

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

UNIDAD MAZATLAN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL.

---

POSTGRADO EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL.

MAESTRÍA EN CIENCIAS.

**Variación espacio-temporal de *Vibrio parahaemolyticus* total y toxigénico en el sistema lagunar Huizache-Caimanero, Sinaloa, México.**

**TESIS**

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presento:

**PERLA IVONNE VELASCO AMARO.**

En la dirección de:

Dr. BRUNO GÓMEZ GIL RODRIGUEZ SALA.

**Mozotlán, Sinaloa.**

**09 de octubre del 2007.**

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.

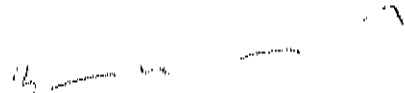
Se permite citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe del Área correspondiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora CP 83000 México, para citas o consultas mas 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 aprobación escrita del director.

---

Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar  
Director General del CIAD, A.C.

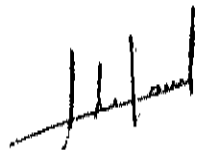
Los miembros de este comité designado para revisar la tesis de **Velasco Amaro Perla Ivonne**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que se sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

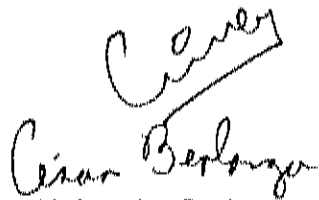
CIAD- Mazatlán.

Director de Tesis.



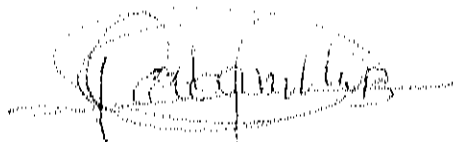
Dra. Silvia Alejandra García Gasca

CIAD- Mazatlán.



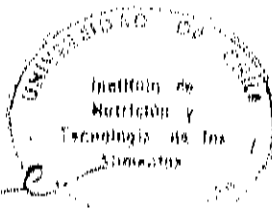
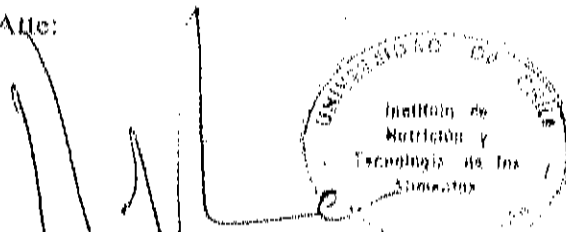
Dr. César Alejandro Berlanga Robles.

CIAD- Mazatlán.



Dr. Héctor Cabanillas Beltrán,  
Profesor-Investigador Titular "C"  
Instituto Tecnológico de Tepic

Atte:



Dr. Romilio Espejo Torres,  
INTA-Chile

*A vida é muito alegre como você. . .*

*Parabéns . . .*

*Sorriso, Sirenita e Azusita*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al comité evaluador de este trabajo de tesis, Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, Dra. Alejandra García Gasca, Dr. Cesar Berlanga, Dr. Héctor Cabanillas Beltrán y Dr. Romilio Espejo Torres.

Al CIAD-unidad Mazatlán por la formación en el postgrado de maestro en ciencias en acuacultura y manejo ambiental.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de la maestría en esta institución y por el apoyo brindado en la realización de la estancia de investigación en la INTA-Santiago de Chile.

Al grupo de trabajo del CRIP-Mazatlán por la ayuda brindada en los muestreos realizados.

Al grupo de trabajo del laboratorio de bacteriología del CIAD, Carmen Bolán Mejía y Roxana Atondo Mexía, por la enseñanza y apoyo en las técnicas necesarias para la realización este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio que están o que ya terminaron.

A TODOS mis compañeros de postgrado del CIAD, Cathérine Soler, Sofia Mezo, Karina Hernández, Aimeé Cervantes y Ricardo Méraz.

A TODOS los investigadores del CIAD que contribuyeron en mi formación académica y a las observaciones que realizaron durante los seminarios, en especial a Miguel Betancourt.

Un agradecimiento muy especial a Pablo Almazán coordinador de postgrado del CIAD.

Un gran agradecimiento y muy especial, a mi familia adoptiva y grandes amigos aquí en Mazatlán; Gineta, Dania, Christian (tete), Marina, (Chino), Blas y Fausto ¡Los quiero mucho niños!

También un agradecimiento a mis grandes amigas de La Paz, Karem Anahí y María Claudia, y a Arturo del DF, ya que en este tiempo han estado pendiente brindándome su gran apoyo.

A los integrantes del grupo de Capoeira Negaça y a todos los que compartieron su amistad conmigo... gracias apoyarme

Este trabajo fue financiado por el proyecto FOMIX-Sinaloa Sin-2005-CO1-06,  
Evaluación de las Condiciones Físicoquímicas y Microbiológicas del Complejo Lagunar  
Huizache-El Caimanero, Sinaloa.

*Con gran Cariño y Amor a mi Familia*

*Una gran señora, pilar de fortaleza y mi admiración:*

*María Felix Amaro Pereda . . . mi madre*

*Dos grandes amigas y compañeras:*

*Brisa Gpo. y Ma. Cristal . . . mis hermanas*

*Dos angelitos de alegría y motivación:*

*Belen y Jesús . . . mis sobrinos*

*Gracias por apoyarme en todo lo que he iniciado en la vida y  
hacerme sentir que están tan cerca cuando estamos tan lejos. . .*

*Los quiero. . .*



## CONTENIDO

<b>Índice de Tablas.</b>	iii
<b>Índice de Figuras.</b>	iv
<b>Resumen.</b>	vi
<b>Abstract</b>	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</b>	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4
Genes de virulencia y marcadores específicos de <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i>	5
Actividad de los factores patogénicos de <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i>	8
Brotos epidémicos de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en el mundo	11
Brotos epidémicos en la República Mexicana	13
Prevalencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Área de estudio	21
Trabajo de Campo	21

Trabajo de Laboratorio	24
Trabajo de Escritorio	28
<b>VI.RESULTADOS</b>	
Objetivo 1	29
Objetivo 2	38
Objetivo 3	43
Objetivo 4	44
<b>VII. DISCUSIÓN.</b>	55
<b>VIII. CONCLUSIÓN.</b>	61
<b>IX.RECOMENDACIONES.</b>	62
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	63

## Índice de Tablas.

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo en la Laguna Huizache-Caimanero.	22
Tabla 2. Fragmentos amplificados para la detección rápida de <i>V. parahaemolyticus</i> total (tlh), toxigénico (tdh, trh) y pandémico (orf 8).	26
Tabla 3. Condiciones de termociclador para la realización de PCR.	26
Tabla 4. Resultados del Análisis de correlación de Spearman entre los diferentes grupos de bacterias por sustrato y grupo.	36
Tabla 5. Número de aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> por mes y sustrato procedentes del sistema lagunar Huizache-Caimanero durante mayo del 2006 a abril del 2007.	40
Tabla 6. Presencia de <i>V. parahaemolyticus</i> toxigénico en el sistema Lagunar Huizache- Caimanero.	43
Tabla 7. Matriz de correlación de <i>V. parahaemolyticus</i> con variables ambientales físicos, nutrientes y las comunidades bacterianas calculada por análisis de componentes principales.	54

## Índice de Figuras.

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Fig. 1. Ubicación de Sistema Lagunar Huizache-Caimanero se señalan las estaciones de muestreo.	23
Fig. 2. Detección de la producción de las hemolisinas ( <i>tlh</i> , <i>tdh</i> y <i>trh</i> ) y <i>orf-8</i> en cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> por medio de PCR.	27
Fig. 3. Variación espacio (eje Y)-temporal (eje X) de bacterias Heterótrofas totales y bacterias del genero <i>Vibrio</i> presente en la columna de agua.	31
Fig. 4. Variación espacio (eje Y)-temporal (eje X) de bacterias heterótrofas totales y bacterias del genero <i>Vibrio</i> presente en sedimento.	32
Fig. 5. Variación espacio (eje Y)-temporal (eje X) de bacterias heterótrofas totales y del genero <i>Vibrio</i> presente en muestras de camarón.	33
Fig. 6. Análisis de componentes principales de la correlación encontrada para las comunidades bacterianas.	35
Fig. 7. Análisis de factores (Eigen analysis) a través de componentes principales de las abundancias para las comunidades.	37

Fig. 8. Análisis de factores (eigen analysis) a través de componentes principales de los meses de muestreo con respecto a las densidades encontradas.	37
Fig. 9. Variación temporal de <i>V. parahaemolyticus</i> en muestras de agua, sedimento y camarón en la laguna Huizache-Caimanero.	42
Fig. 10. Variación espacial de <i>V. parahaemolyticus</i> en muestras de agua, sedimento y camarón en la laguna Huizache-Caimanero.	42
Fig. 11. Variación temporal de los parámetros físicos de temperatura y salinidad en la laguna Huizache-Caimanero.	45
Fig. 12. Variación temporal de pH y oxígeno disuelto en la laguna Huizache-Caimanero.	46
Fig. 13. Variación temporal de material suspendido, nitrógeno total y amonio total en la laguna Huizache-Caimanero.	47
Fig. 14. Variación temporal de nitratos, fósforo total, nitritos y fosfatos en la laguna Huizache-Caimanero.	48
Fig. 15. Gráfica de componentes principales de las variables ambientales con respecto a mes y sitio.	49
Fig. 16. Análisis de componentes principales de comunidades bacterianas y parámetros ambientales	51
Fig. 17. Gráfica de componentes principales de <i>V. parahaemolyticus</i> con respecto a parámetros físicos y nutrientes.	53

## Resumen.

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria propia del ambiente marino que se ha detectado contaminando organismos de consumo humano, representando un riesgo para la salud pública. Estudios anteriores muestran que *V. parahaemolyticus* presenta una variación temporal atribuida principalmente a la temperatura. En México se ha registrado su presencia en ambas costas. En el sur de Sinaloa, en la laguna Huizache-Caimanero se documentó el primer brote epidémico causado por la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* O3:K6 en otoño del 2003 y 2004. El presente trabajo se realizó en la misma zona en el período de mayo del 2006 a abril del 2007. Se obtuvieron 231 aislados tlh+, seis fueron toxigénicos (tdh+), los meses de mayor presencia fueron: noviembre (74), marzo (34) y febrero (33). Los aislados obtenidos procedieron de sedimento (117), camarón (58) y agua (54). Las cepas toxigénicas (tdh+) se detectaron en agua y sedimento a partir de septiembre en la época de lluvias, teniendo mayor densidad en diciembre cuando las temperaturas disminuyeron. No se detectaron cepas toxigénicas en camarón ni cepas pandémicas en el área de estudio. Se encontró que *V. parahaemolyticus* muestra una variación temporal ( $F= 10.64$ ,  $p\leq 0.05$ ) y espacial ( $Zr= 42.47$ ,  $p\leq 0.05$ ) correlacionada en mayor parte con la salinidad, tanto en agua ( $r= 0.57$ ) como en camarón ( $r=0.78$ ). El aporte de nutrientes a la laguna, como un evento puntual en la época de lluvias, afecta esta variación en agua ( $r=0.60$ ) y en camarón ( $r= 0.63$ ). La presencia de *V. parahaemolyticus* en la laguna representa un riesgo para la salud pública, por lo que se recomienda mantener un monitoreo constante de las lagunas de importancia en la extracción de recursos pesqueros, de manera que se disminuya el riesgo.

## Abstract.

Environmental impacts (water, sediment and shrimp) were collected each month from May 2006 through April 2007 in fishing sites along the coastal zone, Huitzilaco Lagoon, Sinaloa, Mexico. Total *V. parvum* (11) and *V. cholerae* (11) strains were identified by PCR, sequencing and phylogenetic analysis. *V. parvum* strains were identified by PCR, sequencing and phylogenetic analysis. *V. parvum* showed seasonal variation with water coliforms and salinity in water ( $r = -0.57$ ) and shrimp ( $r = 0.78$ ) significantly, in sediment was correlated with pH ( $r = 0.44$ ). The nutrient concentrations during the rainy and dry season in the region affected the variation in the abundance of *V. parvum*, the nitrate input was significantly correlated with bacteriological in water ( $r = 0.60$ ) and shrimp ( $F = 0.63$ ) samples. The highest density of total *V. parvum* was  $1 \times 10^1$  UFC/ml of water and  $1 \times 10^1$  UFC/gr of shellfish in November with a temperature of 27°C and salinity of 13 ppm. After the rainy season, toxicogenic (*tdh+*, *trh+*) strains of *V. parvum* were detected only in water and sediment samples in September. The highest density was detected in September when the temperature was 27°C and salinity 20 ppt. The results were not discussed in this study.



## I. INTRODUCCIÓN

Algunas especies del género *Vibrio* se han caracterizado como patógenos propios del agua y especialmente de ambientes marinos, encontrándose comúnmente en especies para el consumo humano. De entre las diferentes especies, *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, son los que más frecuentemente se encuentran implicadas en brotes de intoxicaciones alimentarias asociadas a la ingestión de productos marinos (FDA 2000, ESR 2003).

La presencia de *V. parahaemolyticus* en agua de mar esta fuertemente influenciada por las condiciones ambientales, habiendo una interacción ambiente-densidad. Entre los factores que determinan esta interacción se encuentran la temperatura (patrones Niño y Niña), salinidad, zooplancton, luminosidad, concentración de nutrientes, fitoplancton, flujo de mareas y oxígeno disuelto; dichos factores afectan su establecimiento, sobrevivencia y crecimiento (FDA 2000 y Hernández *et al.* 2005). *V. parahaemolyticus*, por estar en suspensión en el agua de mar, se concentra en moluscos filtradores bivalvos y también se ha encontrado contaminando camarones, carne de cangrejo y de jaiba y ocasionalmente carne de pescado (Hernández *et al.* 2005). Hay otros factores también que pueden afectar como lo son la presencia de químicos en el ambiente, especie infectada y fisiología de la misma (madurez sexual, función inmune, estado metabólico, etc.) (FDA 2000 y ESR 2003).





Otros aspectos que deben ser considerarse es que *V. parahaemolyticus* puede “hibernar” en el sedimento, estando ausente en la columna del agua; debido a que bajo condiciones ambientales extremas, algunas especies de *Vibrio*, pueden entrar a una “fase viable pero no cultivable (VBNC), siendo subestimados por métodos tradicionales de cultivo (FDA 2000 y ESR 2003). Hay evidencias de que eventualmente las cepas de *V. parahaemolyticus* patógenas aisladas del ambiente acuático pueden tener como reservorio sedimentos y la capa quitinosa de copépodos, lo que contribuye a la distribución y ciclo anual de la bacteria (Pereira *et al.* 2004).

*V. parahaemolyticus* puede ser diferenciada de otras especies por codificar para la producción de la hemolisina termolabil (TLH) considerada como marcador molecular para dicha especie (Taniguchi *et al.* 1986). Los mayoría de aislados clínicos de *V. parahaemolyticus* poseen genes que pueden codificar para la producción de la hemolisina directa termoestable (TDH, fenómeno Kanagawa +) y/o la hemolisina relacionada a TDH (TRH) con una similitud del 60% con la TDH (Akito *et al.* 1991), dichos genes son encontrados en un 2% de aislados ambientales (Ansaruzzaman *et al.* 2005) y ambas son consideradas factores de virulencia (ESR 2003, BAM 2004 y Pereira *et al.* 2004). Estudios recientes indican que las cepas Kanagawa negativas pueden ser capaces de provocar infección gastroenterítica en humanos, indicando la posibilidad de la existencia de más de un factor de virulencia además de la presencia de TDH y TRH (Pereira *et al.* 2004).



Actualmente, las técnicas moleculares son usadas para detección y tipificación de microorganismos (Oliven y Ben 1999); el método comúnmente aceptado para la detección de *V. parahaemolyticus* en alimentos esta descrito en el FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM 2004), basado en la técnica de hibridación de colonias (colony hybridization). Otro método usado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección rápida y fácil de los genes que codifican la producción de dichas hemolisinas mostrando una alta sensibilidad y especificidad (FDA 2000 y BAM 2004).

Teniendo en cuenta, la importancia de este patógeno y su infectividad a través del consumo de alimentos procedentes del ambiente marino (bivalvos y crustáceos) y los recientes brotes en las costas de México, el presente trabajo pretende analizar la presencia y abundancia espacio-temporal de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras ambientales (agua, sedimento y camarón) en la laguna Huizache- Caimanero, Sinaloa, verificando su potencial toxigénico a través de la identificación de los genes que codifican para la hemolisina directa termoestable (TDH) y la hemolisina relacionada con TDH (TRH).



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *Vibrio parahaemolyticus.*

*Vibrio parahaemolyticus* es uno de los mayores agentes causantes de gastroenteritis por el consumo de mariscos crudos o mal cocidos (Makino *et al.* 2003), la enfermedad causada es usualmente de severidad media y de corta duración, sin embargo se han reportado varios casos que requieren hospitalización (Hernández *et al.* 2005). Los síntomas descritos incluyen diarrea acuosa, náusea, vómito, calambres abdominales, frecuentemente dolor de cabeza leve, fiebre, frío y raramente arritmia cardíaca (FDA 2000, Raimondi *et al.* 2000 y ESR 2003).

Las cepas de *V. parahaemolyticus* causantes de enfermedades son tradicionalmente asociadas a dos factores de virulencia, la hemolisina directa termoestable (TDH) y la hemolisina relacionada a TDH (TRH)(Chang *et al.* 1998). En adición a estos dos factores de virulencia, recientes análisis del genoma de cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* muestran la existencia de otros factores de virulencia (Chang *et al.* 1998, Makino *et al.* 2003, Meador *et al.* 2007).



### Genes de virulencia y marcadores específicos de *V. parahaemolyticus*.

El genoma de *V. parahaemolyticus* consiste en dos cromosomas circulares, con un contenido de 45.4% G+C cada uno y se han encontrado 11 copias de operones de rRNA, 10 localizados en el cromosoma 1 y uno en el cromosoma 2 (Makino *et al.* 2003).

