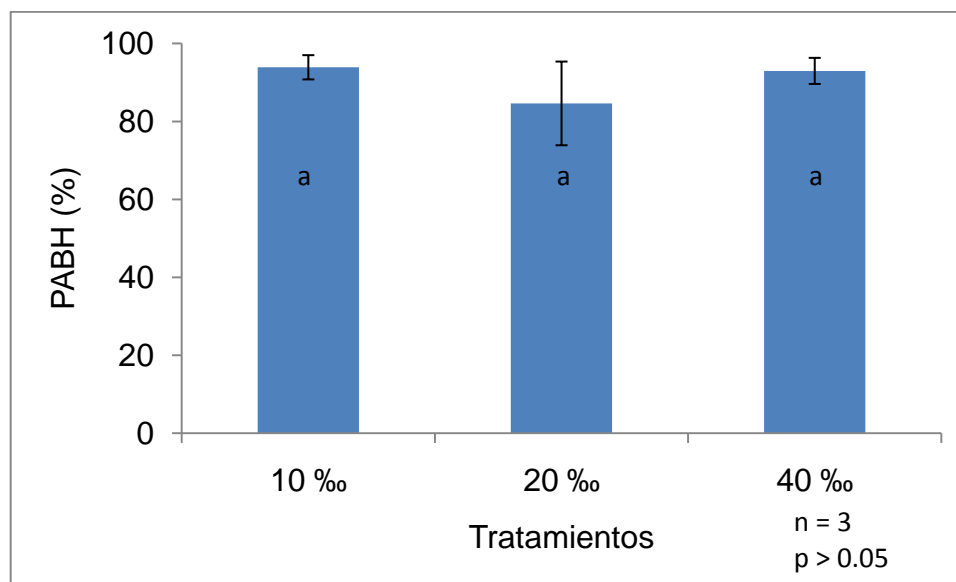


Figura 3.- Adhesión bacteriana (%) a hidrocarburos de la cepa CAIM 1792 cultivada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰.

### 7.5.- Formación de biopelículas

La cepa CAIM 1792 se encontró como positiva en la formación de biopelículas a las 48 h postinoculación en los tres tratamientos. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos (Figura 4).

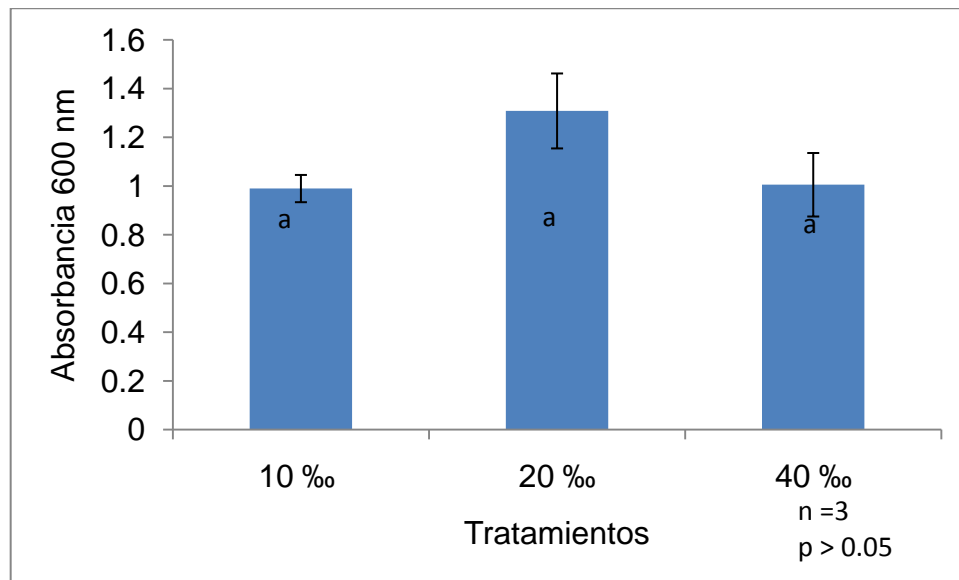


Figura 4.- Formación de biopelículas a las 48 h de la cepa CAIM 1792.

### 7.6.- Detección de sideróforos

Se estimó la producción de sideróforos de la cepa CAIM 1792 cultivada en medios con salinidades de 10, 20 y 40 ‰, como control positivo se tomó la cepa 775 de *Listonella anguillarum*. En los tres tratamientos se observó la presencia del halo por lo que la producción de sideróforos fue positiva en los tres tratamientos. En la Figura 5 se presentan tres colonias de la cepa CAIM 1792 cultivada a 10 ‰.





Figura 5.- Colonias de la cepa CAIM 1792 crecida en medio CAS a salinidad de 10 ‰ positiva a producción de sideróforos.

#### 7.7.- Producción de proteasas de la cepa CAIM 1792 y sus PECs

La producción de proteasas de las células bacterianas y los PECs en ambos se encontraron resultados similares, presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los diferentes tratamientos, encontrándose un gradiente de la salinidad menor a la mayor (10 > 20). El tratamiento 40 ‰ no presentó formación de halo.

Tabla 6.- Halos de inhibición (mm) de los ensayos de producción de proteasas. Letras diferentes en el mismo renglón significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

	Tratamientos		
	10 ‰	20 ‰	40 ‰
Células bacterianas	1.7 ± 0.1c	1.5 ± 0.1b	0a
PECs	16 ± 2.5c	8.5 ± 1.1b	0a

## 7.8.- Producción de gelatinasas y ureasas

Se estimó la producción de gelatinasas y ureasas de la cepa CAIM 1792 y sus PECs cultivada en medios con salinidades de 10, 20 y 40 ‰. Ningún tratamiento fue positivo para la producción de gelatinasas y ureasas de la cepa CAIM 1792 y sus PECs.

## 7.9.- Infecciones experimentales con *V. harveyi* cepa CAIM 1792

Todos los camarones inyectados con las células bacterianas de la cepa presentaron los primeros signos a partir de las 6 h postinyección (pi). Los camarones se observaron en el fondo del acuario de lado, disminuyó la capacidad de escape, nado errático, disminución en el consumo de alimento, cambios de coloración y lesión intramuscular. En el tratamiento con la dosis de  $2 \times 10^3$  UFC/g, a los cinco días pi se observó melanización multifocal en la cutícula de los camarones infectados. En los camarones inyectados con los PECs se observaron camarones con signos similares a la infección con células bacterianas, a diferencia del anterior en este ensayo, se observó opacidad del músculo abdominal en el sitio de inyección (Figura 6).

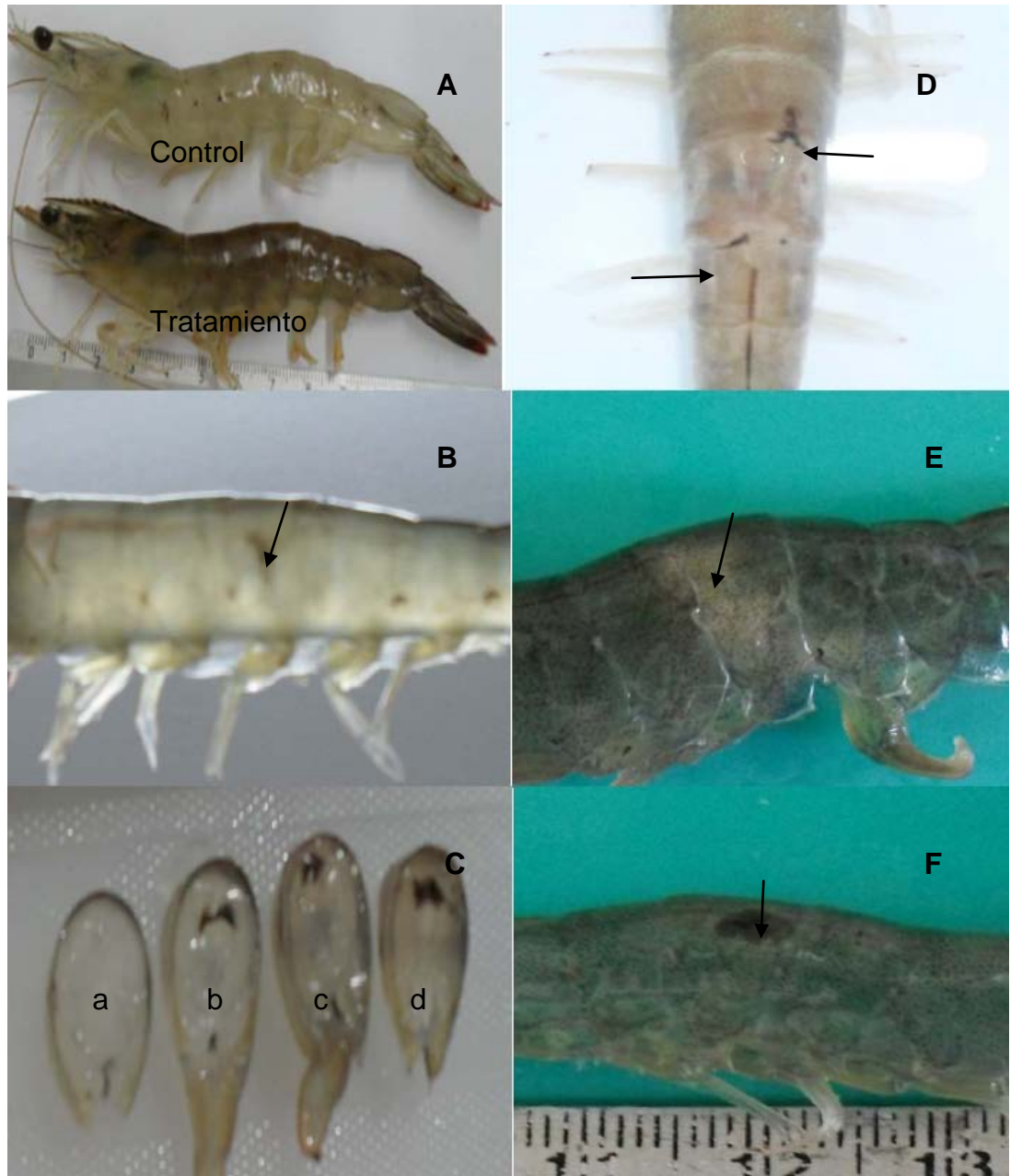


Figura 6.- Signos gruesos observados en los camarones inyectados. A.- Se observa el cambio de coloración por expansión de los cromatóforos de los camarones inyectados. B.- Indicado con la flecha melanización intramuscular de los camarones infectados. C.- Corte transversal de camarones con melanización intramuscular (a: control, b, c y d: infectados). D.- Indicado con la flecha la melanina en la cutícula de camarón infectado. E.- Indicado con la flecha la opacidad producida por la inyección de los PECs. F.- Indicado con la flecha la cutícula melanizada por la inyección de los PECs.

La mortalidad causada por la bacteria *V. harveyi* en juveniles de *L. vannamei*, presentó mortalidades del 80 % a dosis de  $2 \times 10^3$  UFC/g de camarón, a las 24 h pi, iniciando la mortalidad a las 7:30 h pi. Por otro lado, la dosis más baja ( $2 \times 10^2$  UFC/g de camarón) presentó solo el 7.5 % a las 48 h pi, iniciando la mortalidad a las 31 h pi. Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) presentando las mayores mortalidades la dosis de  $2 \times 10^3$  UFC/g a partir de las 18 h pi. A las 96 h pi la dosis más alta presentó su mayor mortalidad alcanzando el 92.5 %, la dosis más baja presentó su mayor mortalidad hasta las 120 h pi alcanzando un porcentaje del 15 % (Figura 7).

