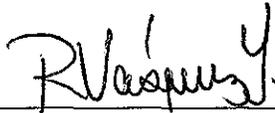


TESIS DEFENDIDA POR
JENNIFFER NADESHDA VILLALVA VEGA
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director del Comité



Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del Comité



Dra. Carmen G. Paniagua Chávez
Miembro del Comité

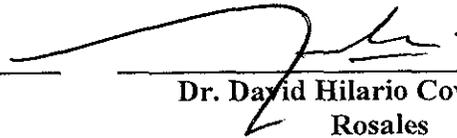


Dr. Ernesto García Mendoza
Miembro del Comité



Dra. Beatriz Cordero Esquivel

*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias en Acuicultura*



**Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales**

Director de Estudios de Posgrado

1 de septiembre de 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LESIONES DE LA
CONCHA DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN *Nodipecten subnodosus* (Sowerby,
1835), CULTIVADA EN BAHÍA TORTUGAS, BAJA CALIFORNIA SUR.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

JENNIFFER NADESHDA VILLALVA VEGA

Ensenada, Baja California, México, septiembre de 2011.

RESUMEN del proyecto de tesis de JENNIFFER NADESHDA VILLALVA VEGA, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Septiembre, 2011.

Caracterización de bacterias asociadas a lesiones de la concha de la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), cultivada en Bahía Tortugas, Baja California Sur.

Resumen aprobado por:



Dr. Jorge A. Cáceres Martínez
Director de Tesis

El cultivo de la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* se ha presentado como una posible alternativa para el desarrollo económico de la península de Baja California. Actualmente se cultiva en algunas localidades de la región con diferente grado de éxito. A pesar de que la presencia de parásitos y enfermedades pueden afectar negativamente a su cultivo, este aspecto ha recibido poca atención. Recientemente se encontraron ejemplares cultivados en Bahía Tortugas, Baja California Sur, con deformaciones y depósitos marrones en la cara interna de la concha, asociados a un bajo crecimiento y a altas tasas de mortalidad. Las deformaciones se caracterizaron a partir del análisis de la concha y la cobertura de los depósitos de color marrón en la cara interna. Además, se llevaron a cabo estudios bacteriológicos e histopatológicos con el objetivo de determinar si podría existir una asociación de dichas lesiones con la presencia de bacterias y si el tejido blando contiguo presentaba alteraciones. Los resultados mostraron que las deformaciones se presentan en el borde externo de la concha mientras que los depósitos marrones, de naturaleza quitinosa, se producen en la cara interna de la concha, cubriendo del 6.18 ± 0.64 % al 61.70 ± 3.64 % de la superficie total de la cara misma. El análisis bacteriológico llevado a cabo por métodos convencionales, así como, el análisis de ADN utilizando una región conservada del gen 16S DNAr, mostraron que las bacterias dominantes fueron: *Vibrio splendidus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio gigantis*, *Ruegeria sp.* y *Photobacterium lutimaris*. De estas especies *Vibrio splendidus* ha sido directamente asociado con una enfermedad similar en las ostras del género *Crassostrea* y otros bivalvos. El análisis histológico mostró infiltración de hemocitos y necrosis en el tejido en contacto con la lesión. Esta información alerta sobre la necesidad de adoptar medidas de bioseguridad para evitar la dispersión del problema.

Palabras Clave: *Nodipecten subnodosus*, deformaciones de la concha, vibriosis, *Vibrio splendidus*.

ABSTRACT of the thesis by **JENNIFFER NADESHDA VILLALVA VEGA**, presented as a partial requirement for obtaining the **MASTER IN SCIENCE** degree in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, Mexico. September, 2011.