En el cromosoma 1 se encuentran codificados la mayoría de los genes esenciales para el crecimiento y viabilidad, como lo son aquellos que codifican todas las proteínas ribosomales y un pequeño número de tRNA. Ejemplo de estos son los genes *dshA* y *thrS*, los cuales son esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Makino *et al.* 2003).

Sin embargo, varios genes involucrados en vías metabólicas esenciales están localizados sólo en el cromosoma 2, lo cual sugiere que este es también esencial para el crecimiento y la viabilidad de la célula. El cromosoma 2 contiene más genes relacionados con la regulación transcripcional y transporte de sustratos, que el cromosoma 1, encontrando genes que tienen un rol en la respuesta a cambios ambientales (Makino *et al.* 2003).

Ejemplo de esto es que *V. parahaemolyticus* produce dos tipos de flagelos polares y laterales, los primeros son constitutivamente expresados y los segundos son inducidos por agregarse en superficies sólidas o ambientes viscosos. Los genes para la

biosíntesis de los flagelos polares se encuentran codificados en el cromosoma 1 y en el cromosoma 2 están codificados los genes para los flagelos laterales (McCarter 2006).

En el cromosoma 1 de *V. parahaemolyticus* se ha localizado un super-integrón, ya antes descrito en el cromosoma 2 de *V. cholerae*, difiriendo substancialmente entre los dos vibrios pero compartiendo similitud en los dos genes *relB*, codificando la antitoxina de el sistema toxina-antitoxina RelE-RelB y el gen de la acetyl-transferasa posiblemente involucrada en la resistencia a antibióticos (Makino *et al.* 2003, Tetsuya y Kurokawa 2006).

En el cromosoma 2 se encuentra localizada una isla de patogenicidad, en la cual se encuentran embebidas la hemolisina directa termoestable (TDH), genes relacionados con virulencia y un set de casetes para el sistema de secreción tipo III (T3SS)(Makino *et al.* 2003, Tetsuya y Kurokawa 2006). El análisis del genoma de *V. parahaemolyticus* cepa RIMD2210633 (KP+, serotipo O3:K6, grupo pandémico) sugiere que factores de virulencia del sistema de secreción tipo III juegan un rol en la manifestación de la enfermedad (Meador *et al.* 2007).

Los genes relacionados con virulencia localizados en esta isla de patogenicidad son homólogos a el factor necrosante citotoxina de *Escherichia coli*, la Exoenzima T de *Pseudomonas*, un gen presente en la isla de patogenicidad de *V. cholerae* y un gen designado como VPA1357, que codifica una proteína de membrana (Makino *et al.* 2003).

El T3SS del cromosoma 2 codifica estructuras que son empleadas para inyectar proteínas bacterianas directamente dentro de las células de su hospedero (Makino *et al.* 2003). Estudios recientes sugieren que la presencia de T3SS esta relacionada con la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*, ya que se ha encontrado en cepas *tdh+*, *trh-* y *orf 8 +* (Meador *et al.* 2007). En el cromosoma 1 se encuentra otro set de genes T3SS el cual se cree codifica proteínas efectoras del T3SS del cromosoma 2 (Makino *et al.* 2003).

Además de los cromosomas, Nasu *et al.* (2000) menciona que en las cepas pandémicas del serotipo O3:K6 poseen un plásmido en común denominado pO3:K6, el cual tiene 10 marcos de lectura abierta (con siglas en ingles ORFs) y que es una forma replicativa del fago f237. De los marcos de lectura que posee, ORF8 es considerado como marcador específico de cepas pandémicas O3:K6, debido a que no muestra homología con ninguna secuencia registrada en base de datos y solamente es detectada en aislados pertenecientes a este grupo.

Los ORFs de pO3:K6 muestran similitud con secuencias de otros fagos presentes en especies de vibrios. ORF1 es similar a ORF166 y ORF208 del fago filamentosos *fs1* presente en *V. cholerae* O139, y a *RstA1* y *RstA2* de *V. cholerae* CTX, las cuales son necesarias para la replicación e integración del fago dentro de el cromosoma hospedero. ORF 2 es homólogo a la secuencia de Vpf117 de V133 y ORF112 de *fs1*, los cuales son homólogos con *RstB* del fago CTX, necesario para que se integre al cromosoma de *V. cholerae*. ORF 4 es homólogo con el gen 8, una proteína de cubierta del fago PFI de *Pseudomonas aeruginosa*. ORF 5 es homólogo a Vpf491, V133 y ORF193 de *fs1*, que



son proteínas estructurales del fago. ORF 7 muestra homología con los productos de ORF424 de Pfl y la toxina *zonula occludens* (Zot) del fago CTX de *V. cholerae*. ORF9 y ORF10 no muestran homologías significantes con alguna proteína.

### Actividad de los factores patogénicos de *Vibrio parahaemolyticus*.

La hemolisina conocida como TDH, es considerada como el principal factor patogénico envuelto en los desordenes gastrointestinales y, adicional a esta, el rol epidemiológico atribuido a la TRH (Raimondi *et al.* 2000). La TDH es el factor patogénico más extensamente investigado debido a que un alto porcentaje de aislados clínicos codifican para dicha hemolisina y sólo del 1-2% de aislados no clínicos resultan positivos a ésta (Fabbri *et al.* 1999). Ambas hemolisinas (TDH y TRH) muestran varias propiedades biológicas comunes, como actividad hemolítica, enterotoxigenidad y citotoxicidad (Park *et al.* 2004).

Los efectos producidos por la TDH según lo mencionado por Fabbri *et al.* (1999), es una toxina formadora de poro, causante de lisis osmótica coloidal de eritrocitos en diferentes especies de mamíferos, es citotóxica en membranas de células amnióticas humanas (células FL) presentándose una baja viabilidad y cambios morfológicos (desaparición de microvelocidades de la superficie celular, degeneración del citoplasma y desintegración de núcleos).



En el estudio realizado por Fabbri *et al.* (1999) se examinaron los cambios celulares inducidos por la TDH en células IEC-6 derivadas del intestino delgado de ratón, encontrándose que la TDH induce el incremento del tránsito intracelular de calcio y un decremento (reversible) en la tasa del ciclo celular.

Park *et al.* (2004) generaron cepas mutantes de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633, eliminando el gen *tdh*, con la finalidad de examinar la actividad hemolítica (probada en LB agar, 5% sangre de conejo), citotóxica (probada en células HeLa) y enterotóxica (medida en la acumulación de fluidos en intestino de conejo) de éstas, evaluando la contribución de TDH a estas actividades. Sus resultados indican que la citotoxicidad y enterotoxicidad de *V. parahaemolyticus* no es explicada por la producción de TDH y sugiere que un factor o factores de virulencia desconocidos podrían estar involucrados en esta actividad patogénica. Lynch *et al.* (2005) menciona que la TRH también puede producir lisis de eritrocitos y acumulación de fluidos en el modelo con intestino de conejo.

Makino *et al.* (2003) menciona que el gen relacionado con virulencia designado como VPA1357 localizado en la isla de patogenicidad (cromosoma 2) codifica una proteína de membrana, la cual está posiblemente relacionada en la evasión inmune y/o en la adhesión a células del hospedero.

El T3SS se ha identificado en factor de virulencia presente en bacterias patógenas, según lo mencionan Makino *et al.* (2003), como por ejemplo *Shigella* y



*Salmonella*, las cuales causan diarrea inflamatoria en humanos debido a este factor de virulencia. El T3SS también ha sido identificada en aislados de *V. parahaemolyticus* O3:K6 (Makino *et al.* 2003) y recientemente en aislados no toxigénicos de *V. parahaemolyticus* (tdh-, trh-) causando enfermedad, lo que sugiere que este factor de virulencia contribuye al proceso de infección y al desarrollo de la enfermedad en humanos (Meador *et al.* 2007).

Nasu *et al.* (2000) especulan que las características que presenta la secuencia ORF8 (una secuencia RGD en la región N-terminal, un zipper de leucina en la región C-terminal y un camino hidrofóbico entre ellos), la hace similar a una proteína encontrada en el gen *plx* de *Drosophila*, el cual codifica para una molécula de adhesión; si en ORF8 esta secuencia codifica una proteína con función adhesiva similar, las cepas O3:K6 podrían ser más adhesivas en el intestino del hospedero, por lo cual tienen mas potencial patogénico.



### Brotos Epidémicos de *V. parahaemolyticus* En El Mundo.

La presencia de cepas *V. parahaemolyticus* toxigénicas y pandémicas se han registrado a lo largo de las Costas de los EU, India, Japón, España, Francia y Nueva Zelanda, realizándose estudios referentes a caracterización, cuantificación y tipificación; tanto de tipos patógenos y del serotipo pandémico O3:K6, por métodos convencionales y técnicas moleculares (FDA 2000 y ESR 2000).

Las cepas de *V. parahaemolyticus* fueron identificadas por primera vez en Japón en 1950, en un caso esporádico de envenenamiento (FDA, 2000) y a partir de esta fecha fue asociado con casos esporádicos o pequeños brotes de gastroenteritis (DePaola *et al.* 2003). Para los años 70 fue reconocido como causa de enfermedad gastroenterítica alrededor de todo el mundo (ERS 2000) y en la actualidad es frecuentemente aislado en aguas costeras y mariscos en zonas cálidas principalmente (BAM 2004).

Se ha demostrado que los aislados pertenecientes a *V. parahaemolyticus* forman un multi-serogrupo, el cual posee mas de 75 combinaciones de O y K serotipos (Bhuiyan *et al.* 2002). Deepanjali *et al.* (2005) menciona que recientemente la incidencia de infecciones por *V. parahaemolyticus* se ha incrementado en varias partes del mundo y ésta ha sido atribuida a la emergencia de un nuevo serotipo O3:K6 el cual lleva sólo el gen *tdh*.



Hacia los años de 1979-1995 el serotipo O4:K12 fue el de mayor prevalencia en los aislados clínicos aislados desde la costa pacífico de Estados Unidos, recientemente los serotipos O3:K6, O4:K68 y O1:Kuk, fueron responsables de una infección pandémica de *V. parahaemolyticus* (Martínez-Urtarza *et al.* 2004). Un nuevo clon del serotipo O3:K6 surge en la India en 1996 y rápidamente se esparce por las costas de Asia y Estados Unidos (FDA 2000, Martínez-Urtarza *et al.* 2004) y actualmente se ha diseminado en cuatro continentes: Asia, América, África y Europa (Balakrish y Hormazábal, 2005).

En 1989 se registró un brote en España asociado con el consumo de pescado y mariscos mal cocidos (Martínez-Urtarza *et al.* 2004). En 1998 *V. parahaemolyticus* O3:K6 causa un gran brote epidémico en Estados Unidos, el cual fue asociado con el consumo de ostiones crudos de Galveston, Texas. Recientes aislados de *V. parahaemolyticus* O4:K68 y O1:Kuk, desde las costas de Asia son reportados como estrechamente relacionados con el grupo del clon pandémico O3:K6, y por lo tanto estos serotipos pueden ser potencialmente causantes de brotes epidémicos (FDA 2000).



### Brotos Epidémicos En La República Mexicana.

En particular en la república Mexicana, según lo mencionado por Franco-Monsreal *et al.* (1991), desde 1983 se han realizado estudios referentes a aislamiento y búsqueda de anticuerpos de *Vibrio parahaemolyticus* en los estados de Puebla, Guerrero y Yucatán.

El primer brote de gastroenteritis causado por *Vibrio parahaemolyticus* se registró en abril del 2000, presentándose 162 casos en el poblado de la Pesca a 170 Km al este de Ciudad Victoria, Tamaulipas (Guerra-Barragán, 2002). Se realizaron estudios para determinar la incidencia y los meses de mayor presencia de este patógeno, por medio de identificación bioquímica, pero no se llevaron a cabo estudios para la enumeración, identificación y cuantificación de la presencia de hemolisinas.

En el estudio realizado por Guerra-Barragán (2002) se analizaron muestras de productos del mar (camarón, ostión, pescado, pulpo jaiba, etc.), así como muestras de pacientes que presentaban cuadro agudo de intoxicación alimenticia (gastroenteritis, vómito con deshidratación grave) que se recibieron en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tamaulipas (LESPT) en el período comprendido de enero de 2000 a abril del 2002. En estos productos se determinó la presencia de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, realizando las técnicas y procedimientos adaptados,



según la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993 para la investigación de *V. cholerae*.

El primer reporte de la presencia de fenómeno Kanawa positivo y TDH-positivo de cepas *V. parahaemolyticus* ambientales es mencionado por Cabrera-García *et al.* (2004). Las cepas fueron aisladas de muestras de agua, pescado y ostiones, obtenidas de la Laguna Pueblo Viejo en Veracruz, determinando serogrupos, caracterización fenotípica y genotípica para TDH y TRH, investigando la presencia de Tox R. En este estudio los meses de mayor presencia de *V. parahaemolyticus* fueron Febrero a Marzo y el serogrupo más abundante fue O3.

El caso más reciente de gastroenteritis por *V. parahemolyticus* se registró en el 2004 por Cabanillas-Beltrán *et al.* (2006), en las Costas Sur del estado de Sinaloa; se presentaron al menos 1225 casos clínicos los cuales fueron asociados al consumo de camarón crudo o mal cocido colectado en el sistema lagunar Huizache-Caimanero, Sinaloa. Los síntomas clínicos que presentaron fueron diarrea acuosa, calambres abdominales, dolor de cabeza y náuseas. Los aislados de *V. parahaemolyticus* fueron identificados por métodos bioquímicos tradicionales, técnicas moleculares (presencia del gen *tlh* y marcadores moleculares para la especie) y por genotipificación por medio de rep-PCR. Se obtuvieron un total de 104 aislados de los años 2003 (1) y 2004 (103) de muestras de heces de humanos, camarón, agua y sedimento.



Del total de los aislados *tlh+*, sólo un 78% fueron *tdh* positivos pero *trh* negativos. Todos los aislados de heces de humanos fueron *tlh+*, *tdh+* y *trh-*, un aislado de agua y otros dos más de camarón fueron *tlh+*, *tdh+* y *trh-*, y dos más de camarón *tlh+*, *tdh+* y *trh+*. La comparación de patrones por rep-PCR mostró que los aislados obtenidos de heces de humanos tienen un patrón idéntico al de la cepa pandémica O3:K6 y el resto de los aislados forman otros grupos con patrones diferentes a éste. La ausencia del gen *trh*, presencia de ORF 8 y un patrón idéntico al de las cepas pandémicas y serotipo O3:K6, indica que este brote fue ocasionado por la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*.

Recientemente en el 2006 se registró la presencia de cepas toxigénicas de *V. parahaemolyticus* en las costas norte del estado de Sinaloa, estas cepas actualmente están siendo caracterizadas en el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo en la Unidad Mazatlán.



### Prevalencia de *V. parahaemolyticus*.

Se han realizado pocos estudios sobre la prevalencia de *V. parahaemolyticus*, a partir de 1982, los cuales están generalmente enfocados a regiones geográficas o estaciones del año específicas, y pocos tienen reportados datos cuantitativos (FDA, 2000). En estos estudios se ha encontrado que *V. parahaemolyticus* es frecuentemente detectable en verano, pero durante los meses de invierno son poco comunes, por la posible ocurrencia de un estado Viable pero No Cultivable (VNC) (FDA 2000, Urakawa y Rivera 2006). Sin embargo, Kaneko y Colwell (1975) mencionan que las VNC pueden permanecer potencialmente patogénicas.

La ecología de *V. parahaemolyticus* presente en muestras ambientales y de alimentos no es ampliamente conocida, ya que las condiciones ambientales imponen una variedad de factores estresantes a las bacterias, las cuales en respuesta desarrollan diferentes estrategias de sobrevivencia; por lo cual la incidencia de esta especie en el ambiente acuático es dependiente de muchos cofactores (Alam *et al.* 2003).

En cuanto a su distribución y abundancia, Urakawa y Rivera (2006) mencionan que en general las bacterias en el ecosistema acuático son influenciadas por factores abióticos como la temperatura, salinidad, distribución de nutrientes, oxígeno, flujo de mareas, etc., y bióticos como competencia con otras bacterias, presencia de zooplancton, pastoreo por protozoarios e infección por virus.



La interacción existente ambiente-densidad, mencionada por la FDA (2000) y Hernández *et al.* (2005) y Urakawa y Rivera (2006), ha sido demostrada en varios trabajos, en los cuales se monitorea la salinidad y temperatura, teniendo a este último como el factor regulador de la densidad y estacionalidad de *V. parahaemolyticus*.

Los mejores datos disponibles en la relación de densidad de *V. parahaemolyticus* total en muestras de ostiones y columna de agua, están en el estudio realizado por DePaola *et al.* (1990), observando una estacionalidad de la densidad hacia verano y mayor presencia en muestras de organismos. En cuanto a los factores ambientales se encontró que la presencia de *V. parahaemolyticus* muestra una mejor correlación con la temperatura que con la salinidad.

La FDA realizó un cálculo de riesgo en el 2000 usando los datos generados por DePaola *et al.* (1990) coincidiendo con lo encontrado por el autor, existe un efecto lineal de la temperatura sobre la densidad de *V. parahaemolyticus* y un efecto cuadrático de la salinidad. Coincidiendo con lo anterior, DePaola *et al.* (2003) encontró una estacionalidad de *V. parahaemolyticus* total y patógeno, la cual esta asociada significativamente con la temperatura ( $r= 0.51$ ) y salinidad; mencionando el hecho de que en algunas ocasiones los niveles de *V. parahaemolyticus* varían independientemente de la temperatura, debido a la condición fisiológica de los ostiones.

Hay registros de que la temperatura no sólo afecta la densidad de *V. parahaemolyticus* sino también la diversidad de las poblaciones existentes de vibrios.