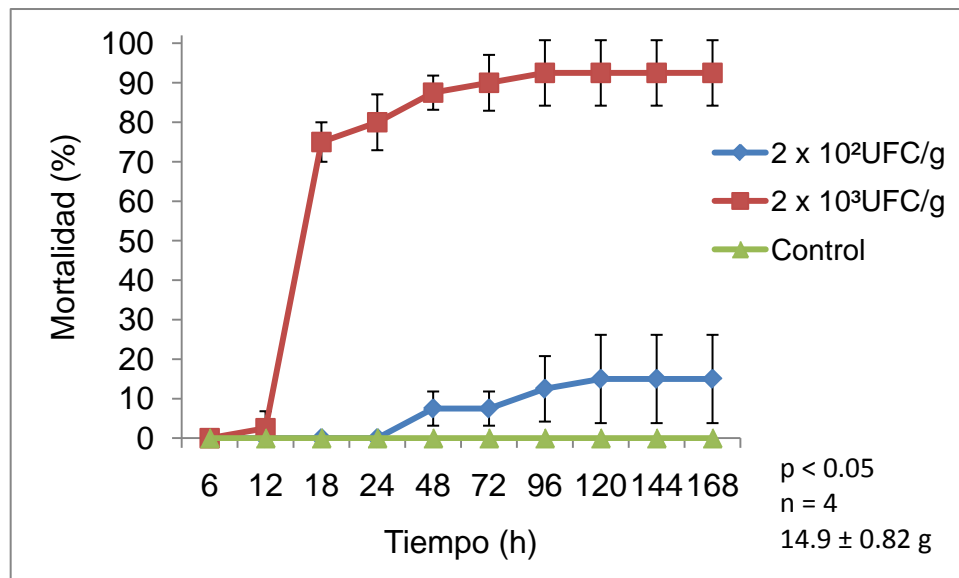


Figura 7.- Promedio y desviación estándar de la mortalidad acumulada de *L. vannamei* desafiado con *V. harveyi*, dosis de  $2 \times 10^2$  UFC/g y  $2 \times 10^3$  UFC/g.

En el bioensayo para probar el efecto de diferentes salinidades, se observó gráficamente que los tratamientos con la salinidad más baja (10 ‰) y la más alta (40 ‰) presentaron la mayor mortalidad al final del experimento, mostrándose la mayor mortalidad en el tratamiento donde la bacteria fue crecida en 10 ‰ seguida por el tratamiento de 40 ‰ y por último el tratamiento de 20 ‰. Sin embargo, en las primeras 12 h pi el tratamiento de 40 ‰ presentó mortalidades mayores, estadísticamente no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos, los tres tratamientos presentaron

diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el grupo control donde no se presentó mortalidad (Figura 8).

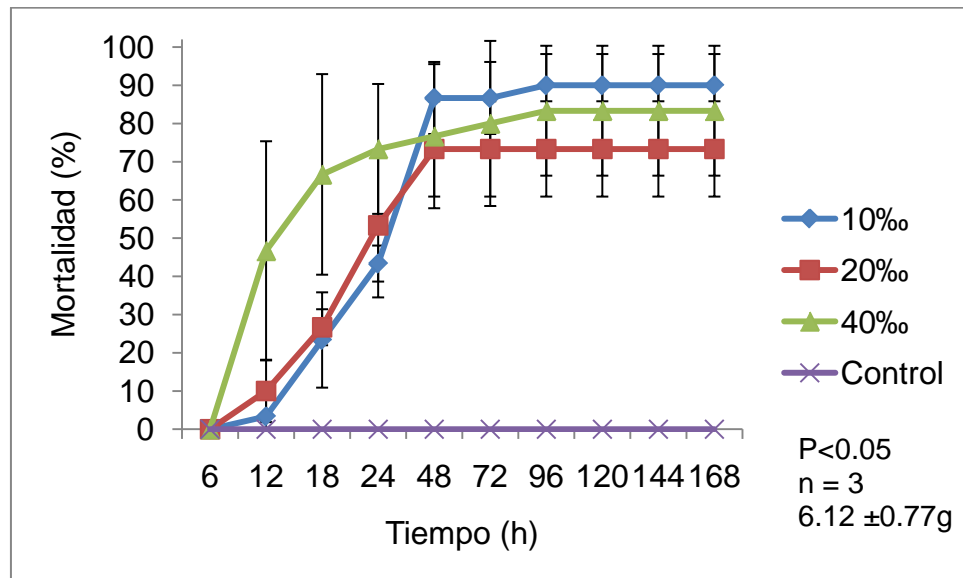


Figura 8.- Promedio y desviación estándar de la mortalidad acumulada de *L. vannamei* infectado con *V. harveyi* a dosis de  $2.8 \times 10^3$  UFC/g, crecida en medios con diferente salinidad.

A partir de los bioensayos en los cuales se inyectaron las células bacterianas, hemolinfa de los camarones moribundos fue sembrada en agar TCBS para reaislar la cepa CAIM 1792. De todos los aislados seleccionados al azar todos fueron identificados por rep-PCR como clones de la cepa CAIM 1792 al presentar el mismo patrón de bandas electroforéticas, en la Figura 9 se presenta un ejemplo de los aislados obtenidos.

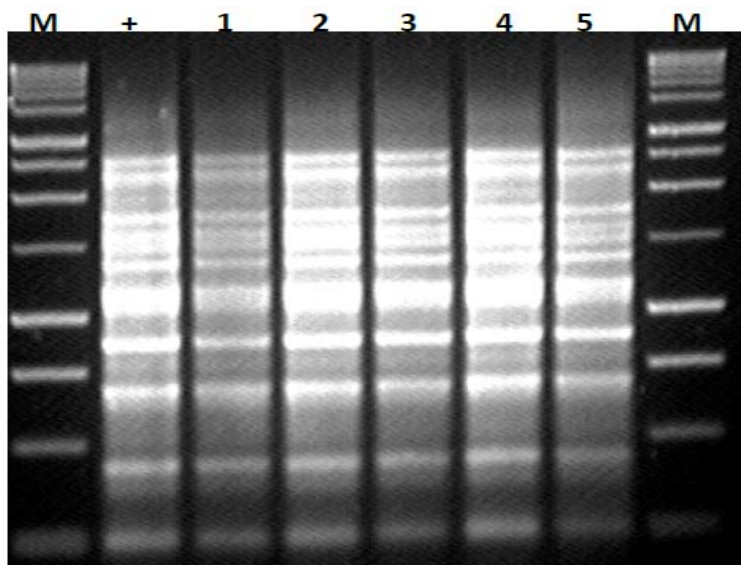


Figura 9.- Gel de electroforesis (2 %) de los aislados de hemolinfa de camarones moribundos inyectados con la cepa CAIM 1792. M = marcador, + = control positivo CAIM 1792, 1, 2, 3, 4, 5 = número de aislados bacterianos.

#### 7.10.- Mortalidad con los PECs de *V. harveyi*

La mortalidad causada por los PECs en el primer bioensayo a las 6 h pi se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), presentando la mayor mortalidad el tratamiento de 10 ‰. A las 18 h pi el tratamiento que significativamente mayor mortalidad causó fue el de 20 ‰, encontrándose el tratamiento de 40 ‰ intermedio, ya que se encontró traslapado con los tratamientos 20 y 10 ‰, siendo este último el que menor mortalidad presentó, a partir de las 48 h pi se presentaron las últimas mortalidades, encontrándose las mayores mortalidades en los tratamientos 20 y 40 ‰ con valores de 100 y 90 % respectivamente (Figura 10). Es importante mencionar que en este bioensayo los camarones al ser revisados por histología se encontraron evidencias de vibriosis por lo que se decidió comparar con un nuevo ensayo.

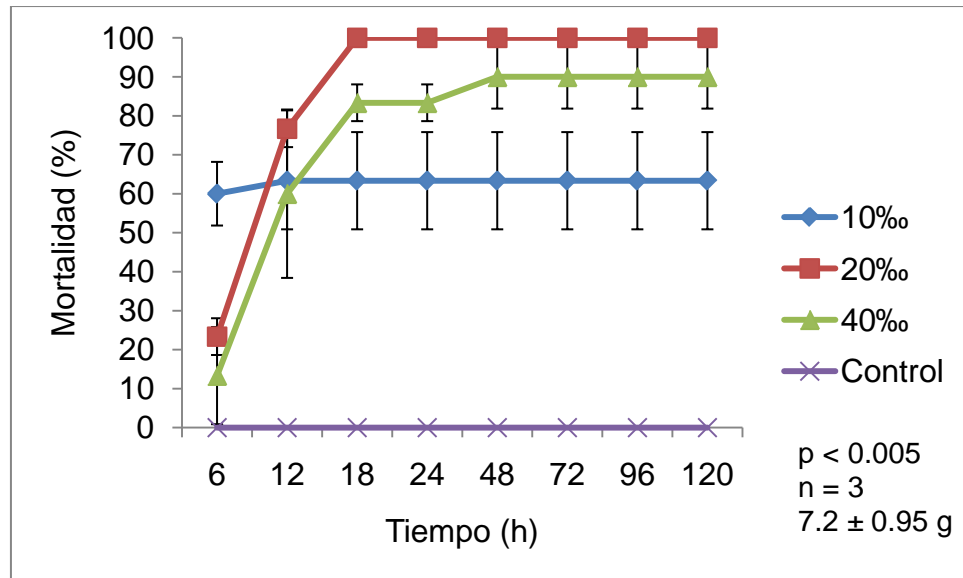


Figura 10.- Promedio y desviación estándar del porcentaje de mortalidad acumulada de *L. vannamei* inyectado con los PECs de *V. harveyi* crecida en medios con diferente salinidad. Primer ensayo.

En la Figura 11 se presentan los resultados del segundo bioensayo en el cual los camarones fueron inyectados y tratados con las mismas condiciones del primer bioensayo. En este bioensayo a las 6 h pi los tratamientos con mayor mortalidad fueron el de 10 y 40 ‰ ( $p < 0.05$ ), a partir de las 12 h pi los tratamientos que causaron las mayores mortalidades fueron 20 y 40 ‰, manteniéndose así durante el resto del bioensayo, ya que el tratamiento de 20 ‰ alcanzó el 100 % de las mortalidades a las 12 h pi, el tratamiento 40 ‰ alcanzó este mismo porcentaje a las 18 h pi, el tratamiento con menor mortalidad al final del bioensayo (10 ‰) alcanzó el 83.3 % de mortalidad, presentando las últimas mortalidades a las 24 h pi.

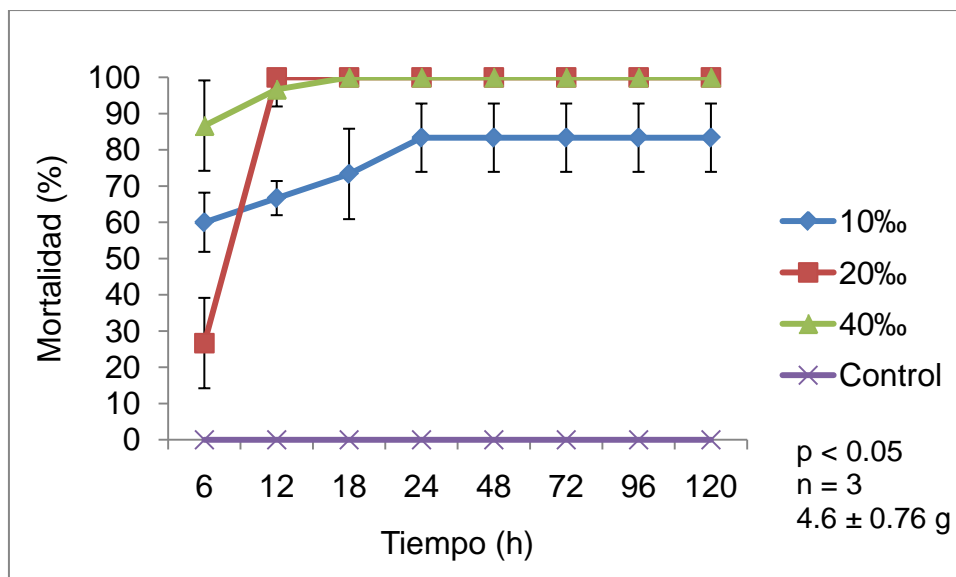


Figura 11.- Promedio y desviación estándar del porcentaje de mortalidad acumulada de *L. vannamei* inyectado con los PECs de *V. harveyi* crecida en medios con diferente salinidad. Segundo ensayo.