Characterization of bacteria associated with lesions of the shell of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), cultured in Bahía Tortugas, B. C. S., Mexico

The cultivation of the lion's paw clam *Nodipecten subnodosus* has been presented as a possible alternative for the economic development of the peninsula of Baja California. Currently cultivated in some localities in the region with varying degrees of success. Although the presence of parasites and diseases can adversely affect their culture, this aspect has received little attention. Recently grown specimens were found in Bahía Tortugas, Baja California Sur with deformations in the shell and brown deposits on the inside of the shell associated with low growth and high mortality rates. The deformations were characterized from the analysis of the shell and cover the deposits of brown on the inside. In addition, studies were carried out bacteriological and histopathological in order to determine whether there might be an association of these lesions with the presence of bacteria and if the adjacent soft tissue abnormalities. The results showed that deformations occur at the outer edge of the shell while deposits brown, nature chitinolytic, occur on the inside of the shell covering of $6.18 \pm 0.64\%$ to $61.70 \pm 3.64\%$ of the total area of the inside of the shell. Bacteriological analysis, carried out using conventional methods and DNA analysis, using a conserved region of the 16S rDNA gene, showed that dominant bacteria were *Vibrio splendidus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio gigantis*, *Ruegeria sp.* and *Photobacterium lutimaris*. From them, *Vibrio splendidus* has been directly associated with a similar disease in oysters from the genus *Crassostrea* and other bivalves. Histological analysis showed hemocyte infiltration and necroses in the tissue in contact with the lesion. All this information alerting on the need to take biosecurity measures to avoid dispersion of the problem.

Key words: *Nodipecten subnodosus*, deformation of the Shell, vibriosis, *Vibrio splendidus*.

DEDICATORIA

A Dios.

Porque es en él donde comienza el arte de vivir.

A Heriberto Hernández Alberto.

*Por todo el amor que me brindas,
por los sueños que hemos compartido,
porque estuviste a mi lado en todo momento.*

A mis papás Julia Vega Aguilar y Nazario Villalva López.

Por permitirme realizar este sueño pero sobre todo por nunca darme la espalda.

*He vivido una vida repleta de problemas, pero no son nada comparado
con los problemas que tuvieron que afrontar mis padres para lograr que mi vida empezase.
(Bartrand Hubbard).*

A mis hermanos Tanya y Lenin.

*por todo su apoyo, por cada palabra que me brindaron,
perdón por los momentos que no estuve con ustedes.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de posgrado.

A mi Director de Tesis, Dr. Jorge Cáceres Martínez, por ser un entusiasta de su trabajo, por su dedicación, interés, por su empeño, por su capacidad académica, por la dirección de este proyecto. Gracias Doc.

A los miembros del comité de tesis: Dra. Rebeca Vásquez Yeomans, Dra. Carmen Paniagua Chávez y Dr. Ernesto García Mendoza, por sus comentarios y sugerencias para la realización de esta tesis, así como su gran disposición para solucionar mis innumerables dudas.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por todo el apoyo brindado durante mi estancia como estudiante, en particular al Departamento de Acuicultura. A cada uno de mis profesores por enseñarme algo nuevo cada día, en especial a la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por cada una de sus palabras, por ser un ejemplo para mi vida.

A la empresa MARIMEX del Pacífico S.A. de C.V. por su apoyo e interés en este proyecto, por permitirme realizar el muestreo y otorgarme las almejas para esta tesis.

Al Instituto de Sanidad Acuícola, A. C., en donde logré concretar parte de mi tesis.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por su apoyo técnico, orientación y sus consejos.

A la M. en C. Gissel Dalila Tinoco Orta, por su apoyo en laboratorio, asesoría y apoyo técnico.

Al M. en C. Adrián Mauricio García Ortega, por su tiempo y apoyo en esta tesis.

A mis compañeros de generación de Maestría, Lilian, Ceres, Claudia, Yosef, Fernando, Ananda, Sergio y Tzitziki por el tiempo que pasamos juntos en esas largas noches de estudio y trabajo. A Tere y Miki por todos los momentos.

A mi familia: Julia, Nazario, Tanya, Lenin, Anatoli, porque a pesar de la distancia, de las diferencias y de las decisiones, nunca dejaron de apoyarme, en todo y por todo. A mi amor Heriberto por su apoyo y ayuda en todo momento.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	x
Capítulo I. Introducción	
I.1 Acuicultura de los moluscos.....	1
I.2 Almeja Mano de león.....	2
I.3 Morfología y Anatomía.....	3
I.4 Ciclo de vida.....	4
I.5 Pesquería y cultivo de <i>Nodipecten subnodosus</i>	5
I.6 Parásitos y enfermedades de <i>Nodipecten subnodosus</i>	8
Capítulo II. Hipótesis, Objetivos	
II.1 Hipótesis.....	11
II.2 Objetivo General.....	11
II.3 Objetivos particulares.....	11
Capítulo III. Materiales y Métodos	
III.1 Área de Estudio.....	12
III.2 Toma de muestra.....	13
III.3 Análisis del grado de lesión en la concha.....	13
III.4 Técnicas de diagnóstico.....	15
III.4.1 Análisis bacteriológico.....	15
III.4.2 Análisis histológico.....	16
III.4.3 Análisis Molecular.....	17
III.4.3.1 Extracción y purificación de ADN.....	17
III.4.3.2 Preparación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
III.4.3.3 Análisis de secuenciación.....	19