Maeda *et al.* (2003), encontraron un cambio estacional de las poblaciones de *Vibrio* en Bahía Yoshimi, Japón, mencionado que las poblaciones aumentan con la temperatura, la cual tiene influencia sobre las UFC y la composición taxonómica; concluyendo que el grupo de *V. parahaemolyticus* y especies relacionadas es dominante a temperaturas mayores de 20°C; y *V. splendidus* y *V. lentus* son mas abundantes cuando la temperatura es menor o igual a 20°C en agua y sedimento.

Kaneko y Colwell (1975) mencionan que la incidencia de *V. parahaemolyticus* y especies relacionadas, está correlacionada con la temperatura, sugiriendo que los vibrios podrían no ser detectados en la columna de agua durante invierno pero si en el sedimento. A finales de primavera e inicio de verano, con temperaturas de 14°C, los vibrios no son detectados en el sedimento y aparecen proliferando en la superficie del zooplancton y en la columna de agua. Urakawa y Rivera (2006) mencionan que las especies de *Vibrio* son las bacterias más abundantes en la asociación con zooplancton y que estas bacterias no son usualmente abundantes en sedimento

Bhuiyan *et al.* (2002), realizaron un estudio de prevalencia de genotipos pandémicos en aislados clínicos de enero del 1998 a diciembre del 2000 en Dhaka, Bangladesh; encontrando 14 serotipos y diferencias en el grupo dominante para los años de estudio, O4:K68 en 1998 (52.2%), O3:K6 en 1999 (78.3%) y en el 2000 (30%), sugiriendo que estos cambios en los genotipos están asociados a un incremento en adecuación evolutiva.



### III. HIPOTESIS.

La densidad de *Vibrio parahaemolyticus* y la presencia de cepas toxigénicas en el complejo lagunar Huizache-Caimanero, presentan una variación espacio-temporal influenciada por la relación existente con factores ambientales abióticos y bióticos.



## V. MATERIALES Y METODOS.

### Área de Estudio.

El complejo lagunar Huízache-Caimanero tiene una superficie aproximada de 17,100 Ha, se encuentra situado en la planicie costera del Sur del Estado de Sinaloa, México, entre los 22° 50' y 23° 05' latitud norte y los 105° 55' y 106° 20' longitud oeste. Recibe los aportes fluviales del río Presidio localizado al noroeste y el río Baluarte al sureste (Amescua, 1977).

Son lagunas costeras de aguas someras y de nivel muy variable de acuerdo a las estaciones del año; su nivel máximo ocurre en la temporada de lluvias (junio a septiembre) cuando en las regiones centrales existe una profundidad máxima de 2 m, mientras que en la temporada de secas el nivel es muy bajo y la extensión muy reducida quedando la mayor parte del embalse totalmente descubierto. Esto se debe a que las lagunas se están azolvando rápidamente con sedimentos acarreados por los ríos, provenientes de zonas altas como resultado de un proceso geológico natural (Amescua, 1977).

### Trabajo de Campo.

Se asistió a la laguna Huízache-Caimanero en la tercera semana de cada mes durante un periodo anual iniciando en Mayo del 2006, estableciéndose 10 estaciones de

muestreo buscando cubrir la mayor parte de la zona de estudio en donde se realiza extracción de productos pesqueros (Fig. 1 y Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo en la Laguna Huizache-El Caimanero.

Estación	Sitio	Ubicación N	Ubicación W
1	El Ostial	23°05'22"	106°15'14"
2	Las Garzas	23°05'01"	106°13'29"
3	Los Candelones	23°03'37.1"	106°13'23.6"
4	El Iguanito	23°03'12"	106°11'36"
5	Tapo Hacienda	23°00'41"	106°08'53"
6	La Guásima	22°56'38"	106°06'01"
7	Vena Quelele	22°53'56"	106°04'46"
8	Tapo Caimanero	22°56'03"	106°03'37"
9	El cuervo	22°54'36"	106°00'19"
10	Agua Dulce	22°51'17"	106°01'40"

En cada estación se tomaron muestras para análisis bacteriológico de agua (50 ml), sedimentos (3 ml) y camarones presentes. Se midieron los parámetros ambientales de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, turbidez y nutrientes (nitritos, nitratos, fosfatos). Las muestras se colocaron en una hielera con hielo empaquetado, para su posterior manejo en las instalaciones del Laboratorio de Bacteriología en CIAD-Unidad Mazatlán (muestras bacteriológicas) y en el Laboratorio de Química Acuática del CRIP-Mazatlán.

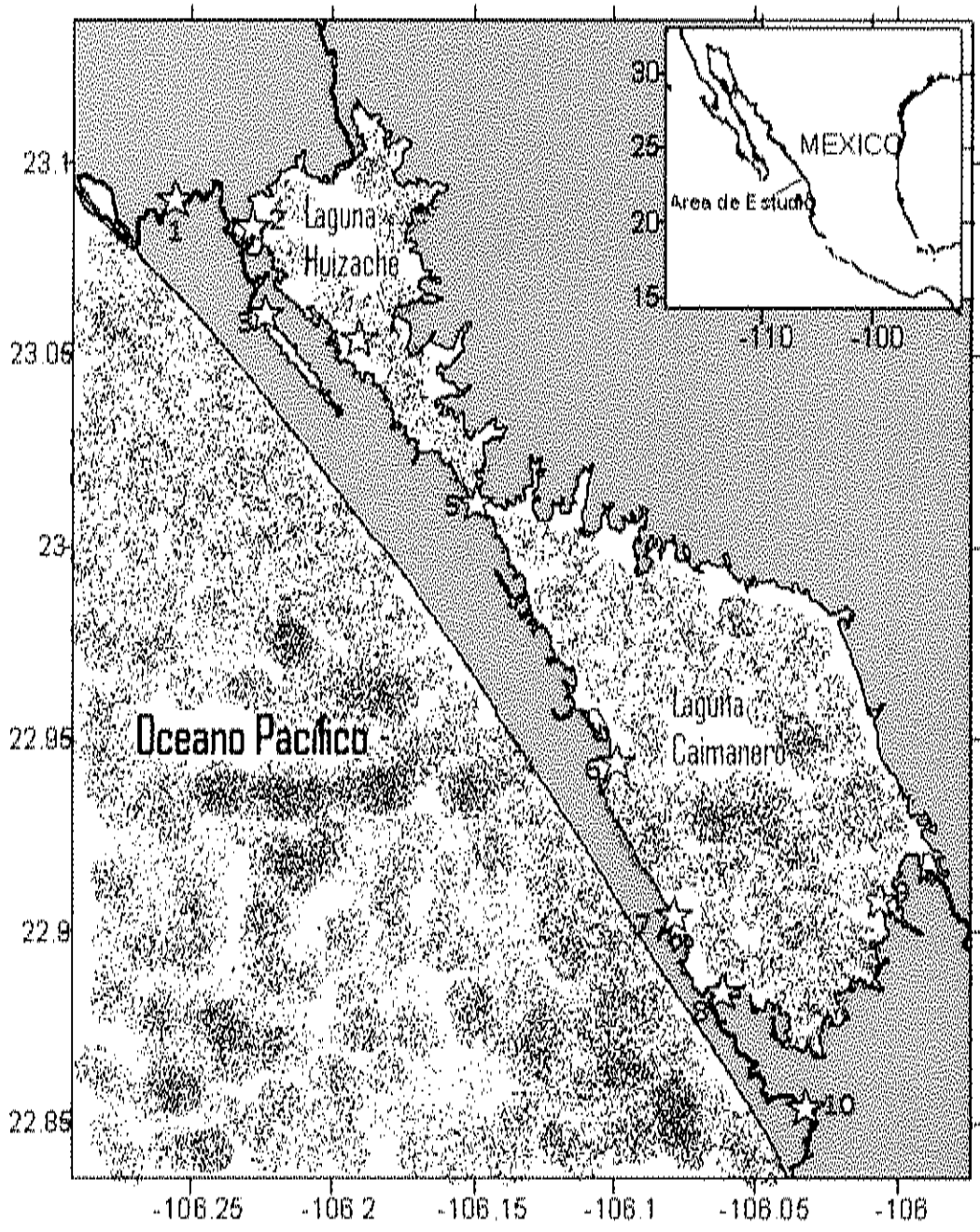


Figura 1. Ubicación de Sistema Lagunar Huizache- El Caimanero. Se señalan las estaciones de muestreo. 1. El Ostial, 2.Las Garzas, 3.Los Candelones, 4.El Iguanito, 5.Tapo Hacienda, 6.La Guasima, 7.Vena Quelele, 8.Tapo Caimanero, 9.El Cuervo y 10.Estero Agua Dulce.



### Trabajo de Laboratorio.

#### **Objetivo 1: Conteo de Bacterias Heterótrofas totales y Vibrios Totales.**

El conteo de bacterias heterótrofas totales y vibrios totales se realizó por medio de Conteo Total Viable, por gramo o mililitro de muestra. Las muestras fueron 1ml de agua, 1gr de sedimento y 1gr de músculo de organismo homogeneizado, realizándose diluciones seriadas en solución salina 2.5%. Posteriormente de cada dilución se sembraron alícuotas de 100 µl por esparcimiento en placas de TCBS y agar marino incubándose a 30°C. Se realizó el conteo de las UFC presentes a las 24 y 48 hrs de incubación.

#### **Objetivos 2 y 3: Determinar la presencia de *V. parahaemolyticus* total, toxigénico y clon pandémico O3:K6.**

Las muestras se procesaron conforme a la metodología descrita en el manual de la FDA Bacteriological Analysis Microbiological (BAM, 2004) y Alam *et al.* (2003); y que se describe brevemente a continuación.

Una vez en el laboratorio, las muestras (1 gr de músculo, 1 ml de agua y 1 gr de sedimento) se inocularon en Agua Peptonada Alcalina (APW), para su enriquecimiento realizándose diluciones seriadas e incubándose durante 24 hrs a 30 °C. De cada tubo se tomó 1 ml y se centrifugó por 5 min a 13000 RPM; el pellet se resuspendió en buffer de

lisis y se extrajo el ADN por medio del calentamiento durante 5 min a 90 °C. Una vez el ADN extraído se realizó un PCR-multiplex para la detección de los genes *tth*, *tdh* y *trh* (Tabla 2 y Tabla 3), utilizando como control positivo *V. parahaemolyticus* CAIM 1773, realizándose un gel de electroforesis bajo las siguientes condiciones, 1.5% agarosa, 90V y 150 ma (Fig. 3a).

Los tubos que dieron positivos para la PCR se sembraron por estria en TCBS y se eligieron las colonias que presentaban las características para que se les considerara potencialmente *V. parahaemolyticus* (colonias color verde olivo con el centro un poco mas oscuro, de borde liso y redondas). A dichas colonias se les extrajo el ADN por medio del calentamiento durante 5 min en buffer de lisis a 90 °C y se les realizó la técnica de PCR por separado para los genes *tth*, *tdh* y *trh* para su confirmación como aislados de *V. parahaemolyticus*. Los aislados positivos a *tdh* se les realizó PCR para la detección de *orf-8*; usando como control positivo CAIM 729 (Tabla 2 y Tabla 3) realizándose un gel de electroforesis bajo las condiciones ya mencionadas (Fig. 3b).

Tabla 2. Fragmentos amplificados para la detección rápida de *V. parahaemolyticus* total (*tlh*), toxigénico (*tdh*, *trh*) y pandémico (*orf* 8).

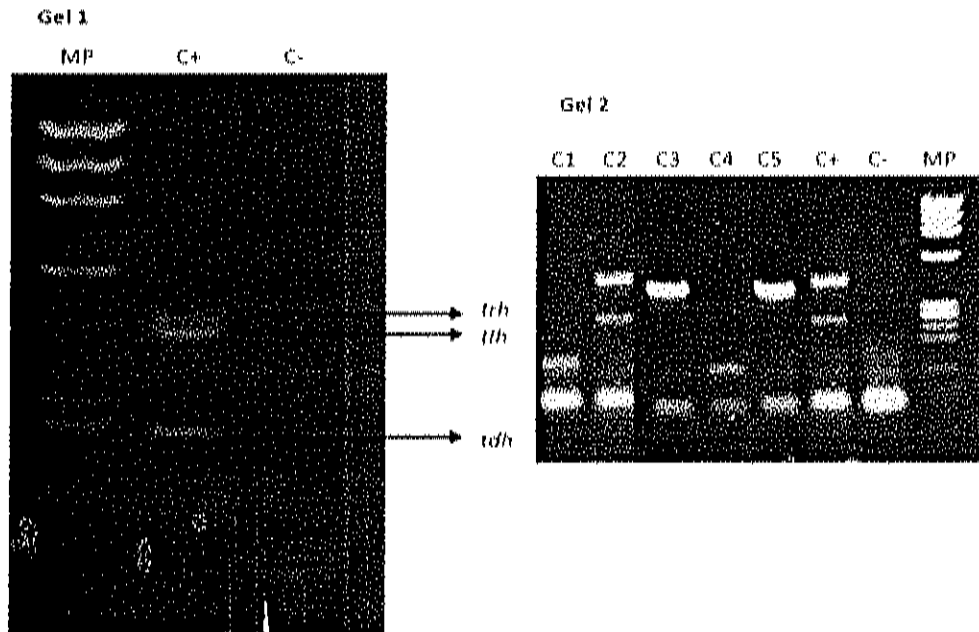
Gen	Proteína codificada	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
<i>Tlh</i>	Hemolisina termolábil (TLH)	AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	450
<i>tdh</i>	Hemolisina directa termoestable (TDH)	CCA TCT GTC CCT TTT CCT GCC CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC	270
<i>Trh</i>	Hemolisina relacionada con TDH (TRH)	TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G	500
<i>orf-8</i>	Open Reading Frame 8	CTAACGCATTGTCCCTTTGTAG AGGACGCAGTTACGCTTGATG	368

Tabla 3. Condiciones de termociclador para la realización de PCR. \* 35 ciclos

Fase	<i>tlh</i> y <i>trh</i>		<i>Tdh</i>		ORF 8	
	°C	Min	°C	min	°C	Min
Desnaturalización	94	3	94	3	94	3
Alineación	94	1*	94	1*	94	1*
Elongación	60	1*	58	1*	58	1*
	72	1*	72	1*	72	1*
Finalización	72	5	72	5	72	5



a)



b)

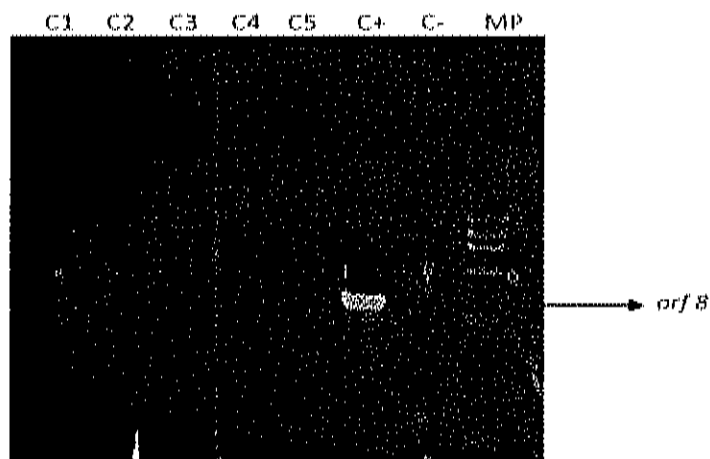


Figura 3. a) detección de la producción de las hemolisinas *tth*, *tdh* y *trh*; Gel 1: control positivo CAIM 1773 (C+), control negativo (C-) y marcador de peso molecular (MP,  $\Phi x$ ), Gel 2: en muestras ambientales, negativas (C1 y C4), *tth*+ (C2, C3 y C5) y *tdh*+ (C2). b) detección de *orf 8* en muestras ambientales de *Vibrio parahaemolyticus* (*tth*+, *tdh*+ y *trh*-)(C1 a C4); control positivo CAIM 729 (C+), control negativo (C-) y marcador de peso molecular (MP).



## Trabajo de Escritorio.

### **Análisis Estadístico.**

Los datos obtenidos fueron divididos en matrices para evaluar por una parte la variación temporal y por otra la variación espacial de la densidad de bacterias heterótrofas totales, vibrios totales y *Vibrio parahaemolyticus* en los diferentes sustratos, la cual fue estimada con los conteos viables de UFC por mililitro (agua) o gramo (sedimento y camarón). Dichas matrices se analizaron por medio de la prueba no paramétrica análisis de varianza bifactorial por rangos de Friedman a un  $\alpha=0.05$  y comparaciones múltiples entre grupos o condiciones para observar si existía diferencias en la variación espacial y/o temporal, siguiendo los criterios empleados por Sigel y Castellán (1995).

Una vez lo anterior, con las variables ambientales se realizó un análisis de componentes principales (APC) para establecer la correlación existente entre variables ambientales y la densidad de *V. parahaemolyticus*, estableciendo cual o cuales explica la mayor variación en esta. Los análisis de APC se realizaron con el programa Statistical 6.0.



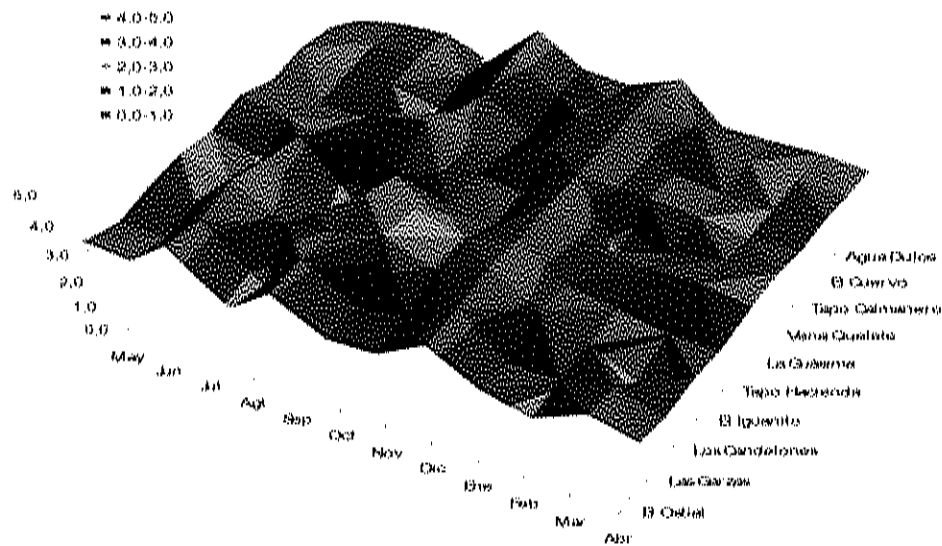
## VI. RESULTADOS.