Se realizó otro bioensayo para evaluar la mortalidad de camarón mantenido a diferentes salinidades (10, 20 y 40 ‰) e infectado a una dosis de  $7.5 \times 10^3$  UFC/g con la cepa crecida a 25 ‰, las diferencias significativas se encontraron a las 12 h pi ( $p < 0.05$ ) siendo más altos los tratamientos de 10 y 40 ‰, a las 24 h pi el tratamiento con mayor mortalidad fue el de 40 ‰, manteniéndose así hasta el final del bioensayo, alcanzando un 93.3 % de mortalidad, presentando las últimas mortalidades a las 96 h pi. Los tratamientos 10 y 20 ‰ lograron mortalidades de 66.7 y 56.7 % respectivamente (Figura 12).



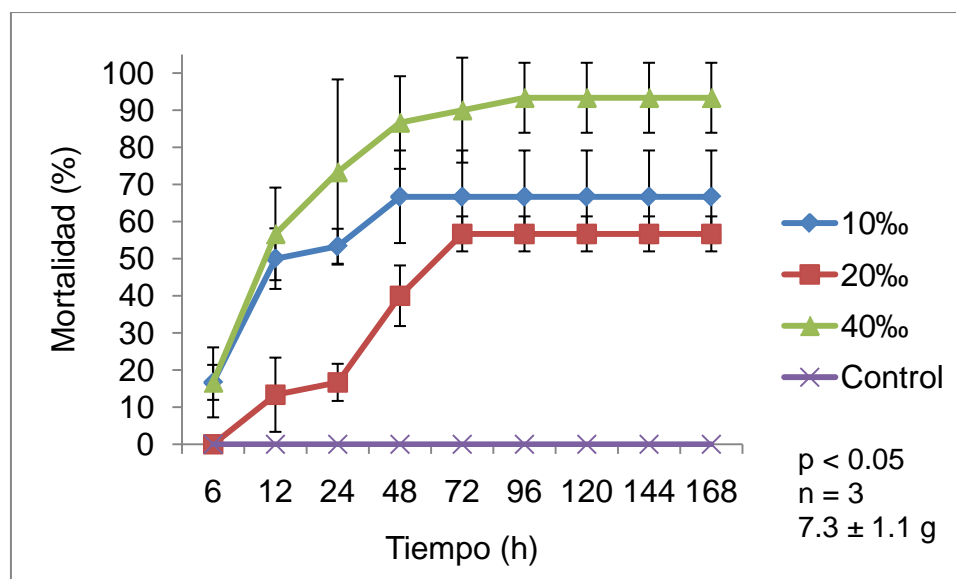


Figura 12.- Porcentaje de mortalidad acumulada de *L. vannamei* cultivado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ e inyectado con *V. harveyi* crecida a 25 ‰.

Durante todos los bioensayos se monitoreó la temperatura del agua, salinidad, amonio total y nitritos (Tabla 7).

Tabla 7.- Variables fisicoquímicas del agua durante los bioensayos. Valores promedio durante una semana de monitoreo.

Bioensayo	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Amonio (mg/l)	Nitrito (mg/l)
1	27	34	0	0
2	25.6 ± 0.4	34	0	0
3	25 ± 0.25	34	0	0
4	29 ± 0.25	34	0	0
5	29.5 ± 0.83	*	0	0

Bioensayo 1) prueba de dos inóculos; bioensayo 2) mortalidad de camarón inoculado con la cepa cultivada a 10, 20 y 40 ‰; bioensayo 3) mortalidad de camarón inyectado con los PECs (primer ensayo); bioensayo 4) mortalidad de camarón inyectado con los PECs (segundo ensayo); bioensayo 5) mortalidad de camarón mantenido a diferentes salinidades e infectado con la cepa cultivada a 25 ‰. \* Salinidad 10, 20 y 40 ‰ en los tratamientos y 34 ‰ en el grupo control.

### 7.11.- Análisis histopatológico

En los camarones inyectados con las células bacterianas se observó en el sitio de inyección a las 12 h pi la presencia de masas bacterianas dispersas en el tejido, infiltración hemocítica, formación de nódulos y necrosis del tejido, los mayores cambios se observaron en los tratamientos con la bacteria cultivada a 10 y 20 ‰ (Figura 13A).

A las 24 h pi los cambios encontrados histológicamente fueron masas bacterianas pero menos dispersas en el tejido encontrándose la mayoría concentrada por los hemocitos, se observó infiltración hemocítica, formación de nódulos, melanización y necrosis del tejido. Los mayores cambios fueron encontrados en los tratamientos 20 y 40 ‰ (Figura 13B).

Los cambios encontrados a las 48 h pi fueron infiltración hemocítica, pocos nódulos hemocíticos y la necrosis del tejido en el sitio de inyección, en esta etapa de la infección las diferencias entre los tratamientos no fueron observadas (Figura 13C).

Los organismos estaban en la etapa de recuperación a las 168 h pi, sin embargo, los cambios histológicos observados en el sitio de inyección fueron; infiltración hemocítica, pocos nódulos hemocíticos melanizados y necrosis del tejido (Figura 13D).

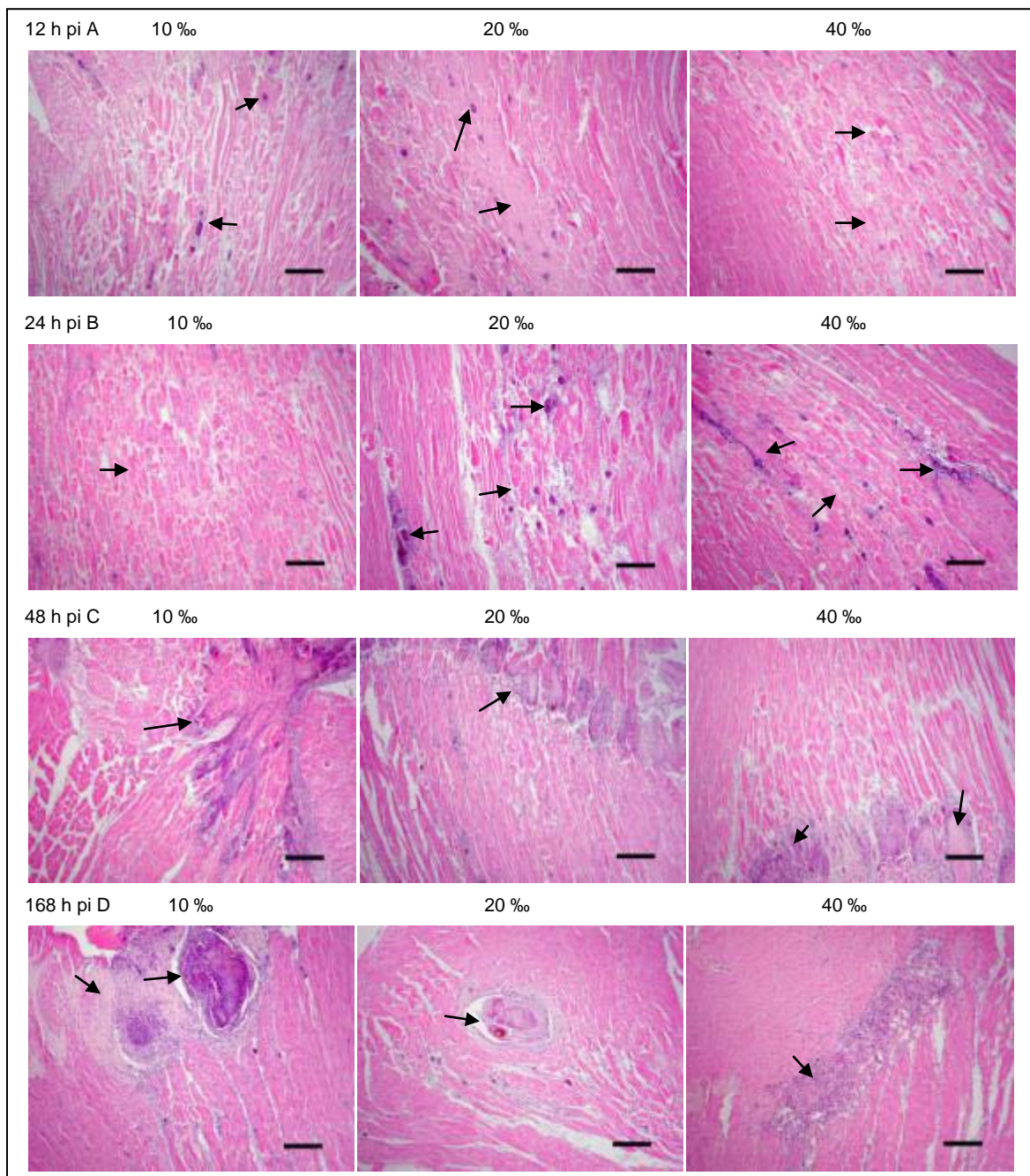


Figura 13.- Microfotografías del sitio de inyección de los camarones infectados con la cepa CAIM 1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰. Posinyección (pi), barra de 100 micras.

En el corazón de los camarones inyectados con las células bacterianas, los cambios histológicos encontrados a las 12 h pi fueron la presencia de bacterias en el tejido, poca infiltración hemocítica, sin diferencias observadas en sus tratamientos (Figura 14A). A las 24 h pi en el corazón se observó nódulos hemocíticos, melanización y necrosis del tejido, los mayores cambios fueron observados en el tratamiento de 20 ‰ (Figura 14B).

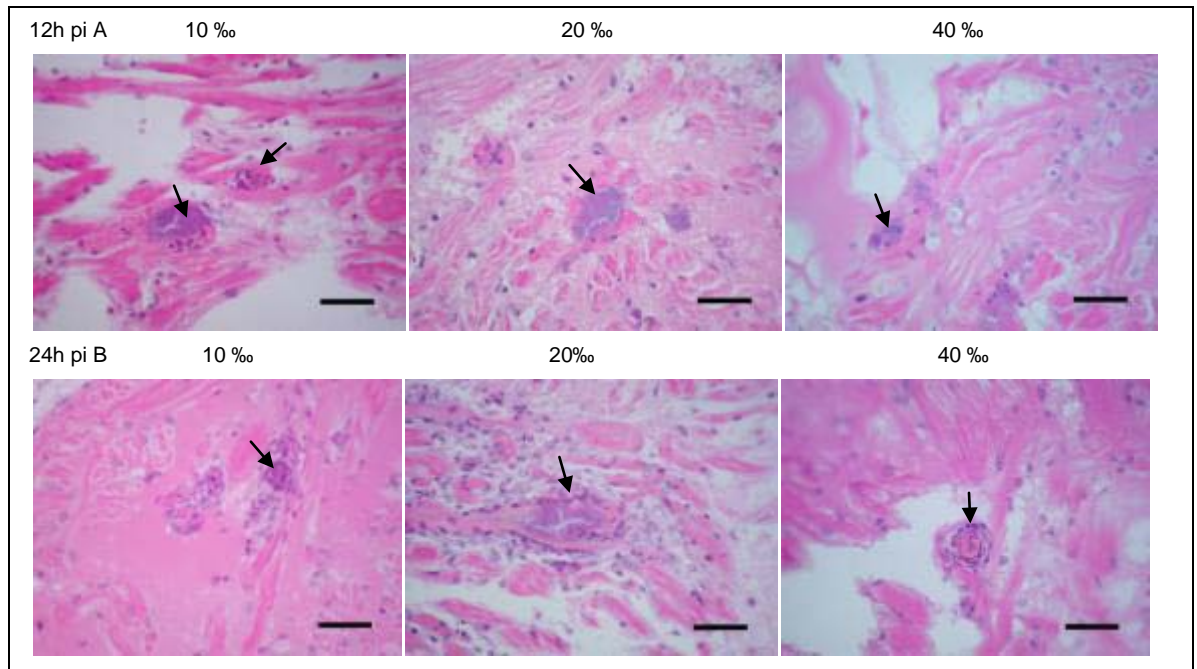


Figura 14.- Microfotografías del corazón de los camarones infectados con la cepa CAIM 1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰. A) masas bacterianas. B) Nódulos hemocíticos con melanización. Barra de 20 micras.