CONTENIDO (continuación)

	Página
Capítulo IV. Resultados	
IV.1 Caracterización del grado de lesión de la concha.....	20
IV.2 Análisis histopatológico.....	23
IV.3 Análisis bacteriológico.....	26
IV.4 Análisis Molecular.....	27
IV.4.1 Amplificación del gen 16S DNAr.....	27
IV.4.2 Análisis de secuenciación.....	28
Capítulo V. Discusiones, Conclusiones, Recomendaciones	
V.1 Discusiones.....	31
V.2 Conclusiones.....	37
V.3 Recomendaciones.....	38
Capítulo VI. Bibliografía	39
Apéndice	47

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución de la almeja Mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> . De acuerdo a Keen, 1971	2
2	Morfometría de la almeja Mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> . Tomado de Maeda-Martínez, 2001	3
3	Anatomía general de los pectínidos (A) y de <i>Nodipecten subnodosus</i> (B). Modificado de Osuna, 2004	4
4	Ciclo de Vida de <i>Nodipecten subnodosus</i> . Tomado de Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996	5
5	Ubicación de las empresas y cultivos pilotos-experimentales de Productores de <i>Nodipecten subnodosus</i> : 1) Acuacultura Integral S. A. de C. V., 2) Marimex del Pacífico S. A. de C. V., 3) Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera de Bahía Tortugas S. C. L., 4) Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera La Purísima S. C. L., 5) CIBNOR S.C., 6) Universidad de Sonora, 7) Maricultura del Pacífico. Modificado de Mazón-Suastegui <i>et al.</i> , 2003	7
6	Localización de Bahía Tortugas. Mapa tomado de www.earth.google.es	13
7	Concha de almeja Mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> y su respectivo molde de papel aluminio, utilizado para determinar el área de la lesión de la concha. La flecha señala el área dañada utilizada para determinar el porcentaje de cobertura de la lesión	14
8	Porcentajes de valvas dañadas de acuerdo al grado de depositación tanto en la valva izquierda como en la valva derecha, los depósitos marrones a partir del porcentaje de cobertura de las valvas son: 1) del 1 al 10 %, 2) del 11 al 24 %; 3) del 25 al 40 % y 4) del 41 a 80 %	21

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
9	Ubicación de los depósitos marrones tanto en la valva izquierda como en la derecha: A) Valvas sin afectación; B) Grado 1; C) Grado 2; D) Grado 3; E) Grado 4. * Posición del depósito: A-C-P = Anterior-Centro-Posterior; P-C-A = Posterior-Centro-Anterior; P-C = Posterior-Centro; C-A = Centro-Anterior	22
10	Corte transversal del manto en un organismo sano. A) Vista general del manto y epitelio (e) con fibras musculares (fm), en la imagen; B) se pueden apreciar los pliegues epiteliales (pe) y los núcleos de las células epiteliales (nce), así como fibras musculares (fm) y gránulos de melanina (gm), en C) se muestra un acercamiento de la zona con gránulos de melanina en la cual se pueden apreciar los núcleos de las células epiteliales que macroscópicamente corresponde a un borde dorsal uniforme del epitelio. Corte a 5 µm. Tinción HE/F	24
11	Corte transversal del manto adjunto a la lesión de la concha en un organismo con lesión de grado 4. A) Acercamiento de la zona media del manto con algunas fibras musculares (fm), en la mayoría del borde del epitelio se aprecian los gránulos de melanina (gm); B) Vista panorámica del manto, donde se puede observar infiltración hemocitaria (Ih) y el tejido totalmente necrosado; C) Acercamiento de la infiltración hemocitaria con hemocitos hipertrofiados (Hh), así como la destrucción de la estructura normal del borde epitelial. Corte a 5 µm. Tinción HE/F	25
12	Resultado de la técnica de PCR para la detección del gen 16S ADNr (tamaño aproximado 1,500 pb). Carriles 1 y 13 Marcador molecular de 0.1 a 3 Kpb (Invitrogen); 2 y 14) Control positivo (ADN genómico <i>Vibrio harveyi</i>); 3 y 15) Control negativo (agua grado biología molecular estéril); 4 a 9) Muestras positivas de depósitos marrón, 10 a 12 y 16 a 17) Muestras positivas de manto, 18 a 21) Muestras positivas de fluido intervalvar, 22 a 24) Muestras positivas del agua de la zona del cultivo	27