### Objetivo 1. Estimar La Densidad Espacio-Temporal De Bacterias Heterótrofas Totales y Vibrios Totales En Agua, Sedimento y Camarón del Sistema Lagunar Huizache-Caimanero.

Los resultados obtenidos muestran que no hay evidencia estadística que sugieran una variación espacial ( $Zr= 31.6$ ;  $p\leq 0.05$ ) pero si una variación temporal en la densidad de bacterias heterótrofas presentes en la columna de agua ( $F= 33.94$ ,  $p\leq 0.05$ ; Fig. 3a). La densidad se mantiene en un intervalo de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  UFC/ml durante los meses de mayo del 2006 y de enero a abril del 2007 ( $Zr= 42.47$ ;  $p\leq 0.05$ ). Se observaron dos picos de alta densidad en el mes de julio y diciembre, alcanzando hasta  $6.5 \times 10^4$  UFC/ml (Fig. 3a).

La comunidad de vibrios, al igual que las bacterias heterótrofas, sólo presenta una variación temporal significativa ( $F= 30.4$ ,  $p\leq 0.05$ ; Fig. 3b), encontrando la mayor densidad en julio cercana a  $1 \times 10^3$  UFC/ml y disminuye en el mes de septiembre llegando a una densidad menor de  $1 \times 10^2$  UFC/ml. En los meses posteriores la densidad aumenta y se mantiene cercana a  $1 \times 10^3$  UFC/ml (Fig. 3b).

a)



b)

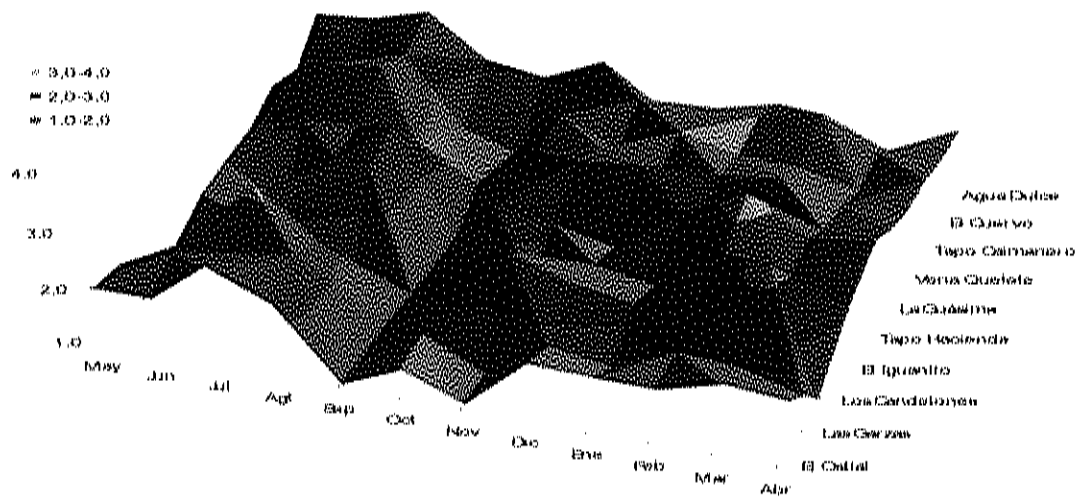
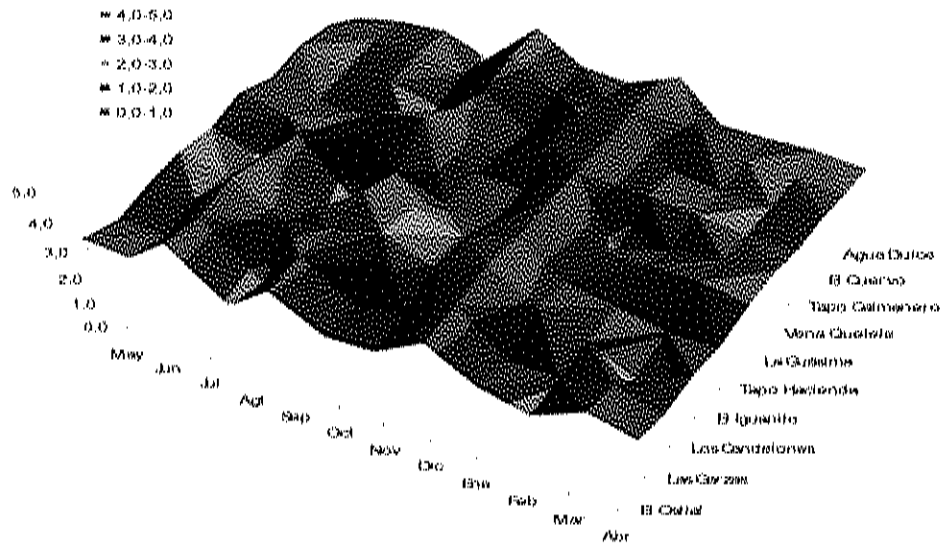


Fig 3. Variación espacio (eje Y)-temporal (eje X) de a) bacterias Heterótrofas totales y b) bacterias del genero *Vibrio* sin contar a *V. parahaemolyticus* en Log UFC/ml, presente en la columna de agua del complejo lagunar Huizache-Caimanero durante los meses de Mayo del 2006 a Abril del 2007.



a)



b)

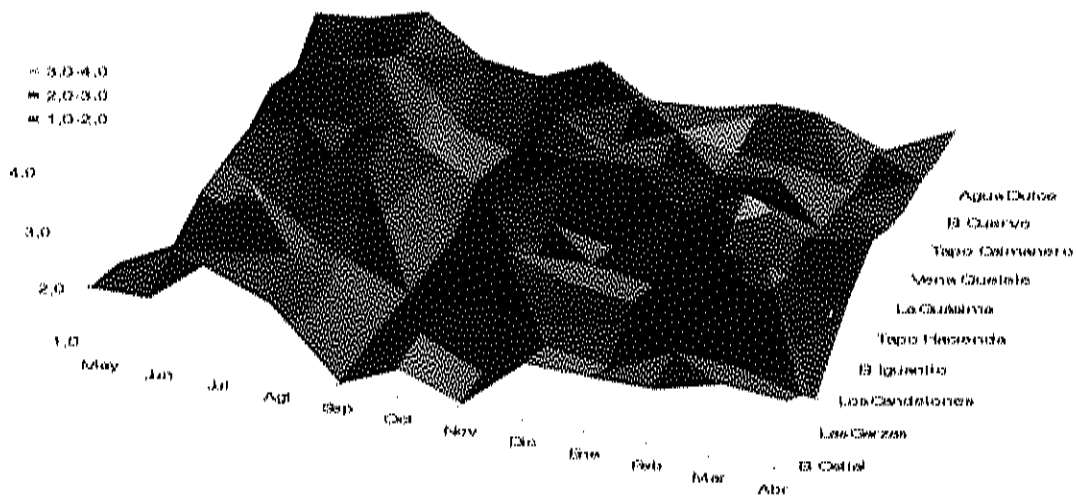
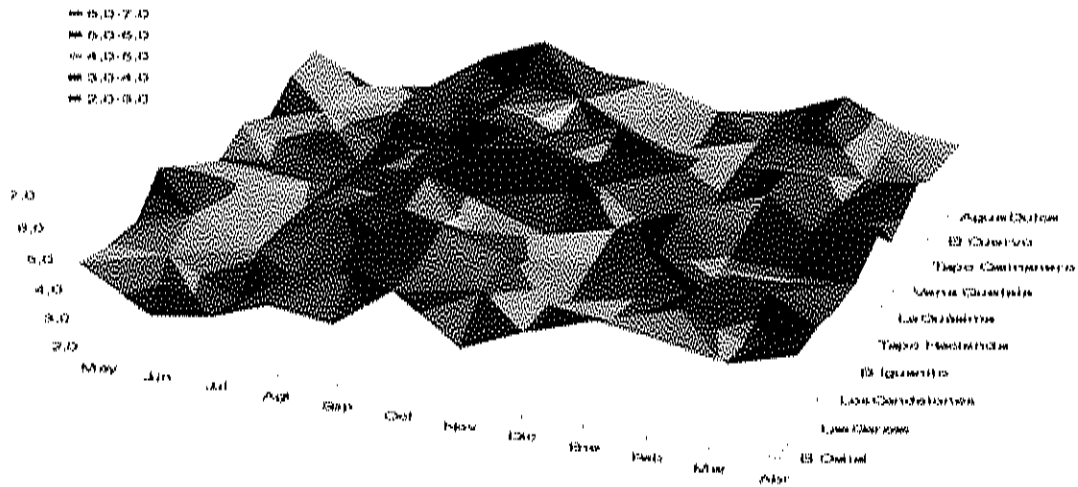


Fig 3. Variación espacio (eje Y)-temporal (eje X) de a) bacterias Heterótrofas totales y b) bacterias del género *Vibrio* sin contar a *V. parahaemolyticus* en Log UFC/ml, presente en la columna de agua del complejo lagunar Huizache-Caimanero durante los meses de Mayo del 2006 a Abril del 2007.



a)



b)

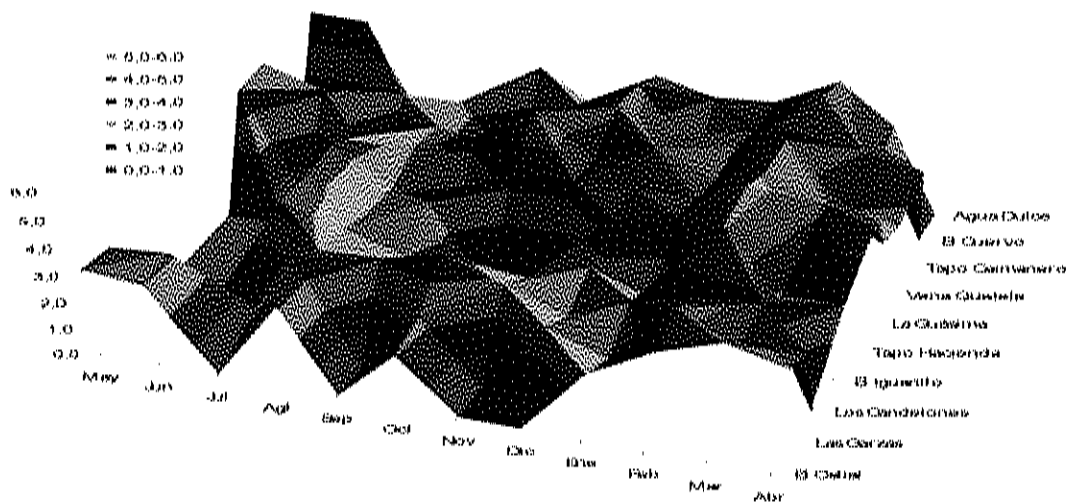
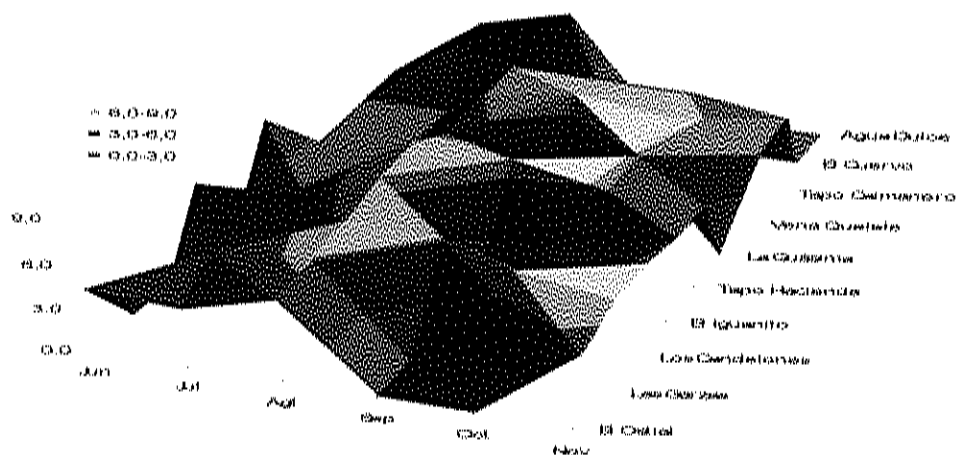


Figura 4. Variación espacio (eje Y)-temporal (eje X) de a) bacterias heterótrofas totales y b) bacterias del género *Vibrio* sin contar a *V. parahaemolyticus* en Log UFC/gr presente en sedimento del complejo lagunar Huizache-Caimanero durante los meses de Mayo del 2006 a Abril del 2007.

a)



b)

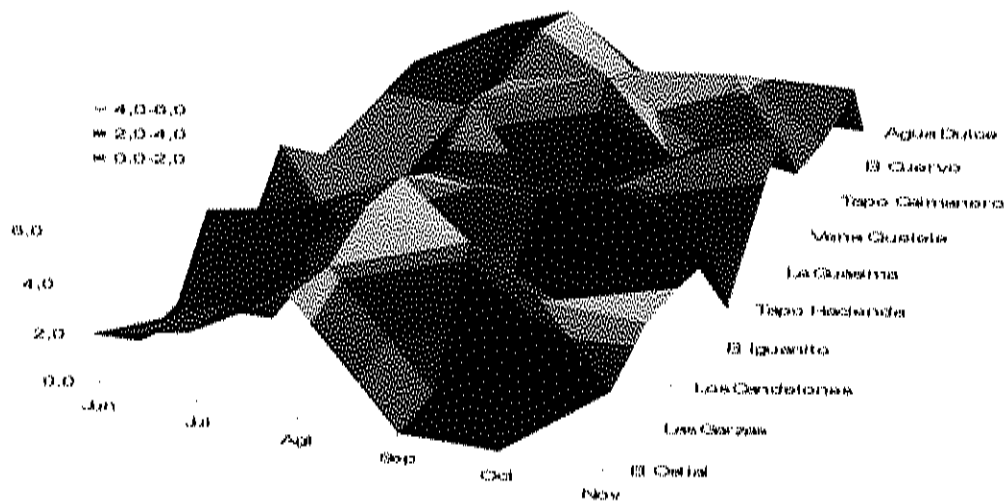


Figura 5. Variación espacio (eje Y)-temporal (eje X) de a) bacterias heterótrofas totales y del b) genero *Vibrio* sin contar a *V. parahaemolyticus* en Log UFC/gr presente en muestras de camarón procedentes del complejo lagunar Huizache-Caimanero durante los meses de Mayo del 2006 a Abril del 2007.



Al comparar los grupos de bacterias heterótrofas totales y vibrios totales en los sustratos se observó que muestran una correlación positiva fuerte las presentes en camarón ( $r= 0.88$ ) (Fig. 6 a, Tabla 4). Al comparar por grupo de bacterias se observó que las bacterias totales tanto heterótrofas como vibrios, presentes en agua y sedimento muestran una correlación mayor ( $r= 0.71$  y  $r= 0.64$ , respectivamente) que al comparar los otros sustratos (Fig. 6 b y c, Tabla 4).

Otro aspecto importante es que la presencia de *V. parahaemolyticus* esta correlacionada con los otros grupos de bacterias analizados y entre los sustratos (Fig. 10 y 11, Tabla 6). Se observó que *V. parahaemolyticus* en agua y camarón presenta mayor interacción con las bacterias heterótrofas totales presentes en camarón con un  $r= 0.58$  y  $r= 0.68$  respectivamente. Para *V. parahaemolyticus* en sedimento se observó que interactúa con las bacterias heterótrofas presentes en este mismo sustrato ( $r= 0.6$ ). La interacción de *V. parahaemolyticus* en los sustratos se observó de la siguiente manera, la densidad presente en agua interactúa con sedimento y camarón, con un  $r= 0.64$  y  $r= 0.085$  respectivamente y estos últimos no presentan una interacción evidente entre ellos.