A partir de las 48 h pi en el corazón se observó la recuperación del tejido encontrándose el órgano aparentemente sano (Figura 15).

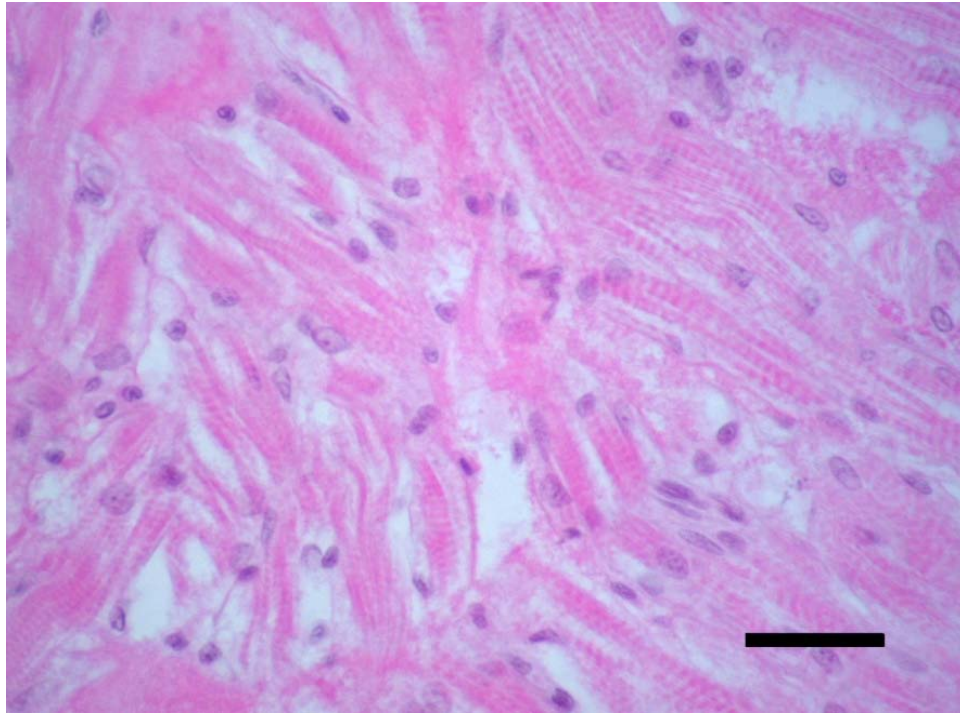


Figura 15.- Microfotografía del corazón aparentemente sin daños de los organismos inyectados con el tratamiento de 20 ‰ a las 168 h pi. Barra de 20 micras.

En el órgano linfoide los cambios observados a las 12 h pi fueron infiltración hemocítica, la presencia de masas bacterianas dispersas en el órgano y necrosis del tejido, sin diferencias observadas entre sus tratamientos (Figura 16A). A las 24 h pi en el órgano linfoide se observó la presencia de nódulos hemocíticos melanizados y necrosis del órgano, sin diferencias aparentes entre los tratamientos (Figura 16B).

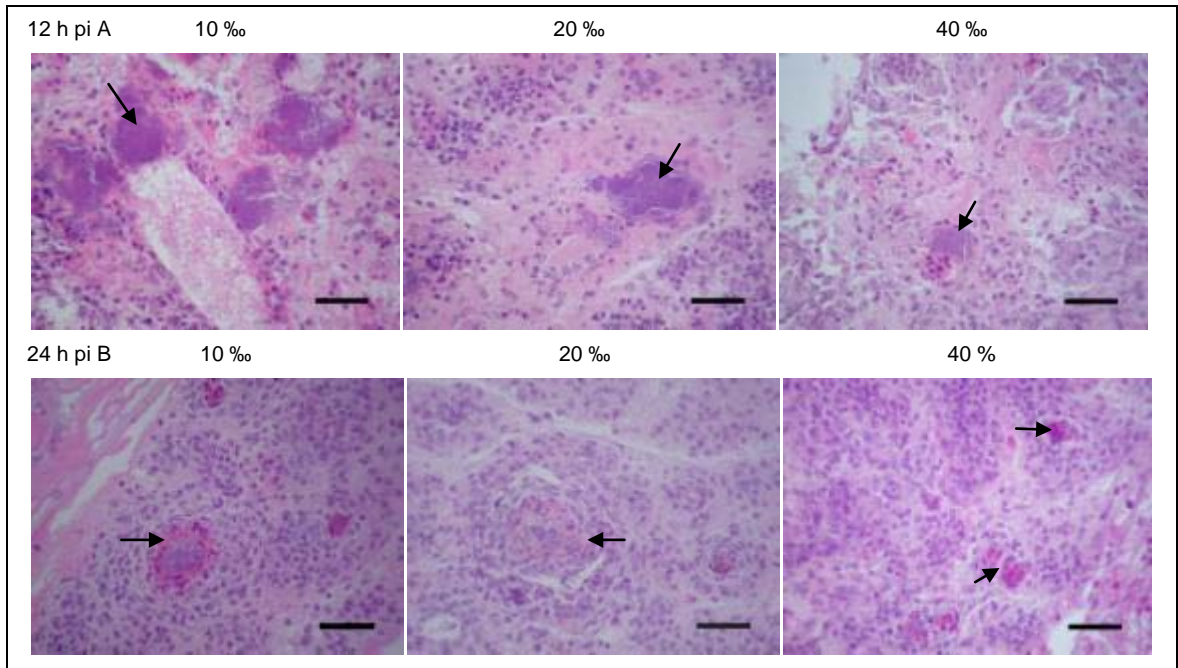


Figura 16.- Microfotografías del órgano linfoide de los camarones inyectados con la cepa crecida a 10, 20 y 40 ‰. A) Masas bacterianas. B) Nódulos hemocíticos melanizados. Barra de 20 micras.

A partir de las 48 h pi en el órgano linfoide, sólo se observó la presencia de pocos nódulos hemocíticos y la aparente recuperación del órgano, que al final del bioensayo (168 h pi) fue más evidente (Figura 17).

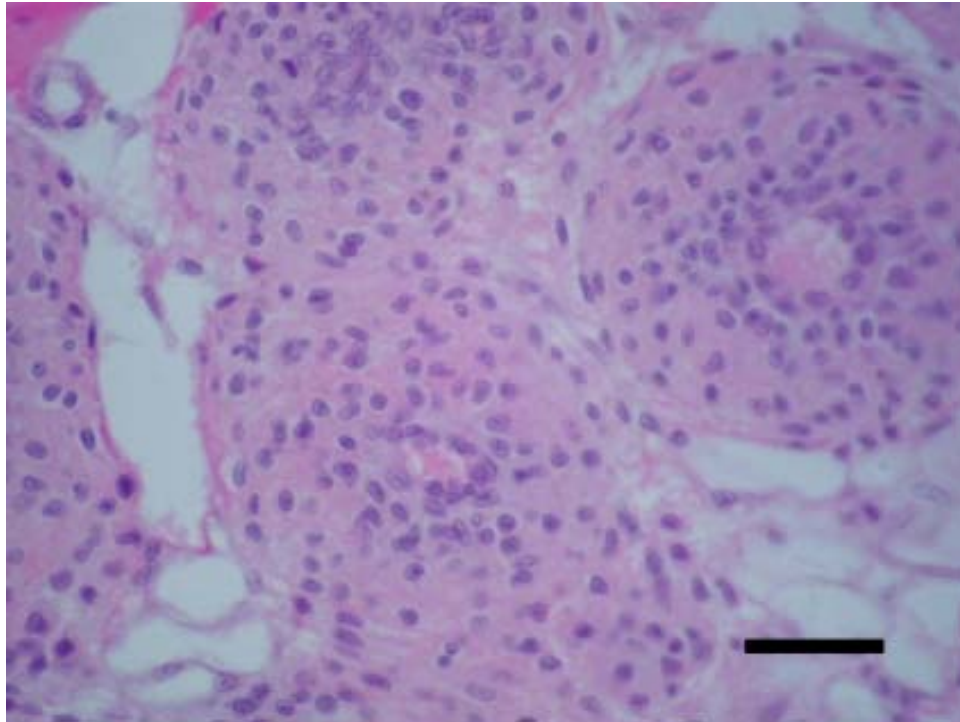


Figura 17.- Microfotografía del órgano linfoide de los camarones infectados con la cepa CAIM 1792 crecida a 40 ‰ a las 168 pi. Barra de 20 micras.

En los organismos inyectados con los PECs de la cepa CAIM 1792, los cambios encontrados en el sitio de inyección en los diferentes tratamientos y tiempos, durante el bioensayo que duró 120 h fueron; infiltración hemocítica y necrosis del tejido, sin diferencias entre los tratamientos (Figura 18).

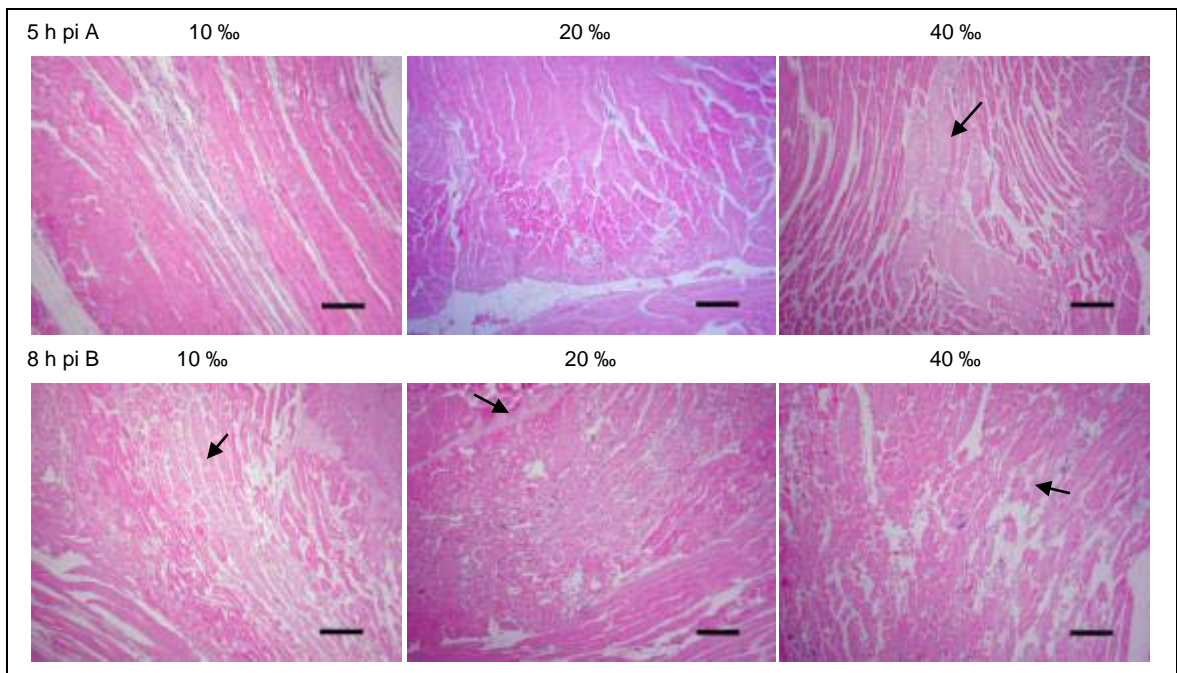


Figura 18.- Microfotografías del sitio de inyección de los camarones inyectados con los PECs de la cepa CAIM 1792 crecida en salinidades de 10, 20 y 40 ‰. A) Necrosis. B) Necrosis más dispersa. Barra de 100 micras.