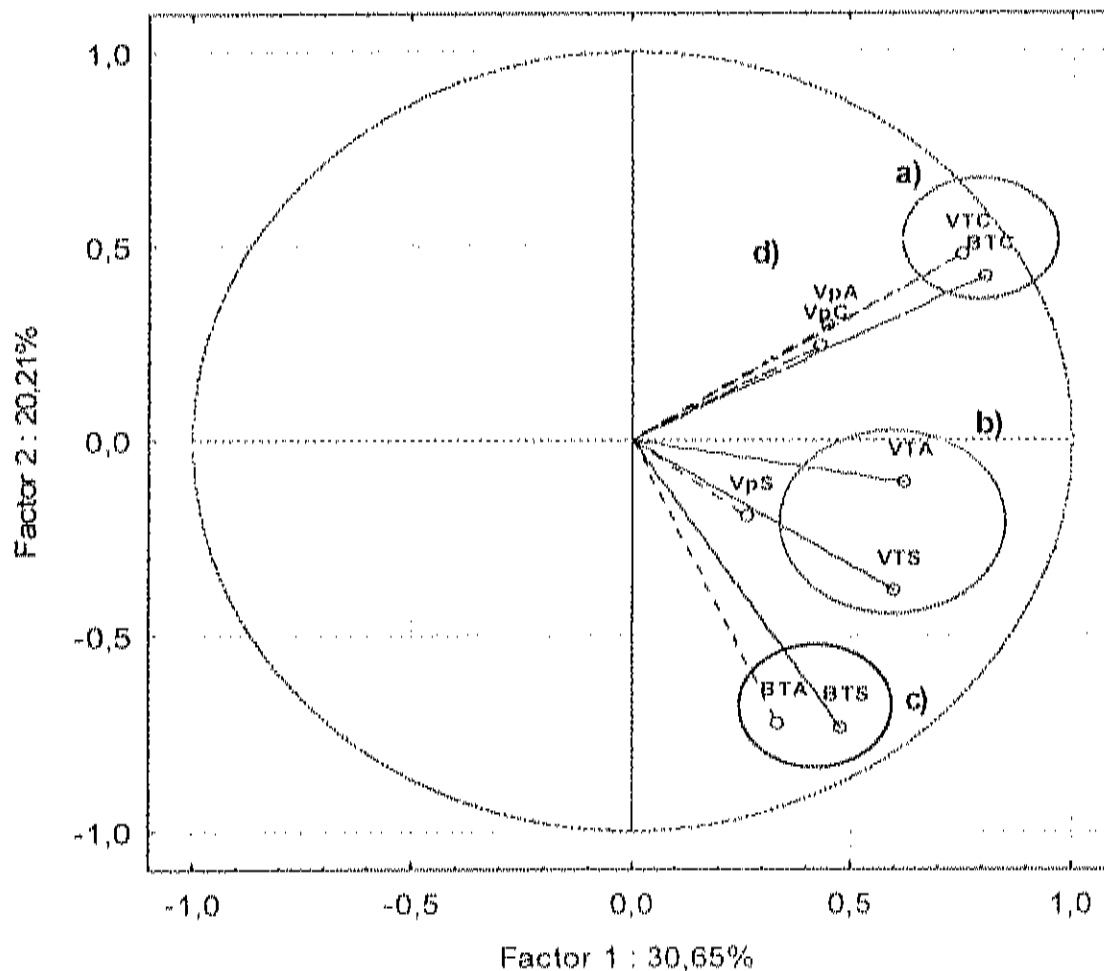


Figura 6. Análisis de componentes principales de la correlación encontrada para las comunidades bacterianas; bacterias heterótrofas totales de agua (BTA), sedimento (BTS), y camarón (BTC); Vibrios totales de agua (VTA), sedimento (VTS) y camarón (VTC).



Tabla 4. Resultados del Análisis de correlación de Spearman entre los diferentes grupos de bacterias por sustrato y grupo, mostrando el número de datos utilizados (N), el coeficiente de correlación obtenido (R), grados de libertad (g) a un nivel de significancia de 0.05.

		N	R	G
<b>Comparación entre sustratos</b>				
<b>Agua</b>	BHT v/s VT	115	0.18	2
<b>Sedimento</b>	BHT v/s VT	114	0.38	4
<b>Camarón</b>	BHT v/s VT	57	0.88	13
<b>comparación entre grupos de bacterias</b>				
<b>bacterias heterótrofas</b>	agua v/s sedimento	115	0.71	0.8
	agua v/s camarón	56	0.001	0.5
	sedimento v/s camarón	56	0.17	2
<b>vibrios</b>	agua v/s sedimento	114	0.54	4
	agua v/s camarón	57	0.27	0.08
	sedimento v/s camarón	58	0.20	1.6
<b><i>V. parahaemolyticus</i></b>	agua v/s sedimento	120	0.64	2
	agua v/s camarón	40	0.85	1
	sedimento v/s camarón	40	0.29	1

También se puede observar un gradiente de la densidad de bacterias (Fig. 7); observando que en agua y sedimento las bacterias heterótrofas alcanzan las mayores densidades, seguidas de los vibrios. En camarón se observó que las densidades son menores en comparación a los otros sustratos, las densidades de bacterias heterótrofas y vibrios son similares. Por medio del análisis de los meses de muestreo se puede observar que se forman tres grupos, de mayo a noviembre del 2006 (Fig. 8 a), diciembre (2006) y marzo (2007) (Fig. 8 b); enero y febrero del 2007 (Fig. 8 c), reafirmando la variación temporal ya mencionada.

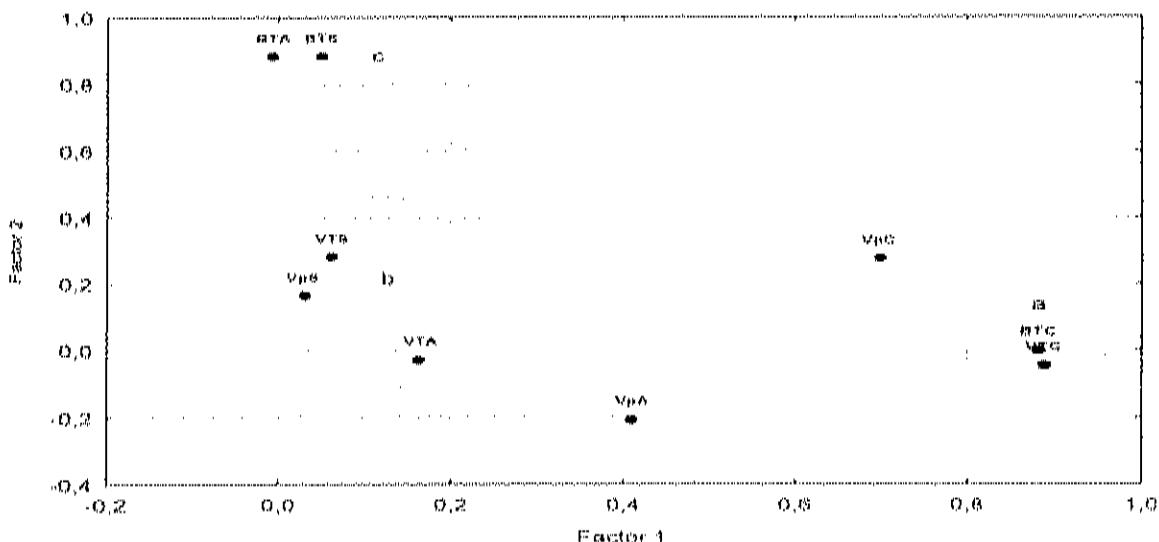


Figura 7. Análisis de factores (eigen analysis) a través de componentes principales rotado para buscar la máxima varianza normalizada con el objetivo de representar el gradiente de las abundancias para las comunidades bacterianas; bacterias heterótrofas totales de agua (BTA), sedimento (BTS), y camarón (BTC); Vibrios totales de agua (VTA), sedimento (VTS) y camarón (VTC).

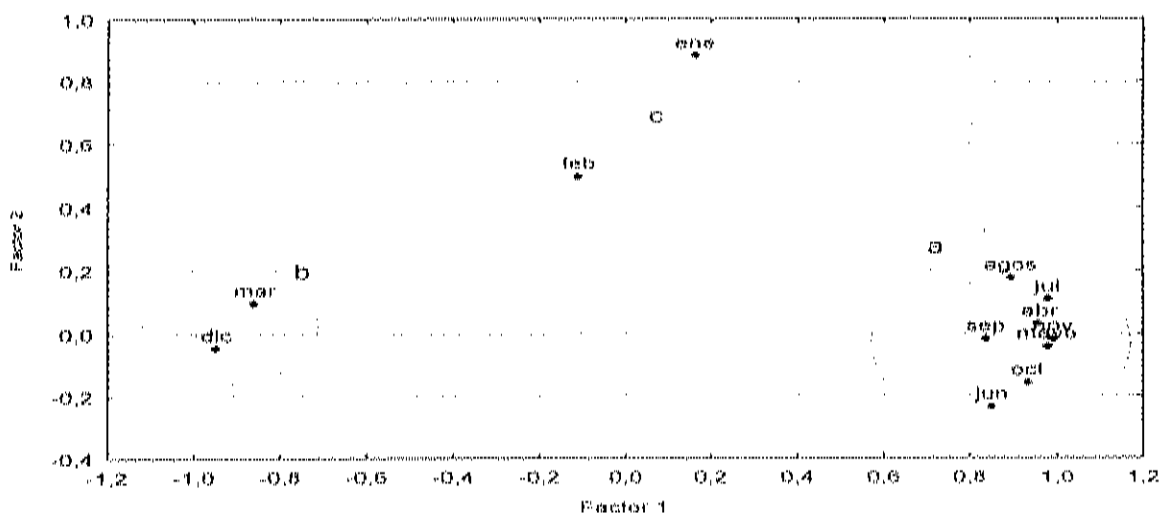


Figura 8. Análisis de factores (eigen analysis) a través de componentes principales rotado para buscar la máxima varianza normalizada con el objetivo de representar el gradiente de los meses de muestreo con respecto a las densidades encontradas.



Objetivo 2. Estimar La Densidad Espacio-Temporal De *V. parahaemolyticus* En Agua, Sedimento y Camarón Del Sistema Lagunar Huizache-Caimanero.

Se obtuvieron un total de 229 aislados de *V. parahaemolyticus* (*th +*) (Tabla 5); los meses de mayor presencia fueron noviembre (74), marzo (34), febrero (33), agosto (24) y diciembre (23). El mayor número se obtuvo de sedimento (117), seguido por camarón (58) y agua (54).

Hay evidencia estadística suficiente que sugiere una variación temporal ( $F=10.64$ ,  $p \leq 0.05$ ) y espacial ( $Zr=42.47$ ,  $p \leq 0.05$ ) de *V. parahaemolyticus* dentro de la laguna (Fig. 9 y Fig. 10). Los meses de muestreo de mayor densidad de *V. parahaemolyticus* dentro de la laguna fueron noviembre, febrero y septiembre con  $1.18 \times 10^3$  UFC,  $7 \times 10^2$  UFC y  $2 \times 10^2$  UFC totales respectivamente. Las estaciones de muestreo dentro de la laguna donde se observó la mayor densidad de *V. parahaemolyticus* fueron Los Candelones (E3) y Tapo Hacienda (E5) en la laguna Huizache con  $3.9 \times 10^3$  UFC y  $5.86 \times 10^2$  UFC totales; y Tapo Caimanero en la laguna Caimanero con  $6.17 \times 10^2$  UFC totales.

En sedimento es detectado por primera vez en julio del 2006 y hasta marzo del 2007, tiene mayor presencia en los meses de noviembre ( $1.6 \times 10^2$  UFC/gr), febrero ( $7 \times 10^2$  UFC/gr) y marzo ( $3 \times 10^2$  UFC/gr), observándose la mayor densidad en febrero. Con respecto a los sitios de muestreo en todos se detectó *V. parahaemolyticus*, excepto en la estación de El Iguanito (E4) y la mayor densidad se observó en la estación de Tapo Hacienda ( $1 \times 10^3$  UFC/gr).



En columna de agua, los meses de mayor número de aislados *V. parahaemolyticus* fueron noviembre (cerca a  $1 \times 10^3$  UFC/ml) y septiembre ( $1 \times 10^2$  UFC/ml); al igual que en sedimento en el Tapo Hacienda se detectó la mayor densidad ( $1 \times 10^3$  UFC/ml) y no se detectó en las estaciones de Las Garzas y Estero Agua Dulce.

Con respecto a camarón, en los meses en que se extrajo, se presentó una variación temporal ( $F=1.08$ ,  $p \leq 0.05$ ) y espacial ( $Zr= 48.95$ ,  $p \leq 0.05$ ) dentro de la laguna, la mayor densidad es detectada durante noviembre con  $1 \times 10^3$  UFC/gr y en septiembre la estación del Iguanito registro  $1 \times 10^4$  UFC/gr. Las estaciones de muestreo en las cuales se observó la mayor densidad fueron Los Candelones ( $1 \times 10^4$  UFC/gr) y Vena Quelele ( $1 \times 10^4$  UFC/gr); y en las estaciones Tapo Hacienda, La Guasima, El cuervo y Estero de Agua Dulce no se detectó.

Tabla 5. Número de aislados de *V. parahaemolyticus* por mes y sustrato procedentes del sistema lagunar Huizache-Caimanero durante mayo del 2006 a abril del 2007. nd= no detectado, nm= no muestreado

Mes	Sitio	Sedimento	Agua	Camarón	Total
<b>Julio</b>	Los Candelones	12	nd	nd	
	El Iguanito	nd	3	nd	<b>15</b>
<b>agosto</b>	El Ostial	9	nd	nd	
	Los Candelones	nd	3	nd	
	El Iguanito	nd	nd	9	
	Tapo Hacienda	nd	3	nd	<b>24</b>
<b>septiembre</b>	El Iguanito	nd	nd	3	
	Tapo Hacienda	nd	nd	nd	
	La Guasima	nd	2	nd	
	Vena Quelele	1	nd	5	
	Agua dulce	nd	2	nd	<b>13</b>
<b>octubre</b>	La guasima	5	nd	nd	
	Tapo Caimanero	nd	4	2	<b>11</b>
<b>noviembre</b>	El Ostial	4	1	6	
	Las Garzas	nd	nd	20	
	Los Candelones	2	nd	5	
	El Iguanito	nd	3	nd	
	Tapo Hacienda	nd	2	nd	
	La guasima	1	1	nd	
	Vena Quelele	nd	6	4	
	Tapo Caimanero	6	4	nd	
	El Cuervo	1	nd	nd	
	Agua dulce	6	2	nd	<b>74</b>

Tabla 5. (Continuación). Número de aislados de *V. parahaemolyticus* por mes y sustrato procedentes del sistema lagunar Huizache-Caimanero durante mayo del 2006 a abril del 2007. nd= no detectado, nm= no muestreado

Mes	Sitio	Sedimento	Agua	Camarón	Total
<b>diciembre</b>	Tapo Hacienda	6	nd	nm	
	Vena Quelele	nd	2	3	
	La Guasima	nd	1	nm	
	Tapo Caimanero	8	2	1	<b>23</b>
<b>enero</b>	Tapo Hacienda	nd	2	nm	<b>2</b>
<b>febrero</b>	El Ostial	nd	1	nm	
	Las Garzas	12	nd	nm	
	Los Candelones	7	2	nm	
	Tapo Hacienda	2	2	nm	
	Vena Quelele	2	1	nm	
	Agua dulce	4	nd	nm	<b>33</b>
<b>Marzo</b>	El Ostial	1	nd	nm	
	Las Garzas	28	nd	nm	
	El Iguanito	nd	1	nm	
	Tapo Hacienda	nd	4	nm	<b>34</b>
<b>TOTAL</b>		<b>117</b>	<b>54</b>	<b>58</b>	

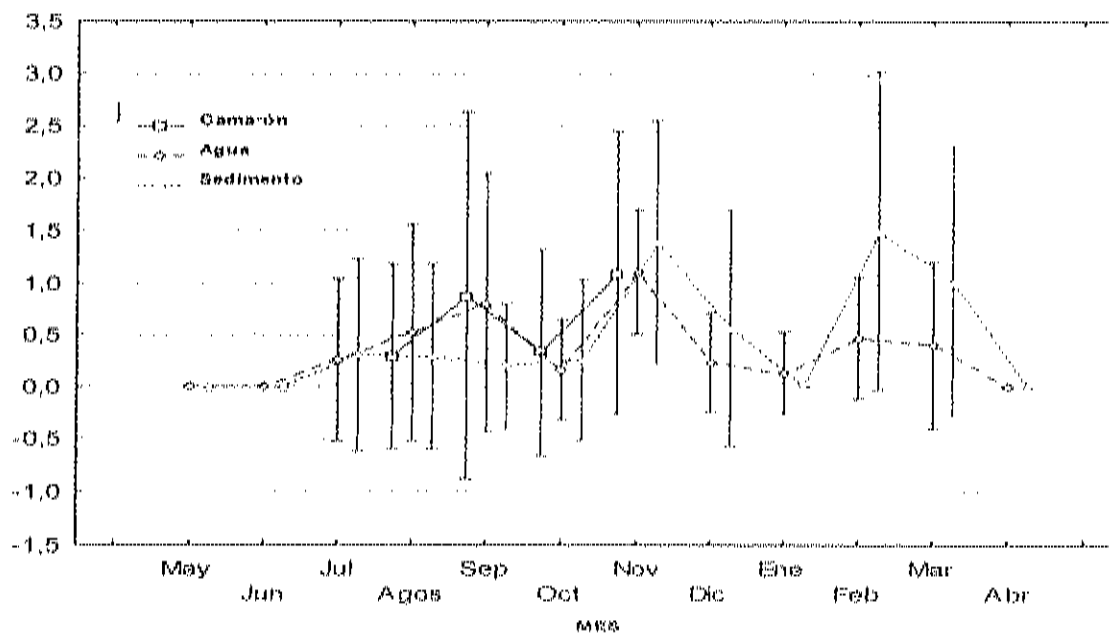


Figura 9. Variación temporal de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua, sedimento y camarón en la laguna Huizache- Caimanero (Promedio y desviación estándar).