El corazón de los camarones inyectados con los PECs, se observó sin daños aparentes durante el bioensayo (Figura 19).



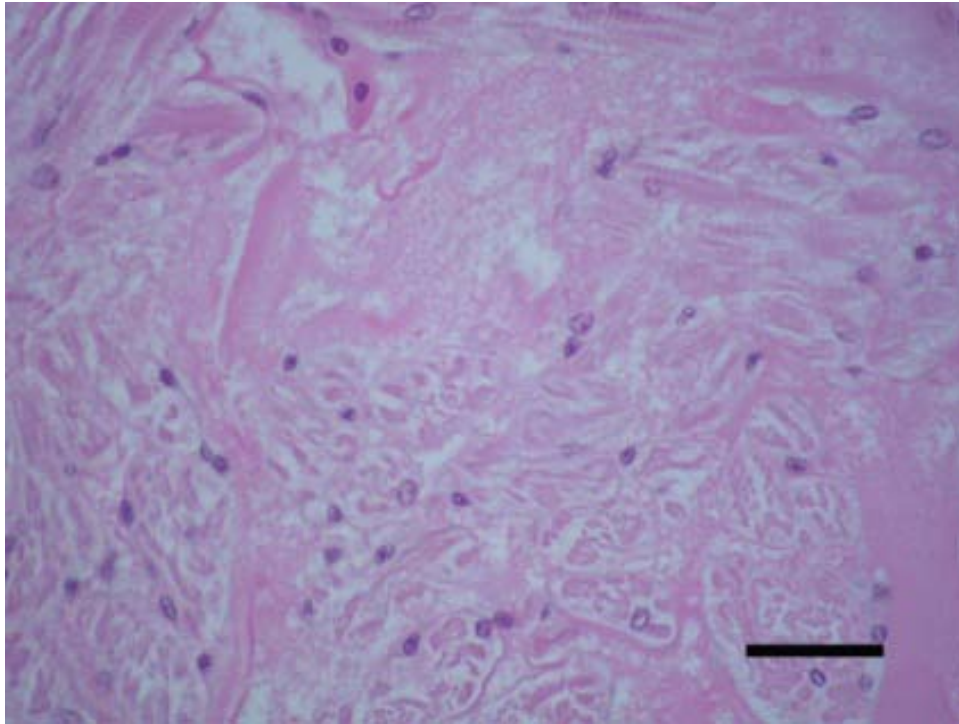


Figura 19.- Microfotografía del corazón de los camarones inyectados con los PECs de la cepa CAIM 1792 cultivada a 20‰ a las 5 h pi. Barra de 20 micras.

En el órgano linfoide de los organismos inyectados con los PECs, los cambios encontrados en los diferentes tratamientos y tiempos fue necrosis del tejido, que se observó desde las 5 h pi hasta las 120 h pi (Figura 20).

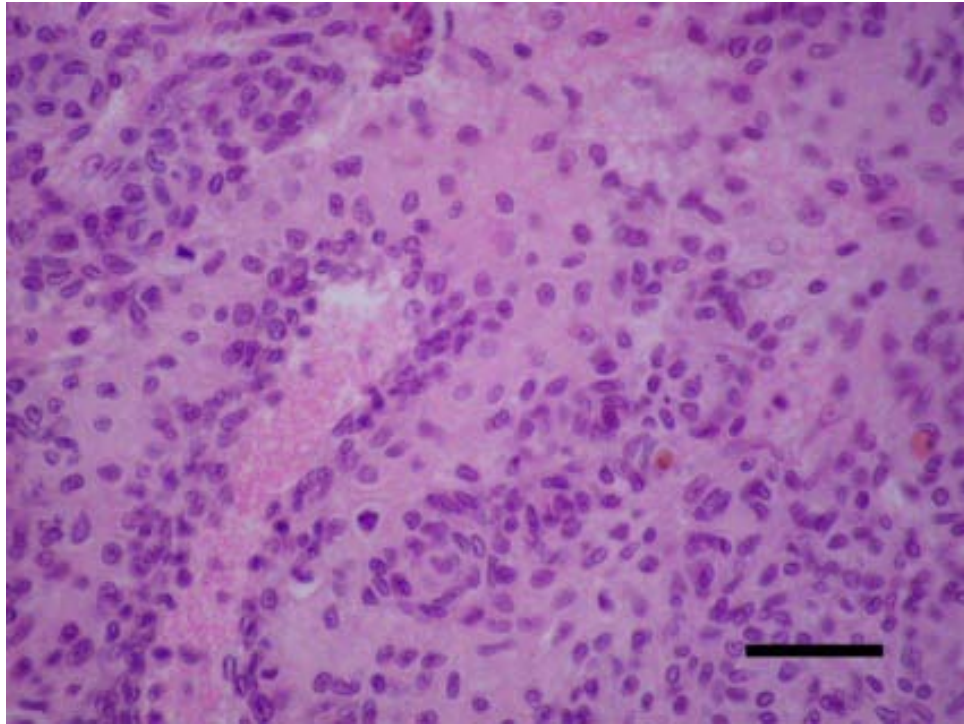


Figura 20.- Microfotografía del órgano linfoide de los camarones inyectados con los PECs de la cepa CAIM 1792 crecida a 10 ‰ a las 120 h pi. Barra de 20 micras.

## 8.- DISCUSIÓN

Muchas especies de bacterias marinas necesitan de la presencia de sodio en el medio donde se desarrollan, ya que es necesario para algunos procesos fisiológicos. La presencia de altas concentraciones de nutrientes orgánicos o cationes divalentes pueden compensar la falta de sodio necesario para el metabolismo de las bacterias (Urakawa y Rivera, 2006). Las cepas y especies de *Vibrio* toleran un amplio rango de salinidades, el óptimo requerimiento de NaCl es de ~ 20 a 25 ‰, algunas especies (halófilas) requieren al menos una concentración del 5 ‰ de NaCl en el medio para crecer, mientras que especies no halófilas como *V. cholerae*, *V. mimicus* o *V. hispanicus*, pueden crecer con concentraciones mínimas de sal (Gómez-Gil *et al.*, 2004b).

La cepa CAIM 1792 de *V. harveyi* tolera un amplio intervalo de salinidades ya que en nuestros resultados se encontró viable desde las 5 ‰ hasta las 100 ‰. Ciertos estudios reportan la viabilidad y requerimientos de NaCl de las cepas bacterianas de *V. harveyi* en diferentes salinidades, sin embargo algunos autores reportan viabilidad de algunas cepas del género *Vibrio*. Jones *et al.* (2008) reportan que tres cepas de *V. vulnificus* no presentan diferencias significativas en su viabilidad cuando fueron cultivadas en salinidades de 21 y 31 ‰. Karunasagar *et al.* (1994) encontró que aislados de *V. harveyi* crecen en salinidades desde 30 hasta 100 ‰ y no reporta crecimiento a 0 ‰. Costa *et al.* (1998) encontraron que 18 cepas del género *Vibrio* crecen en salinidades de 20 al 60 ‰. Cepas de *V. parahaemolyticus* son capaces de crecer en medios con salinidades de 0 a 40 ‰ (Khuntia *et al.*, 2008). *V. alginolyticus* crece en agar TSA ajustado a salinidades desde 10 hasta 100 ‰, estas cepas fueron aisladas de camarones enfermos *L. vannamei* (Liu *et al.*, 2004). Lo que indica que la cepa puede habitar en ambientes salobres e hipersalinos.

La habilidad de los patógenos a adherirse a las superficies es una de las primeras etapas en la iniciación de una infección, por lo que la hidrofobicidad y la formación de biopelículas juegan un papel importante en la adherencia de las bacterias a las superficies de los hospederos. Existen varias de técnicas para medir la hidrofobicidad celular a superficies que es considerado como un factor de virulencia de cepas patógenas bacterianas, sin embargo la prueba que a dado mejores resultados en cepas patógenas de vibrios aisladas de organismos acuáticos enfermos es la prueba de adhesión bacteriana a hidrocarburos, PABH (Lee y Yii, 1996). En este ensayo en la prueba de PAS los tres tratamientos de cambios de salinidad en el cultivo de la cepa CAIM 1792 resultaron no hidrofóbicos. Cuando se usó el método de PABH todos los tratamientos mostraron ser altamente hidrofóbicos de acuerdo a los criterios usados por Santos *et al.* (1990), resultados que coinciden con los reportados por Lee y Yii (1996) y Soto-Rodriguez *et al.*, (2003), donde encontraron que la mayoría de las cepas que probaron fueron altamente hidrofóbicas solo en la prueba de PABH. Estos resultados quizá se deban a las características que pudieran tener las membranas celulares de las bacterias del género *Vibrio* las cuales pueden tener una gran afinidad a los solventes. Manilal *et al.* (2010) encontraron que 29 cepas de vibrios aisladas de ambientes relacionados con el cultivo de camarón presentan una alta hidrofobicidad y consideran estos resultados como inherentes para la formación de biopelículas. Teóricamente los aislados hidrofóbicos tienen una alta afinidad a los tejidos de los hospederos y pueden fácilmente colonizarlos (Soto-Rodriguez, *et al.*, (2003).

Las biopelículas son comunidades microbianas que se forman a partir de una matriz con sustancias extracelulares producidas por los microorganismos (Maric y Vranes, 2007); esta formación de biopelículas puede constituir una estrategia para sobrevivir en períodos de escasez de nutrientes (Lipp *et al.*, 2002), protegerse contra cambios ambientales (Eboigbodin *et al.*, 2007), atrapar y absorber nutrientes, resistir a antibióticos y establecer interacciones favorables con otras bacterias (Thompson *et al.*, 2004). La formación de

biopelículas es considerado un factor muy importante en la virulencia de cepas patógenas. La prueba de formación de biopelículas de la cepa CAIM 1792 en los tres tratamientos se presentó positiva, sin diferencias significativas entre ellos. En la formación de biopelículas de siete cepas de *V. harveyi* Won y Park (2008) encontraron absorbancias desde 0.36 hasta 0.71 en un periodo de incubación de 24 h, en nuestro estudio la cepa CAIM 1792 cultivada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ presentó absorbancias de 0.99, 1.3 y 1.0 respectivamente, mayores que las reportadas por estos autores, por lo que se clasifica como una cepa capaz de formar biopelículas. Las absorbancias mas altas encontradas en nuestro estudio con respecto a los resultados de Won y Park (2008), pudieran deberse a que el periodo de incubación de los tratamientos fue de 48 h. Por otro lado, aun que en este estudio la infección se realizó por inyección, estos resultados nos indican que de manera natural este pudiera ser uno de los primeros pasos que la bacteria cumple para lograr una infección.

Varias especies de vibrios marinos se han reportado como positivos en la producción de sideróforos para la toma de hierro (Winkelmann *et al.*, 2002). Se ha encontrado en infecciones experimentales con vibrios una correlación positiva entre la mortalidad de nauplios de *A. franciscana* y la producción de sideróforos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2003). En este estudio la cepa CAIM 1792 fue positiva a la producción de sideróforos cultivada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰. Owens *et al.* (1996) encontraron que el 78.4 % de las cepas de *V. harveyi* aisladas de diferentes orígenes geográficos y diferentes fuentes, tuvieron una baja producción de sideróforos. Por otro lado Gaun *et al.* (2001) encontraron que el 60 % de las bacterias marinas aisladas de esponjas y agua de mar no son positivas a la producción de sideróforos, aun y cuando se supone que la toma de hierro ocurre comúnmente en bacterias marinas, ya que en el océano hay una baja concentración de este elemento. La producción de sideróforos probablemente se trata de una estrategia de las bacterias para sobrevivir en diferentes medios en el que las células puedan colonizar, algunos

autores sugieren que las concentraciones bajas de hierro en los tejidos del huésped y en el medio acuático pueden ser la señal que dispara la expresión de factores de virulencia incluyendo la producción de sideróforos (Ratleedge y Dover, 2000).