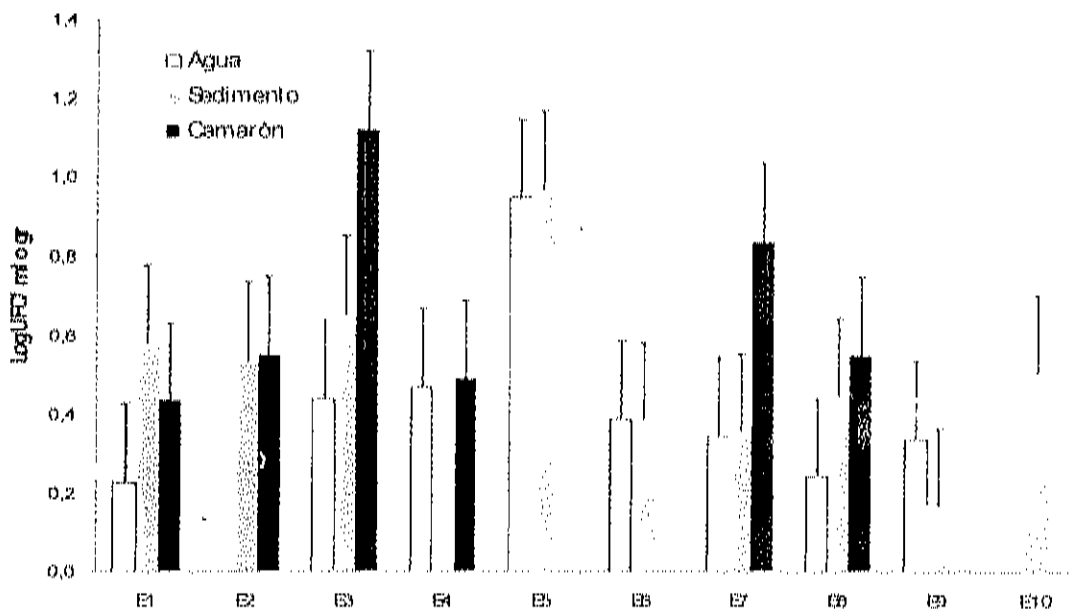


Figura 10. Variación espacial de *V. parahaemolyticus* en muestras de agua, sedimento y camarón en la laguna Huizache- Caimanero.





Objetivo 3. Determinar la presencia de *V. parahaemolyticus* toxigénico y pandémico, en agua, sedimento y camarón del Sistema Lagunar Huizache-Caimanero.

*V. parahaemolyticus* toxigénico (*tlh* +, *tdh* +*trh*-) se detectó inicialmente en el mes de septiembre en muestras de agua y sólo en el sitio del Tapo Hacienda (Tabla 6); en el mes de Diciembre se detectó de nuevo en agua, pero en los sitios de la Guásima y Vena Quelele. En sedimento también se detectó en los sitios de la Guásima y Tapo Caimanero, en los meses de Noviembre y Diciembre, respectivamente. El mayor número de estos aislados, tanto para agua y sedimento, se registraron en Diciembre. En muestras de camarón no se detectaron cepas toxigénicas.

La presencia de cepas toxigénicas represento el 2.34% del total de los aislados. No se detectó la presencia de aislados pandémicos (ORF 8 +), ni del gen *trh*.

Tabla 6. Presencia de *V. parahaemolyticus* toxigénico en el sistema Lagunar Huizache- El Caimanero.

Clave	Mes	Sitio	Sustrato	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	ORF 8
HC43	Sep.	Tapo Hacienda	Agua	+	+	-	-
HC58	Nov.	La Guásima	Sedimento	+	+	-	-
HC102	Dic.	La Guásima	Agua	+	+	-	-
HC134	Dic.	Vena Quelele	Agua	+	+	-	-
HC139	Dic.	Tapo caimanero	Sedimento	+	+	-	-
HC126	Dic.	La Guásima	Agua	+	+	-	-



Objetivo 4. Determinar el factor ambiental que influencia en la variación espacio temporal de *V. parahaemolyticus* total y toxigénico.

**Factores Ambientales.**

Se encontró una variación temporal en la temperatura ( $F=44.92$ ), salinidad ( $F=32.5$ ), pH ( $F=37$ ), nitrógeno total ( $F=19.97$ ), nitrato ( $F=48.4$ ), amonio total ( $F=32.1$ ), fosfato ( $F=42.9$ ) y clorofila ( $F=23.8$ ) a un  $p \leq 0.05$ , en el caso de fósforo total no se tiene evidencia estadística suficiente que sugiera una variación ( $F=15.8$ ).

En el caso de la temperatura en el agua se presentan meses calientes de 30-40°C (junio, julio y parte de agosto) y meses fríos 10-20°C (diciembre, enero y febrero) ( $F=15.83$ ,  $p \leq 0.05$ ); el mes de septiembre no se cuenta con todos los datos debido a que no se pudo tener acceso a las estaciones de muestreo (Fig. 11). Se observó una variación temporal en la salinidad teniendo por una parte meses de baja salinidad entre 0-10 ppm (agosto, septiembre, octubre y noviembre) y en meses de salinidad "estable" alrededor de 38 ppm, algunas estaciones presentan salinidades extremas en el mes de junio (hasta 130 ppm en la estación 6) (Fig. 11).

El pH se mantuvo constante a lo largo del tiempo en un intervalo de 8 a 9 (Fig. 12), observándose una agrupación de meses con pH cercanos a 8 que son de mayo a septiembre, y mese con pH mayores a 8 que son de octubre a abril. En el caso del

oxígeno disuelto se mantiene muy variable a lo largo del tiempo (Fig. 12), la mas alta concentración se registró en enero (8‰); se tienen otros dos meses también con alta concentración de oxígeno septiembre y marzo (cercanas a 6‰).

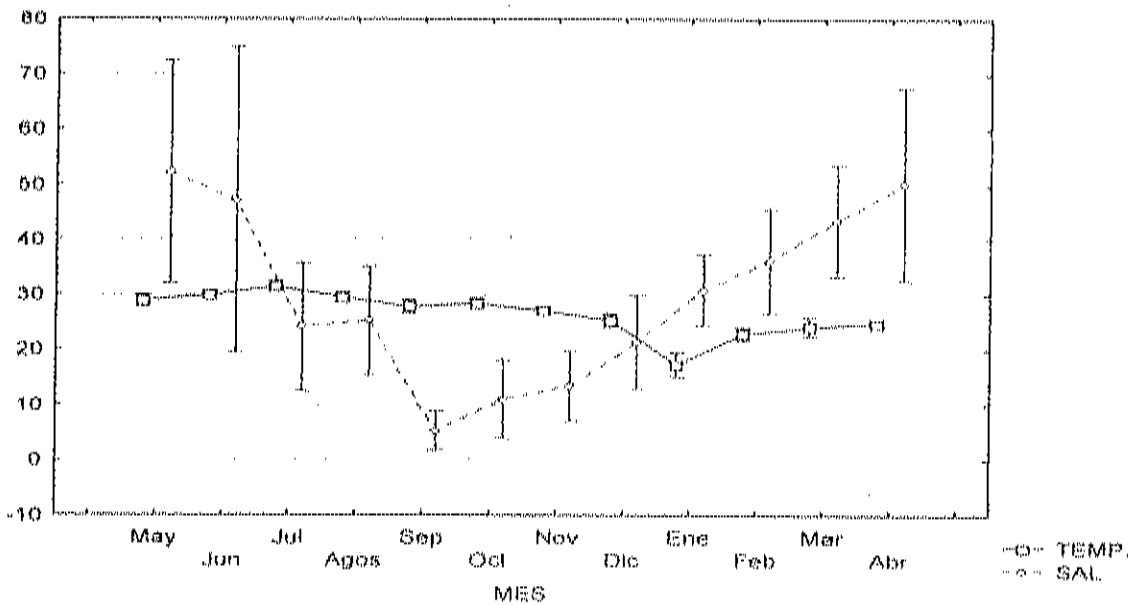


Figura 11. Variación temporal de los parámetros físicos de temperatura (TEMP) y salinidad (SAL) en la laguna Huizache- Caimanero en el periodo de mayo del 2006 a abril del 2007 (Promedio y desviación estándar).

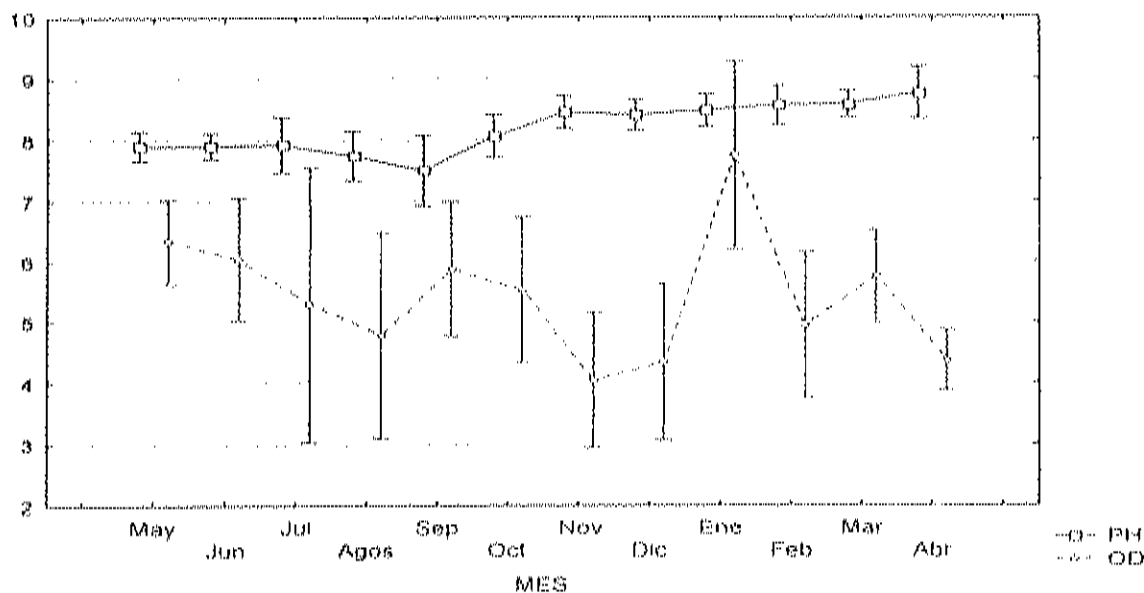


Figura 12. Variación temporal de pH (PH) y oxígeno disuelto (OD) en la laguna Huizache-Caimanero en el período de mayo del 2006 a abril del 2007 (Promedio y desviación estándar).

Con respecto a los nutrientes se pudo observar una alta variación a lo largo del tiempo (Fig. 13; Fig. 14 a y b); en el caso de nitrógeno total se tiene que las mayores concentraciones se presentaron en los meses de noviembre (2.13  $\mu\text{g/l}$ ) y enero (1.69  $\mu\text{g/l}$ ), nitrato los meses de septiembre (0.23  $\mu\text{g/l}$ ), noviembre (0.16  $\mu\text{g/l}$ ) y enero (0.15  $\mu\text{g/l}$ ); para los nitritos, el mes de mayor concentración fue enero (0.05  $\mu\text{g/l}$ ), el resto de los meses se mantuvo constante (cercanos a 0.01  $\mu\text{g/l}$ ). Para el amonio, las mayores concentraciones se encuentran en mayo (0.32  $\mu\text{g/l}$ ) y de diciembre a enero (entre 0.30-0.39  $\mu\text{g/l}$ ). Se tomó a la turbidez como indicador de la materia orgánica suspendida en

el sistema lagunar, observándose que es menor de mayo a junio cercana a 45 cm y mayor de septiembre en delante de 0-15 cm.

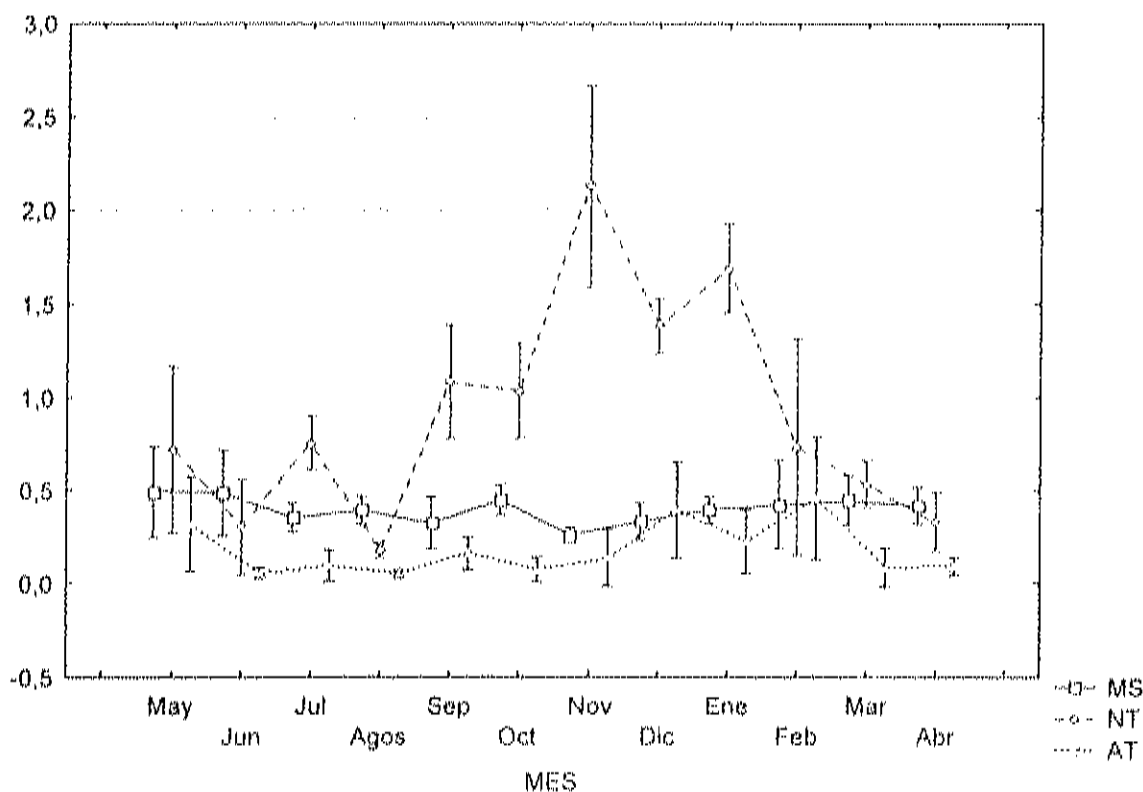
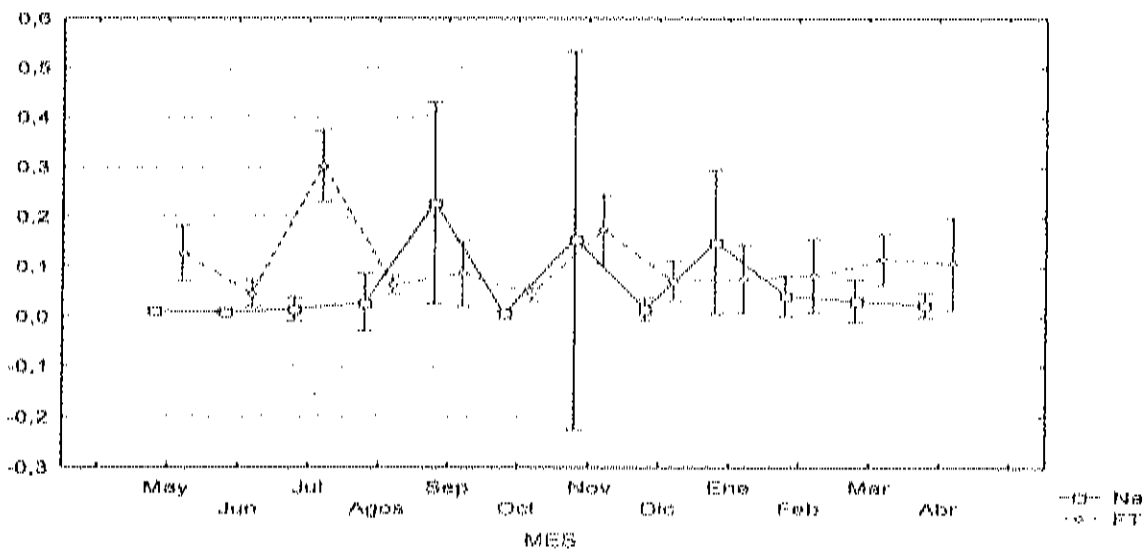


Figura 13. Variación temporal de material suspendido (MS), nitrógeno total (NT) y amonio total (AT) en la laguna Huizache- Caimanero en el periodo de mayo del 2006 a abril del 2007 (Promedio y desviación estándar).

a)



b)

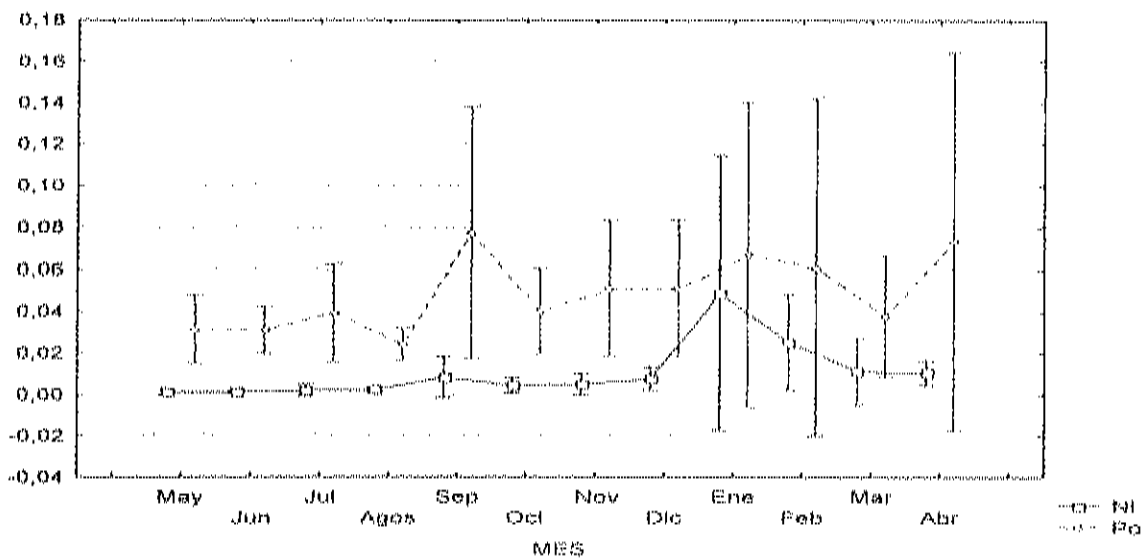


Figura 14. Variación temporal de a) nitratos (Na), fósforo total (PT), y b) nitritos (Ni) y fosfatos (Po) en la laguna Huizache- Caimanero en el periodo de mayo del 2006 a abril del 2007 (Promedio y desviación estándar).

Al realizar el análisis de componentes principales (APC) entre las variables ambientales y el sitio-mes de muestreo (Fig.15), se obtuvo que el sitio-mes explica el 52% de la variación de dichas variables al ser proyectadas en los primeros dos componentes. Se observó que por el grado de correlación se forman dos grupos de variables ambientales; en el primero (Fig. 15 a) se agrupan los nutrientes monitoreados (nitrógeno total, nitritos, nitratos, amonio total, fósforo total y fosfato) y en el otro (Fig. 15 b) los parámetros físicos (temperatura, salinidad, oxígeno, pH y salinidad), con índices de correlaciones entre los componentes de cada grupo de  $r= 0.5$  y  $r= 0.8$  respectivamente.

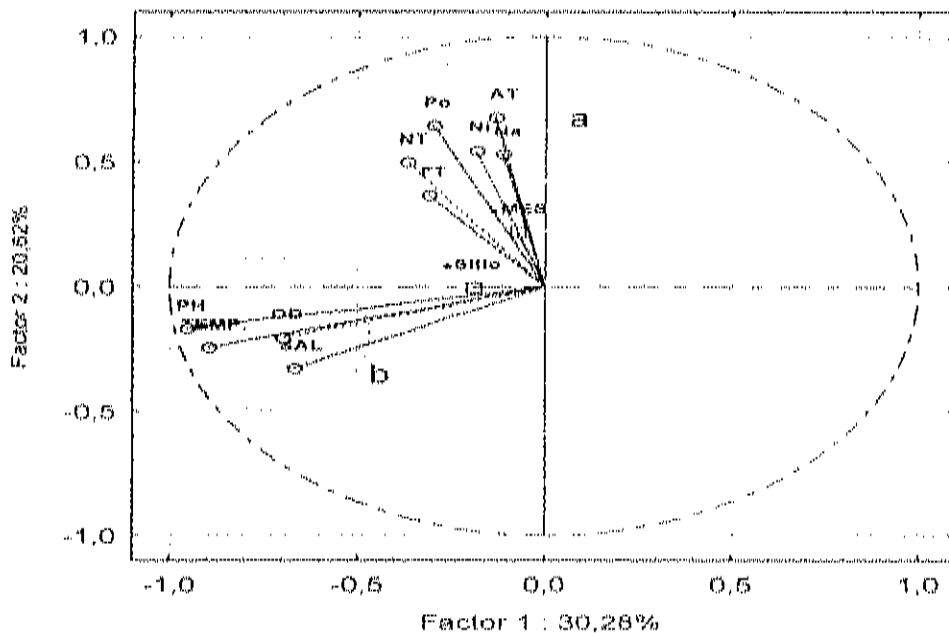


Figura 15. Gráfica de componentes principales de las variables ambientales temperatura, salinidad, oxígeno, pH, salinidad, nitrógeno total, nitritos, nitratos, amonio total y fósforo total con respecto a mes y sitio, por medio de análisis de componentes.



### Densidad Bacteriana.

Al realizar el ACP y análisis de correlación entre parámetros ambientales y toda la comunidad de bacterias presentes en la laguna (Fig. 16), se observó que éstos explican cerca de un 51% de la variación de las densidades registradas a lo largo del muestreo. En cuanto a las bacterias heterótrofas totales se tiene que el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto están influenciando en mayor parte la variación en la densidad de éstas en la columna de agua con un  $r$  de 0.75, 0.72 y 0.64 respectivamente; y en sedimento con un  $r$  de 0.83, 0.82 y 0.72 respectivamente. Con respecto a los vibrios se tiene que la salinidad es la que esta influenciando en mayor grado la densidad de éstos en sedimento y agua con un  $r$  de 0.5 y 0.64 respectivamente, además en el sedimento se presenta una correlación negativa con el nitrato presente ( $r = -0.5$ ).

Se pudo observar que la variación en la densidad de *V. parahaemolyticus* muestra una correlación muy débil con la mayoría de los parámetros ambientales físicos (Fig. 17a), tanto en agua, sedimento y camarón; así como en los nutrientes (Fig. 17b) en agua, sedimento y camarón, no obstante, la unión de todas las variables con interacción explican un 82%, 93% y 99% de la variación de *V. parahaemolyticus* en agua, sedimento y camarón respectivamente.



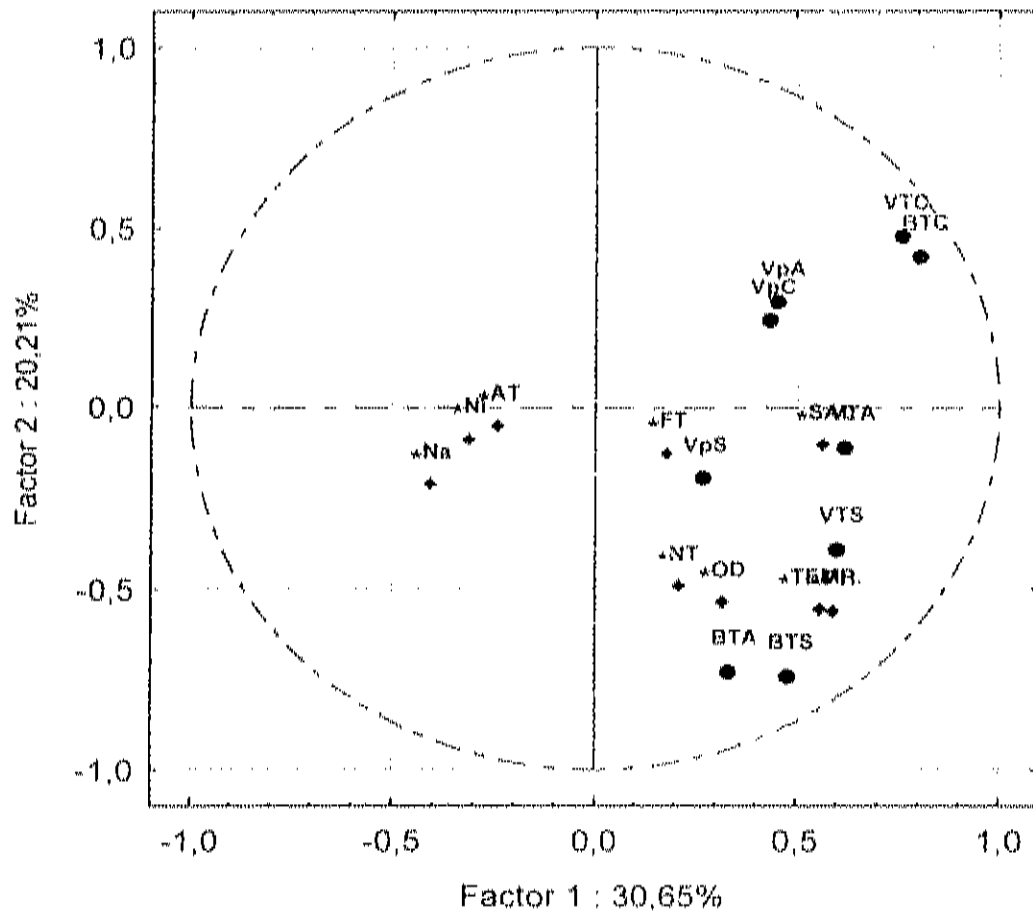
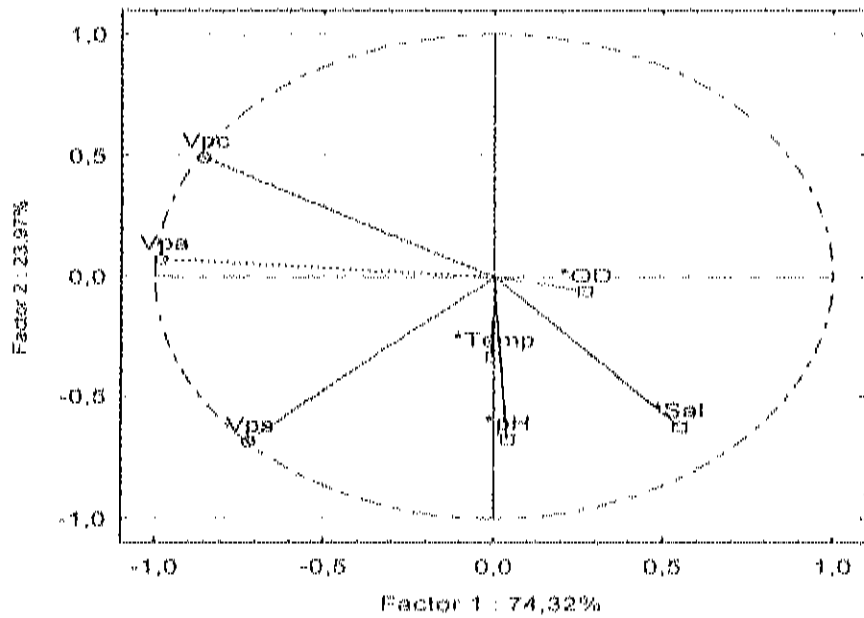


Figura 16. Análisis de componentes principales de comunidades bacterianas y parámetros ambientales. Bacterias heterótrofas totales de agua (BTA), sedimento (BTS), y camarón (BTC); Vibrios totales de agua (VTA), sedimento (VTS) y camarón (VTC); temperatura (TEMP), salinidad (SAL) pH (PH), oxígeno disuelto (OD), nitrógeno total (NT), nítritos (Ni), nitratos (Na), amonio total (AT), fósforo total (FT) y fosfatos (Po).

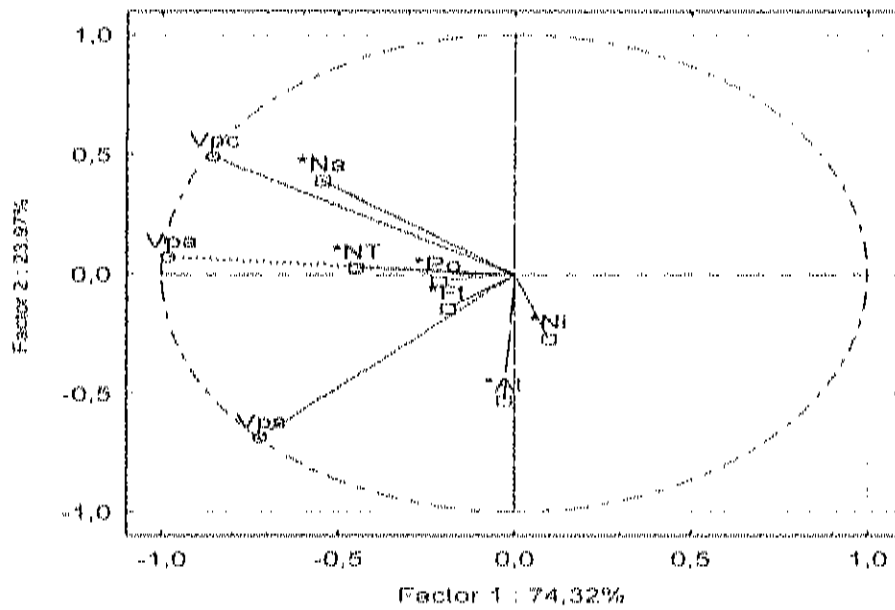


En los parámetros físicos se observó que la salinidad tiene mayor efecto sobre la densidad de *V. parahaemolyticus* en agua ( $r= 0.57$ ) (Fig. 17a, Tabla 7) y en camarón ( $r= 0.78$ ) (Fig. 17a, Tabla 7), pero en sedimento no parece tener una interacción directa ( $r= 0.03$ ); para este último sustrato se tiene que el pH es el que tiene mayor interacción ( $r= 0.5$ ) (Fig.17 a, Tabla 7).

Con respecto a los nutrientes se observó que el aporte de nitratos al sistema es el que está ejerciendo mas efecto sobre las densidades de *V. parahaemolyticus* en agua ( $r= 0.60$ ) (Fig. 17 b, Tabla 7) y en camarón ( $r= 0.63$ ) (Fig.17 b, Tabla 7), mas no tiene interacción evidente con la densidad en sedimento ( $r= 0.11$ ) (Fig. 17 b, Tabla 7). También se pudo observar que la presencia de nitrógeno total afecta en los tres sustratos ( $r= 0.5$ ) y el amonio a la densidad en sedimento ( $r= 0.4$ ). En particular la variación de *V. parahaemolyticus* en sedimento no es explicada en gran parte por los parámetros ambientales y se observó mas afectada por la comunidad de bacterias presentes.



a)



b)

Figura 17. Gráfica de componentes principales de *V. parahaemolyticus* con respecto a: a) parámetros físicos (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH) y b) nutrientes (nitrógeno total, nitratos, nitritos, amonio, fósforo total y fosfatos).



Tabla 7. Matriz de correlación de *V. parahaemolyticus* con las variables ambientales físicos, nutrientes y las comunidades bacterianas calculada por análisis de componentes principales.

	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
	Agua	Sedimento	camarón
Temperatura	-0.038	0.24	-0.14
Salinidad	-0.57	0.03	-0.78
pH	-0.1	0.44	-0.35
Oxígeno disuelto	-0.24	-0.16	-0.27
Nitrógeno Total	0.4	0.32	0.42
Nitritos	-0.081	0.1	-0.23
Nitratos	0.6	0.11	0.63
Amonio total	-0.01	0.38	-0.23
Fósforo Total	0.21	0.21	0.06
<b>Bacterias heterótrofas totales en:</b>			
Agua	0.17	0.23	0.09
Sedimento	0.14	0.56	0.04
Camarón	0.58	0.1	0.68
<b>Vibrios totales en:</b>			
Agua	-0.32	0.29	-0.58
Sedimento	0.16	0.7	-0.2
Camarón	0.58	0.84	0.65



## VII. DISCUSIÓN

La ecología de *V. parahaemolyticus* presente en muestras ambientales y de alimentos no es ampliamente conocida, ya que las condiciones ambientales imponen una variedad de factores estresantes a las bacterias, las cuales en respuesta desarrollan diferentes estrategias de sobrevivencia; por lo cual la incidencia de esta especie en el ambiente acuático es dependiente de muchos factores (Alam *et al.* 2003). En este estudio se encontró que *V. parahaemolyticus* total presenta una variación espacio-temporal, coincidiendo con estudios realizados anteriormente en los cuales se ha observado una variación temporal dentro de las zonas de estudio ubicadas en Esteros de Puerto Rico (Rivera *et al.* 1989), Alabama en E.U.A. (DePaola *et al.* 2003), Costas de la India (Deepanjali *et al.* 2005) y en Puglia, región de Italia (Normano *et al.* 2006).

DePaola *et al.* (2003) encontraron que *V. parahaemolyticus* presenta una variación estacional en su densidad en muestras de ostiones, mencionando que esta presenta una correlación positiva con la temperatura ( $r= 0.51$ ), mientras que con la salinidad no presenta correlación significativa ( $r= 0.10$ ); observando que las mayores densidades ( $1 \times 10^3$  UFC/gr de ostión) se presentan a temperaturas mayores de  $30^{\circ}$  y salinidad de 25 ppm. En el presente estudio se trabajó con muestras de agua, camarón y sedimento, observándose que la variación en la densidad en agua y camarón presenta mayor correlación con la salinidad ( $r= -0.70$ ) que con la temperatura ( $r=0.20$ ),



observándose densidades máximas de  $1 \times 10^3$  UFC/gr o ml, similares a las encontradas en ostiones, a una temperatura de 27°C pero a una salinidad mas baja de 13 ppm.

Deepanjali *et al.* (2005), no encontraron una correlación significativa con la temperatura y la salinidad ( $r= 0.16$  y  $r= 0.38$  respectivamente), ya que la abundancia de *V. parahaemolyticus* se detectó en un 98.5% de las muestras de ostión a lo largo de todo el año, mencionando que en regiones tropicales los ciclos estacionales de los organismos están correlacionados con la época de lluvias y sequías, observando que las más altas densidades de  $6.7 \times 10^3$  UFC/gr de ostión se encuentran en la época de sequías en los meses de enero a mayo con temperaturas de 34 °C y salinidad de 30 ppm . En este estudio, al igual que en el de Deepanjali *et al.* (2005), se observó que la densidad de *V. parahaemolyticus* dentro de la laguna varía en la época de lluvia y sequia; ya que cuando la salinidad cambia bruscamente como consecuencia del aporte de agua dulce por las lluvias en el lapso de septiembre a octubre, las densidades de *V. parahaemolyticus* disminuyen y en los meses posteriores a esta época (en el mes de noviembre) las densidades se ven aumentadas a  $1 \times 10^3$  UFC en columna de agua y de camarón. Sin embargo, en este estudio si se encontró evidencia estadística para establecer una correlación significativa con la salinidad la cual fue negativa ( $r= -0.70$ ).

Horie *et al.*, (1967), registraron que *V. parahaemolyticus* es sensible a los cambios de salinidad, presentando mayores densidades en salinidades cercanas a 5 ppm, ya que la salinidad favorece el crecimiento y la sobrevivencia de esta especie, si el agua es rica en materia orgánica. Lo anterior explicaría lo encontrado en este estudio, ya que el mes de noviembre se encuentran altas cantidades de materia orgánica suspendida en la



laguna y las concentraciones de los nutrientes como nitrógeno total ( $2.13 \mu/l$ ), nitratos ( $0.16 \mu/l$ ) y fósforo ( $0.22 \mu/l$ ) son altas en comparación con los otros meses de muestreo, además de que la salinidad es baja de 13 ppm.