La producción de enzimas extracelulares por bacterias patógenas para organismos acuáticos ha sido reportada (Liu *et al.*, 1996; Alcaide *et al.*, 2001), sin embargo, el papel de estas exoenzimas en la patogenicidad no está bien descrito. Austin y Zhang (2006) consideran los PECs de la bacteria *V. harveyi* como uno de los factores determinantes de la virulencia de esta especie. La producción de toxinas se ve afectada por la composición y condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo: pH, temperatura, oxígeno y sales (Tsai *et al.*, 1997). Las proteasas secretadas por algunas cepas de *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* actúan destruyendo algunas enzimas en la hemolinfa del camarón (Bing *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; 1999). En nuestros resultados la cepa CAIM 1792 se encontró positiva a la producción de proteasas tanto en las células bacterianas como en los PECs, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos, se obtuvo mayor producción de proteasas en el tratamiento de 10 ‰, esto quizá se deba a que la concentración de NaCl esta inhibiendo la actividad de estas enzimas. El mismo resultado presentó el porcentaje de mortalidad cuando se inyectó la bacteria en juveniles de *L. vannamei*, aunque en este ensayo no se encontraron diferencias significativas, quizá estas no fueron observadas debido a una alta variabilidad individual.

Las pruebas de gelatinasas y ureasas resultaron negativas con la cepa y sus PECs cultivada a salinidades de 10, 20 y 40 ‰, por lo que se consideran como enzimas que no tienen relación en la virulencia de esta cepa. Las gelatinasas son moléculas que actúan sobre moléculas del tejido conectivo relacionadas al colágeno y pueden hidrolizar el colágeno o algunos de los productos del colágeno (García-Triana *et al.*, 1998). La actividad de las

gelatinasas no pudo ser predictiva de la patogenicidad de vibrios aislados del mar Adriático (Baffone *et al.*, 2001).

Los signos encontrados en este estudio fueron similares a los observados por Soto-Rodriguez *et al.* (2010b), quienes reportan camarones afectados por el Síndrome de Rojos Vivos con nado errático, letárgicos, anoréxicos, con flacidez en el cuerpo, opacidad en el sitio de inyección, cutícula rojiza y melanizada. Signos similares han sido reportados en camarones infectados con bacterias del género *Vibrio* (Lightner, 1996).

Comparando las mortalidades y las dosis utilizadas en éste trabajo con los reportados en otros estudios, *V. harveyi* cepa CAIM 1792 produce mortalidades similares en el camarón *L. vannamei*, con dosis similares a las reportadas en diferentes partes del mundo para esta misma especie bacteriana (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994; Lui *et al.*, 1996; Alapide y Dureza, 1997; Jayasree *et al.*, 2006; Rattanama *et al.*, 2009; Manilal *et al.*, 2010).

Prayitno y Latchford (1995) reportaron mortalidades más altas cuando cultivaron a *V. harveyi* en menores salinidades y sugieren que el estrés causado a la bacteria le puede inducir a expresar genes relacionados a la virulencia. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas cuando *V. harveyi* cepa CAIM 1792 se cultivó a 10, 20 y 40 ‰, sin embargo, se observó la tendencia a encontrar mortalidades mayores cuando la cepa CAIM 1792 se cultivó en el tratamiento con menor salinidad (10 ‰), además, aunque significativamente no se encontraron diferencias, la cepa CAIM 1792, produjo las menores mortalidades cuando se cultivó a 20 ‰ que es el salinidad más cercana a la cual normalmente se cultiva la cepa (25 ‰) y además a una salinidad similar en la que el camarón se cultiva, esto tal vez se debe a que es la salinidad que menor estrés ejerce sobre la bacteria, que pudiera ser uno de los factores que de alguna manera activan la virulencia de la cepa.

Las especies de *Vibrio* pueden producir factores extracelulares de virulencia como proteasas, fosfolipasas y hemolisinas (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004). Los PECs de diferentes cepas de *V. harveyi* han resultado altamente tóxicos para el camarón *P. monodon* con una LD<sub>50</sub> < 10 µg de proteína/g (Liu *et al.*, 1996; Manilal *et al.*, 2010). Harris y Owens (1999) encontraron que los PECs de dos cepas de *V. harveyi* son letales para el camarón *P. monodon*, reportando una DL<sub>50</sub> de 3.5 y 3.3 µg de proteína/g de camarón. En el presente estudio los PECs de la cepa CAIM 1792 presentó mortalidades desde el 60 % hasta el 100 % con dosis de 10.2 µg de proteína/g de camarón, la salinidad del medio de cultivo de la cepa afectó la toxicidad de los PECs, esto quizá porque la salinidad del medio de cultivo está induciendo la expresión de algunas citolisinas que en este estudio no fueron evaluadas. Los PECs fueron significativamente "más tóxicos" en los tratamientos donde se cultivó la cepa a 20 y 40 ‰.

Los cambios en la salinidad del agua donde se cultiva el camarón *L. vannamei* puede afectar la respuesta del sistema inmune, volviéndolo susceptible a enfermedades infecciosas. Esta especie de manera silvestre puede habitar en ambientes con salinidades de 2 hasta 40 ‰ (Menz y Blanke, 1980). Las supervivencias más altas se presentan a 20 ‰ aproximadamente (Ponce-Palafox *et al.*, 1997). En camarones juveniles *L. vannamei* inyectado con *V. alginolyticus* y mantenido a salinidades de 5, 15, 25 (control) y 35 ‰, las menores mortalidades se presentaron en el tratamiento control (25 ‰) (Wang y Chen, 2005). Resultados similares se presentaron en nuestro trabajo, encontrando que el grupo mantenido a 20 ‰ obtuvo las mortalidades menores con un 56.6 %, significativamente el grupo con mortalidades más altas fue el mantenido a 40 ‰. Las mortalidades menores en el tratamiento de 20 ‰ se deben posiblemente a que es el tratamiento más cercano al punto isosmótico del camarón (25 ‰).



Los organismos inyectados con las células bacterianas mostraron los signos clínicos considerada propios de la vibriosis por diversos autores, especialmente con relación a los cambios de comportamiento y coloración.

En nuestro trabajo los daños encontrados en branquias fueron nódulos hemocíticos y depositos de melanina, daños similares fueron reportados por Aguirre-Guzmán *et al.* (2010); Jiravannichpaisal *et al.* (1994) y Khuntia *et al.* (2008), en camarones juveniles de *L. vannamei* infectados con *V. parahaemolyticus* cepa HL57, *P. monodon* y *M. rosenbergii* infectado con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* respectivamente. En el camarón juvenil *L. vannamei* infectado con *V. alginolyticus* se observó en el músculo la presencia de bacterias, necrosis e infiltración hemocítica (Liu *et al.* 2004), lesiones similares fueron encontradas en nuestro trabajo.

En *L. vannamei* y *Farfantepenaeus brasiliensis* infectados con *V. alginolyticus* se reportaron cambios a nivel tisular similares en el hepatopáncreas de ambas especies, reportando necrosis, núcleos picnóticos, infiltración hemocítica y nódulos hemocíticos con bacterias en su interior (Esteve y Herrera, 2000a, 2000b). Estas lesiones fueron reportadas por Sharshar y Azab (2008) en *M. rosenbergii* infectado con *V. vulnificus*, daños similares fueron encontrados en nuestro trabajo, a excepción de la presencia de bacterias en este órgano que no fueron observadas en los camarones estudiados.

Los PECs de cepas de *V. alginolyticus* producen una degradación gradual del tejido muscular, necrosis y digestión de las células en la zona de inoculación de los peces *Sparus auratus* y *Epinephelus malabaricus*, estos daños podrían deberse a la acción hidrolítica de proteasas, hemolisinas y fosfolipasas detectadas en cepas altamente virulentas (Balebona *et al.*, 1998). Pocos son los reportes de los daños a nivel tisular provocados por los PECs, sin embargo, los daños histológicos provocados por los PECs de la cepa CAIM

1792 fueron principalmente necrosis de los tejidos, estos se deben quizá a que la cepa produce proteasas y posiblemente algunas citolisinas que en este estudio no fueron determinadas.

Los PECs de *Aeromonas hydrophila* inyectados en la tilapia híbrida provocaron necrosis del páncreas, intestino y músculo, además esta bacteria produce más daños histopatológicos al inyectar las células bacterianas que sus PECs (Rey *et al.*, 2009). Resultados similares fueron reportados por Lamas *et al.* (1994) con los PECs de *V. anguillarum* en la trucha arcoíris. En contraste Fouz *et al.* (1995) encontraron más daños cuando inyectó los PECs de *V. damsela* que cuando inyectó las células bacterianas en lenguado. En nuestros resultados se encontraron más daños histopatológicos cuando se inyectaron las células bacterianas que con los PECs, esto quizá se debe a que al inyectar las bacterias estas se multiplican y distribuyen en el organismo luchando contra el sistema de defensa del camarón, por lo que los daños son más severos, sin embargo, las mortalidades causadas por los PECs fueron mayores y se observaron a tiempos menores que cuando se inyectaron las células bacterianas, esto quizá puede deberse a que en los PECs está posiblemente alguna toxina que hace patógena a la cepa CAIM 1792 y al inyectarla directamente en los juveniles de *L. vannamei* sus efectos tóxicos se reflejan en la muerte de los organismos.

## 9.- CONCLUSIONES

- La cepa CAIM 1792 de *V. harveyi* es viable en salinidades desde 10 hasta 100 ‰.
- La producción de proteasas es afectada por la salinidad del medio donde la cepa CAIM 1792 se cultiva, presentando mayor producción cultivada a 10 ‰.
- La hidrofobicidad, formación de biopelículas y la producción de sideróforos no son alteradas por la salinidad del medio en el cual se cultiva *V. harveyi* cepa CAIM 1792.
- Se encontró que la cepa CAIM 1792 es patógena para el camarón juvenil *L. vannamei* en dosis de  $2 \times 10^2$  UFC/g.
- La salinidad del medio donde se cultiva CAIM 1792 no afecta su virulencia, ya que los porcentajes de mortalidad del camarón cuando se inyectaron las células bacterianas fueron estadísticamente similares.
- La salinidad del medio donde se cultiva la cepa CAIM 1792 afecta la toxicidad de sus PECs, observándose los mayores porcentajes de mortalidad de juveniles de *L. vannamei*, inyectados con los PECs obtenidos en los tratamientos de 20 y 40 ‰.

- Se observó que el estrés provocado por la salinidad del medio donde se mantiene *L. vannamei* afecta la mortalidad del camarón infectado.
- Las células bacterianas de la cepa CAIM 1792 provocaron cambios a nivel histológico mayores que los PECs inyectados en juveniles de *L. vannamei*. Las células bacterianas dañaron los siguientes órganos y tejidos: músculo, órgano linfoide, corazón y hepatopáncreas. Los PECs de la cepa CAIM 1792 provocaron cambios a nivel tisular principalmente en el sitio de inyección observándose necrosis del tejido muscular.

## **10.- RECOMENDACIONES**

Futuros estudios deben ser dirigidos a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la patogenicidad y virulencia de la cepa CAIM 1792. En base a nuestros resultados se recomienda una caracterización de los PECs para conocer los mecanismos y factores de virulencia que la cepa CAIM 1792 utiliza para lograr su patogenicidad, además de estudios para determinar la ruta de infección de la cepa CAIM 1792. Asimismo son necesarios estudios modificando más variables del medio de cultivo bacteriano para conocer la interacción del medio y la virulencia de la cepa CAIM 1792.