Deepanjali *et al.* (2005) y Horie *et al.*, (1967), mencionan la importancia del aporte de materia orgánica al sistema por la época de lluvias, en la laguna Huizache-Caimanero el aporte se da en parte por los escurrimientos de lluvia de las áreas aledañas a la laguna y por la desembocadura de agua dulce del Río Baluarte en la laguna de Huizache y Río Presidio en la laguna de Caimanero, los cuales descargan el agua desde las zonas de montañas hasta la laguna pasando por las poblaciones como lo son Villa Unión El Walamo, Rosario y Agua Verde.

Como ya se mencionó anteriormente, la densidad de *V. parahaemolyticus* no sólo está correlacionada con la temperatura y salinidad, si no también con el aporte de nutrientes. En este estudio se observó que entre los nutrientes monitoreados, los nitratos mostraron una correlación significativa con la variación en la densidad de *V. parahaemolyticus* ( $r= 0.60$ ) en agua y camarón. Rivera *et al.* (1989) en muestras de agua y mariscos mencionan que las densidades de *V. parahaemolyticus* están correlacionadas con las concentraciones de nutrientes, encontrando una correlación positiva significativa con las concentraciones de fosfatos ( $r= 0.43$ ).

Para fines comparativos es necesario considerar las características de los sistemas de estudio. Rivera *et al.* (1989), DePaola *et al.* (2003), Deepanjali *et al.* (2005) trabajaron en esteros que mantienen comunicación libre con el mar y aunque se presente



un aporte de agua dulce se presentan las características de agua de mar, observándose que la salinidad se mantiene prácticamente constante y la temperatura presenta mayor fluctuación a lo largo del año. El presente estudio se realizó en la laguna costera Huizache-Caimanero la cual es un cuerpo de agua separado del mar por una barrera de arena, que mantiene comunicación con el mar por dos bocas de entrada estrechas y el aporte de agua dulce se da sólo en época de lluvias. Las características anteriores hacen que las condiciones sean muy variantes a lo largo del año, en época de sequía las lagunas presentan puntos en los cuales hay muy poca o nada de agua teniendo un ambiente hipersalino y permanecen conectadas por un canal dragado en la zona; en época de lluvia la laguna se llena en plenitud de agua dulce por los aportes de los ríos, pudiendo inundar las poblaciones cercanas y hacia los meses posteriores de época de lluvia y antes de la época de sequía la laguna tiene condiciones de agua de mar por el aporte de las 2 bocas. Por lo cual las épocas de sequía-lluvia estarían delimitando las densidades alcanzadas por *V. parahaemolyticus* debido a que ocasionan modificaciones en los parámetros ambientales, principalmente la salinidad dentro de la laguna.

Los resultados obtenidos muestran una posible "migración" entre sustratos ya que en verano *V. parahaemolyticus* se encuentra en mayor densidad en la columna de agua, y a finales del verano y otoño se encuentra presente mayormente en sedimento y especialmente en camarón. Esta migración ha sido mencionada por Kaneko y Colwell (1975) quienes encontraron que a finales de primavera e inicio de verano, los vibrios no son detectados en sedimento y aparecen proliferando en la superficie del zooplancton y en la columna de agua. Urakawa y Rivera (2006) mencionan que las especies de *Vibrio*





son las bacterias más abundantes en la asociación con zooplancton y que estas bacterias no son usualmente abundantes en sedimento, cuando se presentan en el primer sustrato y Pereira *et al.* (2004) menciona que hay evidencias de que eventualmente las cepas de *V. parahaemolyticus* patógenas aisladas del ambiente acuático pueden tener como reservorio sedimentos y la capa quitinosa de copépodos, característica que contribuye a la distribución y ciclo anual de la bacteria.

En este estudio se monitorearon las comunidades de bacterias heterótrofas totales y vibrios totales, encontrando que independientemente el sustrato del cual procedan las muestras, las densidades de *V. parahaemolyticus* están correlacionadas con las comunidades de vibrios totales. Con respecto a lo anterior Maeda *et al.* (2003) encontraron que hay un cambio en la composición taxonómica de las especies de vibrios presentes conforme a la temperatura, mencionado que el grupo de *V. parahaemolyticus* y especies relacionadas es dominante a temperaturas mayores de 20°C; *V. splendidus* y *V. lentus* son más abundantes cuando la temperatura es menor o igual a 20°C en agua y sedimento.

Las cepas patogénicas de *V. parahaemolyticus* fueron detectadas sólo en cinco aislados de los 231 obtenidos equivalente al 2.2%. Estudios previos han reportado que de las cepas ambientales cerca del 2% presentan la producción de TDH (DePaola *et al.* 1990 y De Paola *et al.* 2003). *V. parahaemolyticus* toxigénico empieza a ser detectado en el mes de septiembre, cuando se da un cambio brusco en la salinidad de 25 a 5 ppm y la comunidad de vibrios totales disminuye en agua (200 UFC/ml a  $\geq 10$  UFC/ml),



sedimento (1300 UFC/gr a 100 UFC/gr) y camarón (10000 UFC/gr a 100 UFC/gr), de ahí se mantiene otra vez y es más abundante en los meses de invierno donde la densidad de *V. parahaemolyticus* total decrece, coincidiendo con lo mencionado por DePaola *et al.* (2003) que las cepas toxigénicas son más tolerantes al frío que otras cepas de *V. parahaemolyticus*.

*V. parahaemolyticus* toxigénico y pandémico se ha detectado contaminando organismos marinos de consumo humano como lo son ostiones (DePaola *et al.* 1990, DePaola *et al.* 2003, Normano *et al.* 2006), mejillones (Fuenzalida *et al.* 2005), pescado, jaiba y camarón (Cabanillas-Beltrán *et al.* 2006, Hernández *et al.* 2005); representando un riesgo para la salud pública. En este estudio se detectó la presencia de cepas toxigénicas en agua y sedimento de la laguna Huizache-Caimanero mas no se detectó contaminando camarón, ni la presencia de la cepa pandémica en el área. Sin embargo estando presentes las cepas toxigénicas en agua y sedimento de la laguna y bajo condiciones óptimas para su crecimiento puede llegar a contaminar los productos marinos como camarón (siendo este el de mayor extracción). Aunado a lo anterior en el área se ha registrado la presencia de cepas toxigénicas en muestras de camarón y la cepa pandémica O3:K6 en aislados clínicos (Cabanillas-Beltrán *et al.* 2006).



## VIII. CONCLUSIÓN.

En este estudio se encontró que *V. parahaemolyticus* presenta una variación espacio-temporal en la laguna Huizache-Caimanero, la cual esta correlacionada en mayor parte con la salinidad y el aporte de nutrientes a la laguna en la época de lluvias. Las cepas toxigénicas de *V. parahaemolyticus* (*tdh+*, *trh-*) se detectaron a partir de septiembre después del inicio de la época de lluvias y su mayor presencia se detectó hacia el mes de diciembre cuando se mantienen las condiciones de salinidad y baja la temperatura, pero sólo se detectó en muestras de columna de agua y sedimento. En este año de muestreo no se detectaron cepas pandémicas en muestras ambientales del área.



## IX. RECOMENDACIONES.

Registros previos indican la presencia de *V. parahaemolyticus* en las costas del país (Pacífico mexicano y Golfo de México) por lo que se recomienda mantener un monitoreo constante de las lagunas de importancia en la extracción de recursos pesqueros, de manera que se disminuya el riesgo que representa a la salud pública.

El monitoreo de muestras ambientales sirve como indicador de la presencia de las cepas toxigénicas y pandémicas, ya que se ha demostrado que son reservorios o vehículos de transporte. Hay que considerar que de las muestras ambientales sólo se analiza una muestra representativa de toda el área de estudio y los periodos entre muestreos suelen ser muy amplios, por lo cual se pudiera subestimar la presencia de cepas toxigénicas, lo anterior refleja la importancia de realizar análisis de aislados clínicos de pacientes que lleguen a presentar sintomatología de gastroenteritis por consumo de productos pesqueros, ya que en éstos el patógeno se encuentra en mayor densidad y es más fácil su detección y aislamiento. Se requiere el trabajo en conjunto de centros de investigación e instituciones dedicadas a la salud pública, para llevar un mejor monitoreo, no solo de *V. parahaemolyticus*, si no de bacterias patógenas que representen un riesgo a la salud.

En futuros estudios, aparte de manejar muestras ambientales y clínicas, es necesario registrar el mayor número de parámetros ambientales con la finalidad de modelar la prevalencia de *V. parahaemolyticus* toxigénico y pandémico para la prevención de futuros brotes.



## X. LITERATURA CITADA.

- Akito T., Kiyoshi B., Hiromasa S., Osamu Y., Yoshifumi T. y N. Mitsuaki. 1991. Evidence for Insertion Sequence-Mediated Spread of the Thermostable Direct Hemolysin Gene Among *Vibrio* Species. **Journal Of Bacteriology**. 173 (16): 5036-5046.
- Alam M., Miyoshi S. y S. Shinoda. 2003. Studies On Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* During A Warm Weather Season In The Seto Inland Sea, Japan. **Environmental Microbiology**. 5(8):706-710.
- Amezúa Linares, F. 1977. General Description of The Ichthyology of The Coastal Lagoon System Huizache-Caimanero, Sinaloa, México. **Anuarios Ciencias del Mar y Limnología**. Univ. Nal. Auton. México. 4(1): 1-26.
- Ansaruzzaman M., Lucas M., Deen L., Bhuiyan N., Wang X., Safa A., Sultana M., Chowdhury A., Balakrish-G, Sack D., Von-Seidlein L., Puri M., Ali M., Chaignat C., Clemens J. y A. Barreto. 2005. Pandemic Serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Diarrhea in Mozambique: Spread of the Pandemic into the African Continent. **Journal Of Clinical Microbiology**. 43 (6):2559-2562.
- Balakrish G. y J. Hormazábal. 2005. The *Vibrio parahaemolyticus* Pandemic. **Revista Chilena de Infectología**. 22(2):125-130
- BAM:** U.S. Food y Drug administration (FDA). 2004. Bacteriological Analytical Manual Online. 39pp.
- Bhuiyan N., Ansaruzzaman M., Kamruzzaman M., Alam K., Chowdhury N., Nishibuchi M., Faruque S., Sack D., Takeda Y. y G. Nair. 2002. Prevalence of the Pandemic Genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and Significance of Its Distribution across Different Serotypes. **Journal Of Clinical Microbiology**. 40 (1):284-286.



- Cabanillas-Beltrán H., Llausás-Magaña E., Romero R., Espinoza A., Garcia -Gasca A., Nishibuchi M., Ishibashi M. y B. Gomez-Gil. 2006. Outbreak Of Gastroenteritis Caused By The Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3 :K6 In Mexico. **FEMS Microbiology Lett.** Vol. 265.
- Cabrera-García M., Vázquez-Salinas C. y E. Quiñones-Ramírez. 2004. Serologic and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Seawater and Fish Products of the Gulf of Mexico. **Applied and Environmental Microbiology.** 70(11):6401-6406.
- Chang B., Taniguchi H., Miyamoto H and S. Yoshida. 1998. Filamentous Bacteriophages Of *Vibrio parahaemolyticus* as a Possible Clue Genetic Transmission. **Journal of Bacteriology.** 180(19):5094-5101.
- Deepanjali A., Sanath-Kumar H., Karunasagar I. y I. Karunasagar. 2005. Seasonal Variation in Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters along the Southwest Coast of India **Applied and Environmental Microbiology.** 71(7):3575-3580.
- DePaola A., Hopkins L., Peeler J., Wentz B. y R. M. McPhearson. 1990. Incidence Of *Vibrio parahaemolyticus* In U.S. Coastal Waters And Oysters. **Applied and Environmental Microbiology.** 56:2299-2302.
- DePaola A., Ulaszek J., Kaysner C., Bradley J., Nordstrom J., Joy W., Nancy P. y M. Gendel. 2003. Molecular, Serological, and Virulence Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Environmental, Food, and Clinical Sources in North America and Asia. **Applied and Environmental Microbiology.** 69 (7):3999-4005
- ESR:** Institute of Environmental Science & Research. 2003. Risk Profile: *Vibrio parahaemolyticus* In Seafood. 54pp.

- Fabbri A., Falzano L., Frank C., Donelli G., Matarrese P., Raimondi F., Fasano A., y C. Fiorentini. 1999. *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin Modulates Cytoskeletal Organization and Calcium Homeostasis in Intestinal Cultured Cells. **Infection And Immunity**. 67 (3):1139–1148.
- FDA:** U.S. Food y Drug administration. 2000. Draft Risk assessment on the Public Health Impact of *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Molluscan Shellfish. 118pp.
- Franco-Monsreal J., Flores-Abuxapqui J. y G. Suárez-Mil. 1991. Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* y de sus Anticuerpos En Manipuladores De Alimentos Marinos En Mérida, Yucatán. **Salud Pública México**. 33 (2):173-177.
- Fuenzalida L., Hernández C., Toro J., Rioseco M., Romero J. y R. Espejo. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* In Shellfish And Clinical Samples During Two Large Epidemics Of Diarrhoea In Southern Chile. **Environmental Microbiology**. 1-9 pp.
- Guerrero-Barragán C. 2002. Monitoreo de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* Y *Vibrio vulnificus* Presentes y Causantes de Intoxicación Por Consumo En Productos Marinos En Las Costas Del Estado De Tamaulipas. **Spectro Q**. 4(4):3-8
- Hernández C., Ulloa J., Vergara J., Romilio-Espejo T. y C. Cabello. 2005. Infecciones Por *Vibrio parahaemolyticus* E Intoxicaciones Por Algas: Problemas Emergentes De Salud Pública En Chile. **Revista Médica Chilena**. 133:1081-1088p.
- Horie S., Sakeki K. y T. Okuzami. 1967. Quantitative Enumeration Of *Vibrio parahaemolyticus* In Sea And Estuarine Waters. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**. 33: 126-130.
- Kaneko T. y R. Colwell. 1975. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. **Applied Microbiology**. 30:251-257.



- Lynch T., Livingstone S., Buenaventura E., Lutter E., Fedwick J., Buret A., Graham D. Y R, Devinney. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* Disruption Of Epithelial Cell Tight Junctions Occurs Independently Of Toxin Production. **Infection And Immunity**. Vol. 73, No. 3, P. 1275–1283.
- Maeda T., Matsuo Y., Furushita M. y T.Shiba. 2003. Seasonal Dynamics In A Coastal *Vibrio* Community Examined By A Rapid Clustering Method Based On 16S rDNA. **Fisherie Science**.69: 385-394
- Maedor C., Parsnos M., pp C., Gener-Smidt P., Painter J. and G. Vora. 2007. Virulence Gene And Pandemic Group-Specific Marker Profiling Of Clinical *Vibrio parahaemolyticus* Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**. 45(4):1133-1139.
- Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Lijima Y., Najima T., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hatori M. y T. Lida. 2003. Genome Secuence Of *Vibrio parahaemolyticus*: A Pathogenic Mechanism Distinct From That Of *V. cholerae*. **The Lancet**. 361:743-749.
- Martinez Urtarza J., Lozano-Leon A., DePaola A., Ishibashi M., Shimada K., Nishibuchi M. y E. Liebana. Characterization Of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolates From Clinical Sources In Spain And Comparasion With Asian And North American Pandemic Isolates. 2004. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(10): 4672-4678.
- McCarter L. 2006. Chapter 9. Motility and Chemotaxis. En: Thompson F., B. Austin y J. Swings. 2006. The biology of Vibrios. Ed. **Blackwell Publishing**. Pp. 84-94.
- Nasu H., Iida T., Sugahara T., Yamaichi Y., Park K., Yokoyama K., Makino K., Shinagawa H. and T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. **Journal of Clinical Microbiology**. 38(6): 2156–2161.





- Normano G., Parisi A., Addante N., Quaglia N., Dambrosio A., Montagna C. and D. Chieco. 2006. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio Vulnificus* And Microorganisms Of Fecal Origin In Mussels (*Mytilus Gallaprovincialis*) Sold In The Puglia Region (Italia). **International Journal of Food Microbiology**. 106: 219-222.
- Oliven D. y P. Bean. 1999. MINIREVIEW: Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**. 37(6):1661–1669.
- Panicker G., Call D., Krug M. y A. Bej. 2004. Detection of Pathogenic *Vibrio spp.* in Shellfish by Using Multiplex. PCR and DNA Microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**. 70 (12):7436–7444.
- Park K., Ono T., Rokuda M., Jang M., Lida T. and T.Honda. 2004. Cytotoxicity And Enterotoxicity Of The Thermostable Direct Hemolysin-Deletion Mutants Of *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiology Immunology**. 48(4): 313-318.
- Pereira C., Viana C. y D. Rodrigues. 2004. *Vibrio parahaemolyticus* Productores De Urease Isolados A Partir De Ostras (*Crassostrea rizophorae*) Colectados En Natura En Restaurantes y Mexilhões (*Perna perna*) De Banco Natural. **Ciencia y Tecnología de Alimentos**. 24(4):591-595.
- Raimondi F. Kao J., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A. y A. Fasano. 2000. Enterotoxicity and Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin in In Vitro Systems. **Infection And Immunity**. 68(6):3180–3185.
- Rivera S., Lugo T. and T. Hanzen. 1989. Autecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in tropical waters. **Water Research**. 23(7): 923-931.

- Taniguchi, H., H. Hirano, S. Kubomura, K. Higashi, y Y. Mizuguchi. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbial Pathogenesis** 1:425-432.
- Tetsuya I. y K. Kurorawa. 2006. Chapter 5. Comparative genomics: genome configuration and the driving forces in the evolution of vibrios. En: Thompson F., B. Austin y J. Swings. 2006. The biology of Vibrios. **Ed. Blackwell Publishing**. Pp. 67-75.
- Urakawa H. y I. Rivera. 2006. Chapter 12. Aquatic Environment. En: Thompson F., B. Austin y J. Swings. 2006. The biology of Vibrios. **Ed. Blackwell Publishing**. Pp. 175-189.
- Watkins W. y V. Cabelli. 1985. Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. **Applied And Environmental Microbiology**. 49:1307-1313.