## 11.- BIBLIOGRAFÍA

- **Aguirre-Guzmán G., Mejia-Ruíz H. y Ascencio F. (2004).** A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 35: 1395-1404.
- **Aguirre-Guzmán G., Sánchez-Martínez J.G., Pérez-Castañeda R., Palacios-Monzón A., Trujillo-Rodríguez T. y Cruz-Hernández N.I. (2010).** Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in american white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41: 464-470.
- **Alapide-Tendencia E.V. y Dureza L.A. (1997).** Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture*, 154: 107-114.
- **Alcaide E., Gil-Sanz C., Sanjuán E., Esteve D., Amaro C. y Silveira L. (2001).** *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. *Journal Fish Disease*, 24: 311-313.
- **Alvarez J.D., Austin B., Austin A.M. y Reyes H. (1998).** *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of Fish Diseases*, 21: 313-316.
- **Austin B. y Zhang X.H. (2006).** *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 119-124.

- **Baffone W., Citterio B., Vittoria E., Casaroli A., Pianetti A., Campana R. y Bruscolini F. (2001).** Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from seawater. *Food Microbiology*, 18: 479-488.
- **Balebona M.C., Andreu M., Zorrilla I., Moriñigo M.A. y Borrego J.J. (1998).** Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4269-4275.
- **Baticados M.C.L., Lavilla-Pitogo C.R., Cruz-Lacierda E.R., Pena L.D. y Sunaz N.A. (1990).** Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9: 133-139.
- **Bell T.A. y Lightner D.V. (1988).** A handbook of normal shrimp histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 114 pp.
- **Binesse J., Delsert C., Saulnier D., Champomier-Verge`s M.C., Zagorec M., Munier-Lehmann H., Mazel D. y Le Roux F. (2008).** Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 7108-7117.
- **Bing X., Huai-Shu X. y Wishang J. (1993).** Pathogens and pathogenicity to *Penaeus orientalis* Kishinouye. *Acta Oceanologica Sinica*, 3: 297-304.

- **Bordas M.A., Balebona M.C., Zorrilla I., Borrego J.J. y Moriño M.A. (1996).** Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3650-3654.
- **Bradford M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- **Cabaj A. y Kosakowska A. (2009).** Iron-dependent growth of and siderophore production by two heterotrophic bacteria isolated from brackish water of the southern Baltic Sea. *Microbiology Review*, 164: 570-577.
- **Cabanillas-Beltran H., LLausas-Magana E., Romero R., Espinoza A., Garcia-Gasca A., Nishibuchi M., Ishibashi M. y Gomez-Gil B. (2006).** Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letter*, 265: 76-80.
- **Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (2010).** Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2008.
- **Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Legroumellec M. y Grimont P. (1998).** Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*, 164: 297-309.



- **Croxatto A., Lauritz J., Chen C. y Milton D.L. (2007).** *Vibrio anguillarum* colonization of rainbow trout integument requires a DNA locus involved in exopolysaccharide transport and biosynthesis. *Environmental Microbiology*, 9: 370-382.
- **Dass B.K.M., Venugopal M.N., Karunasagar I. y Karunasagar I. (2007).** Bacteria Associated with Biofilms in a *Macrobrachium rosenbergii* Hatchery. *Asian Fisheries Science*, 20: 299-307.
- **Defoirdt T., Bossier P., Sorgeloos P. y Verstraete W. (2005).** The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology*, 7: 1239-1247.
- **Eboigbodin K.E., Ojeda J.J. y Biggs C.A. (2007).** Investigating the surface properties of *Escherichia coli* under glucose controlled conditions and its effect on aggregation. *Langmuir*, 12: 6691-6697.
- **Esteve M. y Herrera F.C. (2000a).** Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 1-5.
- **Esteve M. y Herrera F.C. (2000b).** "Alteraciones histológicas del hepatopáncreas en juveniles de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (crustacea: penaeidae) experimentalmente infectados con *Vibrio alginolyticus*". *Saber Universidad de Oriente, Venezuela*, 12: 14-20.

- **Fouz B., Novoa B., Toranzo A.E. y Figueras A. (1995).** Histopathological lesions caused by *Vibrio damsela* in cultured turbot *Scophthalmus maximus* (L.): inoculations with live cells and extracellular products. *Journal of Fish Diseases*, 18: 357-364.
- **García-Triana B.E., Vicedo-Tomey A., García Piñeiro J.C. y Saldaña Bernabeu A. (1998).** Enzimas proteolíticas relacionadas con la enfermedad periodontal inflamatoria. *Revista Cubana Estomatológica*, 35: 62-67.
- **Gay M., Renault t., Pons A.M. y Le Roux F. (2004).** Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62: 65-74.
- **Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A.L., Martin C. y Martin B. (2000).** Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40: 101-107.
- **Gomez-Gill B., Soto-Rodriguez S.A., García-Gasca A., Roque A., Vázquez R., Thompson F.L. y Swings J. (2004a).** Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150: 1769-1777.
- **Gomez-Gil B., Thompson F.L., Thompson C.C., Garcia-Gasca A., Roque A. y Swings J. (2004b).** *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 261-265.
- **Guan L.L., Kanoh K. y Kamino K. (2001).** Effect of exogenous siderophores on iron uptake activity of marine bacteria under iron limited conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1710-1717.

- **Harris L.J. y Owens L. (1999).** Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38: 11-22.
- **Hasegawa H., Lind E.J., Boin M.A., y Haïse C.C. (2008).** The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 4101-4110.
- **Henke J.M. y Bassler B.L. (2004).** Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 186: 3794-3805.
- **Jayasree L., Janakiram P. y Madhavi R. (2006).** Characterization of *Vibrio spp.* associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37: 523-532.
- **Jiravanichpaisal P., Miyazaki T. y Limsuwan C. (1994).** Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6: 27-35.
- **Jones M. K., Warner E. y Oliver J. D. (2008).** Survival of and in situ gene expression by *Vibrio vulnificus* at varying salinities in estuarine environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 182-187.
- **Karunasagar I., Pai R. y Malathi G.R. (1994).** Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.

- **Kautsky N., Ro'nnb'ack P., Tedengren M. y Troell M. (2000).** Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 191: 145-161.
- **Khuntia C.P., Das B.K., Samantaray B.R., Samal S.K. y Mishra B.K. (2008).** Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 39: 301-310.
- **Kirn T., Jude B. y Tailor R. (2005).** A colonization factor links *Vibrio cholera* environmental survival and human infection. *Nature*, 438: 863-866.
- **Lamas J., Santos Y., Bruno D., Toranzo A.E. y Anadon R. (1994).** A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology*, 29: 79-89.
- **Lee K.K., Yu S.R., Chen F.R., Yang T.I. y Liu P.C. (1996).** Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology*, 32: 229-231.
- **Lee K.K. y Yii K.C. (1996).** A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic *Vibrios*. *Letters in Applied Microbiology*, 23: 343-346.
- **Lee K.K., Yu S.R. y Liu P.C. (1997).** Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology*, 34: 110-117.

- **Lee K.K., Chen Y.L. y Liu P.C. (1999).** Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease. *Blood Cellars Molecular Disease*, 25: 180-192.
- **Le Roux F., Binesse J., Saulnier D. y Mazel D. (2007).** Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counter selectable suicide vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 777-784.
- **Lemonnier H., Herbland A., Salery L. y Soulard B. (2006).** “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors. *Aquaculture*, 261: 1039-1047.
- **Lightner D.V. (1996).** Disease of culture penaeid shrimp. pp 1-78 McVey, J.P. (ed.), *Handbook of mariculture. Crustacean Aquaculture*. 2a ed. CRC. Press. Boca Raton, Florida, 545 pp.
- **Lin B., Wang Z., Malanoski A.P., O'Grady E.A., Wimpee C.F., Vuddhakul V., Alves N., Thompson F.L., Gomez-Gil B. y Vora G.J. (2010).** Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-398 1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology Reports*, 2: 81-89.
- **Lipp E.K., Huq A. y Colwell R.R. (2002).** Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 757-770.
- **Litwin C. y Calderwood S. (1993).** Role of iron in regulation of virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 6: 137-149.

- **Liu P.C., Lee K.K. y Chen S.N. (1996).** Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology, 22: 413-416.
- **Liu P.C., Lee K.K., Tu C.C. y Chen S.N. (1997).** Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Current Microbiology, 35: 32-39.
- **Liu P.C. y Lee K.K. (1999).** Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology, 28: 428-430.
- **Liu C.H., Cheng W., Hsu J.P. y Chen J.C. (2004).** *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Diseases of Aquatic Organisms, 61: 169-174.
- **Lorenzo M.D., Stork M., Aice A.F., Lopez C.S. y Crosa J.H. (2004).** *Vibrio* iron transport in bacteria. AMS, Washington, pp 241–255. En Murugappan R.M., Aravinth A. y Karthikeyan M. (2010). Chemical and structural characterization of hydroxamate siderophore produced by marine *Vibrio harveyi*. Journal Indy Microbiology Biotechnology,
- **Manilal A, Sujith S., Selvin J., Shakir C. y Gandhimath R. (2010).** Virulence of vibrios isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fabricius. Journal of the World Aquaculture Society, 41: 332-343.
- **Maric S. y Vranes J. (2007).** Characteristics and significance of microbial biofilm formation. Periodicum Biologorum, 2: 115-121.

- **Menz A. y Blanke B.F. (1980).** Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 48: 99-111.
- **Montero A.B. y Austin B. (1999).** Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). Journal of Fish Diseases, 22: 377-386.
- **Murugappan R.M., Aravinth A. y Karthikeyan M. (2010).** Chemical and structural characterization of hydroxamate siderophore produced by marine *Vibrio harveyi*. Journal of Applied Microbiology Biotechnology,
- **Neurath H. (1989).** Proteolytic processing and physiological regulation trends. Biochemical Sciences, 14: 268-271.
- **Oakey H.J. y Owens L. (2000).** A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. Journal of Applied Microbiology, 89: 702-709.
- **Owens L., Austin D.A. y Austin B. (1996).** Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates. Diseases of Aquatic Organisms, 27: 157-160.
- **Owens L. y Busico-Salcedo N. (2006).** *Vibrio harveyi*: Pretty problems in Paradise. En: The Biology of the Vibrios (eds) FL Thompson, B Austin and J Swings. ASM Press Washington DC.
- **Pizzutto M. y Hirst R.G. (1995).** Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. Diseases of Aquatic Organisms, 21: 61-68.

- **Ponce-Palafox I., Martínez-Palacios C.A. y Ross L.G. (1997).** The effect of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157: 107-115.
- **Prayitno S.B. y Latchford J.W. (1995).** Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*, 132: 105-112.
- **Ratledge C. y Dover L.G. (2000).** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54: 881-941.
- **Rattanama P., Srinitiwarawong K., Thompson J.R., Pomwised R., Supamattaya K. y Vuddhakul V. (2009).** Shrimp pathogenicity, hemolysis and the presence of hemolysin and TTSS genes in *Vibrio harveyi* isolated from Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86: 113-122.
- **Rey A., Verján N., Ferguson H. W. y Iregui C. (2009).** Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record*, 164: 493-499.
- **Robertson P.A.W., Calderon J., Carrera L., Stark J.R., Zherdmant M. y Austin B. (1998).** Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32: 151-155.
- **Rosenberg M., Gutnick D. y Rosenberg E. (1980).** Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 29-33.



- **Salyers A.A. y Whitt D.D. (1994).** Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Department of Microbiology, University of Illinois, USA.
- **Sandy M. y Butler A. (2009).** Microbial iron acquisition: Marine and terrestrial siderophores. *Chemistry Review*, 109: 4580-4595.
- **Santos Y., Bandin I., Bruno D.W., Ellis A.E. y Toranzo A. (1990).** Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures. En: Perkins, O.F., Chen, T.C. (Eds.), *Pathology in Marine Sciences*. Academic Press, San Diego, 101-115.
- **Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P. y Ansquer D. (2000).** Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: A review. *Aquaculture*, 191: 113-114.
- **Schwyn B. y Neilands J.B. (1987).** Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47-56.
- **Shashar K.M. y Azab E.A. (2008).** Studies on diseased freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* infected with *Vibrio vulnificus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17: 2092-2100.
- **Shivappa R.B. (1997).** Efficacy of probiotics and disinfectants in controlling luminescent bacteria in shrimp post larvae under normal and stressed conditions. MSc Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok.
- **Shinoda S. (1999).** Protein toxins produced by pathogenic vibrios. *Journal Natural Toxins*, 8: 259-269.

- **Soto-Rodriguez S.A. (2002).** Estudio de los mecanismos de patogenicidad de bacterias luminiscentes en larvas de camarón. Tesis doctoral. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada. Ensenada, Baja California.
- **Soto-Rodriguez S.A., Roque A., Lizárraga P., Guerra F. y Gomez G.B. (2003).** Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53: 231-240.
- **Soto-Rodriguez S.A., Gomez G.B., Lozano R. y Roque A. (2010a).** Density of vibrios in hemolymph and hepatopancreas of diseased Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from northwestern Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41: No. S1
- **Soto-Rodriguez S.A., Gomez G.B. y Lozano R. (2010b).** “Bright-reds” Syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92: 11-19.
- **Stensvag K., Jorgensen T.O., Homan J., Hjelmeland K. y Bogwald J. (1993).** Partial purification and characterization of extracellular metalloproteases with caseinolytic, aminopeptidolytic and collagenolytic activities from *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases*, 16: 525-539.
- **Su J.H., Chang M.C., Lee Y.S., Tseng I.C. y Chuang Y.C. (2004).** Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. *Biochemistry Biophysics Acted*, 1678: 7-13.
- **Thompson F.L., Lida T. y Swings J. (2004).** Biodiversity of vibrios. *Molecular Biological Review*, 68: 403-431.

- **Thompson F.L., Gomez-Gil B., Ribeiro Vasconcelos A.T. y Sawabe T. (2007).** Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* form distinct species. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 4279-4285.
- **Todar K. (2009).** Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. (citado 6 de octubre 2010) [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net).
- **Tonguthai K. (1995).** Diseases of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. The Aquatic Animal and Health Research Institute Newsletter 4: 1-4.
- **Travers M.A., Le Bouffant R., Friedman C.S., Buzin F., Cougard B., Huchette S., Koken M. y Paillard C. (2009).** Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106: 152-160.
- **Tsai G.J., Tsai F.G. y Kong Z.L. (1997).** Effects of temperature, medium composition, pH, salts and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. *Journal Food Microbiology*, 38: 111-116.
- **Urakawa H. y Rivera I.N. (2006).** Aquatic environment. The biology of vibrios, 12: 175-189.
- **Valiente E., Padro´ F., Lamas J., Llorens A. y Amaro C. (2008).** Microbial and histopathological study of the vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E in eels: The metalloprotease Vvp is not an essential lesional factor. *Microbial Pathogenesis*, 45: 386-393.

- **Wang L.U. y Chen J.C. (2005).** The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 269-278.
- **Winkelmann G., Schmid D.G., Nicholson G., Jung G. y Colquhoun D.J. (2002).** Bisucaberin-A dihydroxamate siderophore isolated from *Vibrio salmonicida*, an important pathogen of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biometals*, 15: 153-160.
- **Won K.M. y Park S.I. (2008).** Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture*, 285: 8-13.
- **Wyckoff E.E., Mey A.R. y Payne S.M. (2007).** Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals*, 20: 405-416.
- **Zhang X.H. y Austin B. (2000).** Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23: 93-102.
- **Zhang X.H. y Austin B. (2005).** Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal and Applied Microbiology*, 98: 1011-1019.

## 12.- ANEXOS

Anexo 1.- Protocolo para la preparación de las placas de agar CAS.

Mezcla 1, consiste en disolver 60.5 mg CAS en 50 ml de agua destilada, agregar 10 ml de hierro (III), añadir agitando lentamente 72.9 mg de HDTMA previamente disueltos en 40 ml de agua destilada.

Mezcla 2, en 750 ml de agua destilada mezclar 100 ml de 10X MM9 (3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g de NaCl, 10 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aforados a 1000 ml), 15 g de agar bacteriológico, 30.24 g de PIPES y ajustar el pH a 6.8 con NaOH.

Las mezclas se esterilizan, se dejan enfriar a 50 °C aproximadamente, en la mezcla 2 se agregan 10 ml de casaminoácidos al 10 %, 10 ml de glucosa al 20 %, por último se agrega la mezcla 1 agitando lentamente, se deja enfriar y se vacía en cajas de Petri estériles.

Anexo 2.- Deshidratación y embebido de parafina en los tejidos.

Reactivos	Tiempos de inmersión
Alcohol 70°	2 baños de 1 horas c/u
Alcohol 80°	2 baños de 1 horas c/u
Alcohol 96°	2 baños de 1 horas c/u
Alcohol 100°	2 baños de 1 horas c/u
Xilol	2 baños de 1 horas c/u

Anexo 3.- Protocolo de la tinción con hematoxilina (Harris) eosina-floxina.

Reactivos	Tiempos
Xilol	2 baños de 5 min c/u
Alcohol 100°	2 baños 10 sumergidas lentas c/u
Alcohol 96°	2 baños 10 sumergidas lentas c/u
Alcohol 80°	2 baños 10 sumergidas lentas c/u
Alcohol 50°	1 baño 10 sumergidas lentas
Agua destilada	1 baño 10 sumergidas lentas
Hematoxilina	1 baño de 5 min
Alcohol ácido	1 sumergida rápida
Agua corriente	1 baño de 5 min
Agua amoniacal	1 baño de 1 min
Agua corriente	1 baño de 5 min
Eosina	1 baño 10 sumergidas lentas
Alcohol 96°	3 baños 10 sumergidas lentas c/u
Alcohol 100°	3 baños 10 sumergidas lentas c/u
Xilol	3 baños 10 sumergidas lentas c/u
Montar con resina	Secar a 60 °C durante una noche.

Anexo 4.- Protocolo para la preparación de BFS.

Pesar 8 g de NaCl (137 mM), 0.2 g de KCl (2.7 mM), 1.44 g de NaHPO (10 mM) y 0.24 g de KHHPO (2 mM), mezclarlos y diluir en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 7.4 con HCl y aforar a 1 litro.

Conservar a 4-8 °C, desechar si aparecen cambios de coloración o precipitados.

Anexo 5.- Porcentaje de mortalidad de *L. vannamei* infectado con la cepa CAIM 1792, dosis de  $2 \times 10^2$  UFC/g y  $2 \times 10^3$  UFC/g.

Tiempo (h)	Tratamientos		
	Control	$2 \times 10^2$ UFC/g	$2 \times 10^3$ UFC/g
6	0a	0a	0a
12	0a	0a	$2.5 \pm 4.3a$
18	0a	0a	$75 \pm 5b$
24	0a	0a	$80 \pm 7.1b$
48	0a	$7.5 \pm 4.3a$	$87.5 \pm 4.3b$
72	0a	$7.5 \pm 4.3a$	$90 \pm 7.1b$
96	0a	$12.5 \pm 8.3a$	$92.5 \pm 8.3b$
120	0a	$15 \pm 11.2a$	$92.5 \pm 8.3b$
144	0a	$15 \pm 11.2a$	$92.5 \pm 8.3b$
168	0a	$15 \pm 11.2a$	$92.5 \pm 8.3b$

Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ).  $a < b$ .

Anexo 6.- Porcentaje de mortalidad de *L. vannamei* infectado con *V. harveyi* a dosis de  $2.4 \times 10^4$  UFC/g, crecida en medios con diferente salinidad.

Tiempo(h)	Tratamientos			
	Control	10 ‰	20 ‰	40 ‰
6	0a	0a	0a	0a
12	0a	$3.3 \pm 4.7a$	$10 \pm 8.2a$	$46.7 \pm 28.7a$
18	0a	$23.3 \pm 12.5ab$	$26.7 \pm 4.7ab$	$66.7 \pm 26.2b$
24	0a	$43.3 \pm 4.7b$	$53.3 \pm 18.9b$	$73.3 \pm 17b$
48	0a	$86.7 \pm 9.4b$	$73.3 \pm 12.5b$	$76.7 \pm 18.9b$
72	0a	$86.7 \pm 9.4b$	$73.3 \pm 12.5b$	$80 \pm 21.6b$
96	0a	$90 \pm 8.2b$	$73.3 \pm 12.5b$	$83.3 \pm 17b$
120	0a	$90 \pm 8.2b$	$73.3 \pm 12.5b$	$83.3 \pm 17b$
144	0a	$90 \pm 8.2b$	$73.3 \pm 12.5b$	$83.3 \pm 17b$
168	0a	$90 \pm 8.2b$	$73.3 \pm 12.5b$	$83.3 \pm 17b$

Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ).  $a \leq ab \leq b$  y  $a < b$ .

Anexo 7.- Porcentaje de mortalidad de *L. vannamei* inyectado con los PECs de *V. harveyi* cepa CAIM 1792 crecida en medios con diferente salinidad. Primer ensayo.

Tiempo (h)	Tratamientos			
	Control	10 ‰	20 ‰	40 ‰
6	0a	60 ± 8.2c	23.3 ± 4.7b	13.3 ± 12.5ab
12	0a	63.3 ± 12.5b	76.6 ± 4.7b	60 ± 21.6b
18	0a	63.3 ± 12.5b	100c	83.3 ± 4.7bc
24	0a	63.3 ± 12.5b	100c	83.3 ± 4.7bc
48	0a	63.3 ± 12.5b	100c	90 ± 8.2c
72	0a	63.3 ± 12.5b	100c	90 ± 8.2c
96	0a	63.3 ± 12.5b	100c	90 ± 8.2c
120	0a	63.3 ± 12.5b	100c	90 ± 8.2c

Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).  $a < b < c$ .

Anexo 8.- Porcentaje de mortalidad de *L. vannamei* inyectado con los PECs de *V. harveyi* cepa CAIM 1792 crecida en medios con diferente salinidad. Segundo ensayo.

Tiempo (h)	Tratamientos			
	Control	10 ‰	20 ‰	40 ‰
6	0a	60 ± 8.2b	27 ± 12.5a	86.7 ± 12.5b
12	0a	66.7 ± 4.7b	100c	96.7 ± 4.7c
18	0a	73.3 ± 12.5b	100c	100c
24	0a	83.3 ± 9.4b	100c	100c
48	0a	83.3 ± 9.4b	100c	100c
72	0a	83.3 ± 9.4b	100c	100c
96	0a	83.3 ± 9.4b	100c	100c
120	0a	83.3 ± 9.4b	100c	100c

Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).  $a < b < c$ .



Anexo 9.- Porcentaje de mortalidad de *L. vannamei* cultivado a salinidades de 10, 20 y 40 ‰ inyectado con *V. harveyi* cepa CAIM 1792 crecida a 25 ‰.

Tiempo (h)	Tratamientos			
	Control	10 ‰	20 ‰	40 ‰
6	0a	16.7 ± 4.7a	0 ± 0a	16.7 ± 9.4a
12	0a	50 ± 8.2b	13.3 ± 10a	56.7 ± 12.5b
24	0a	53.3 ± 4.7bc	16.7 ± 5ab	73.3 ± 24.9c
48	0a	66.7 ± 12.5bc	40 ± 8.2b	86.7 ± 12.5c
72	0a	66.7 ± 12.5bc	56.7 ± 4.7b	90 ± 14.1c
96	0a	66.7 ± 12.5b	56.7 ± 4.7b	93.3 ± 9.4c
120	0a	66.7 ± 12.5b	56.7 ± 4.7b	93.3 ± 9.4c
144	0a	66.7 ± 12.5b	56.7 ± 4.7b	93.3 ± 9.4c
168	0a	66.7 ± 12.5b	56.7 ± 4.7b	93.3 ± 9.4c

Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencias significativas (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).  $a \leq ab \leq b \leq bc$  y  $a < b < c$ .