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13	Árbol filogenético (método de Neighbor-Joining) de las secuencias obtenidas para el gen 16S ADNr de las bacterias aisladas de <i>Nodipecten subnodosus</i> con secuencias obtenidas de GenBank. Secuencia de organismo sano (MC), secuencias del Manto (3M3, 3M1, 2M1, 2M2V, 1M3K), secuencias de depósitos marrón (3CQ3, 3CQ2A, 3CQ2K, 2CQ2, 3CQ1, 1CQK), secuencias de fluido intervalvar (4L1, 3L2, 2L1V, 1L1V) secuencias de Agua de la zona de cultivo (AGC, A2AA, 1BV).	30

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Parásitos y enfermedades de especies de pectínidos reportados en Iberoamérica. Modificado de Cáceres-Martínez, 2001.	9
II	Componentes para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del gen 16S ADNr. Tomado de García, 1997.	18
III	Condiciones de amplificación para la detección del gen 16S ADNr. Tomado de García, 1997.	19
IV	Composición nucleotídica de las secuencias analizadas del gen 16S DNAr de las muestras de almeja Mano de león.	28
V	Comparación por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de las secuencias obtenidas del gen 16S DNAr.	29

Capítulo I

Introducción

I.1 Acuicultura de los moluscos

De acuerdo con las estadísticas de la FAO (2008), la contribución de la acuicultura al suministro mundial de pescado, crustáceos y moluscos, aumentó del 3.9 % de la producción total en peso en 1970 a un 36 % en 2006. Este crecimiento se ha reflejado en la generación de alimentos de alto valor nutritivo, empleos, insumos para la industria alimentaria, divisas y ha promovido la protección y conservación de especies en peligro de extinción (Funge-Smith y Phillips, 2001; Swick y Cremer, 2001). En las estadísticas mencionadas, se indica que a nivel mundial, la tasa media de crecimiento de este sector ha sido del 8.7 % al año desde 1970, mientras que la pesca de captura ha crecido solamente a razón del 1.2 % y los sistemas de producción de carne de cría en tierra, un 2.8 %. De los grupos de especies que se cultivan, los peces contribuyen con el 56.96 %, seguido de los moluscos con el 27 %. Con relación a los moluscos, la producción mundial alcanzó un máximo de casi 14.1 millones de toneladas métricas en 2006.

Un grupo importante de los moluscos bivalvos lo integra la familia Pectinidae, con 400 especies distribuidas mundialmente; de éstas los géneros *Placopecten*, *Argopecten*, *Patinopecten*, *Chlamys* y *Pecten*, son de interés comercial y en general se encuentran sobreexplotados, lo que ha incentivado la investigación y el desarrollo de su cultivo (Félix-Pico *et al.*, 2003). En el litoral del Pacífico mexicano se consideran de importancia económica a la almeja Voladora *Euvola vogdesi*, la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* y la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* (Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996). Esta última es actualmente la de mayor potencial acuícola debido a su rápido crecimiento y al consumo de su músculo abductor, comúnmente conocido como “callo”

que tiene un alto valor comercial (García-Pamánés, 1994). A continuación se mencionan las características, taxonomía, distribución geográfica, biología e importancia económica de esta especie.

I.2 Almeja Mano de león

Nodipecten subnodosus (Sowerby, 1835), pertenece al Phylum mollusca, Clase bivalvia y a la Familia Pectinidae (Morse y Zardus, 1997), comúnmente se le conoce como almeja Mano de león o garra de león. Es un organismo epibentónico que habita en lagunas, bahías y canales de más de 6 m de profundidad donde ocurren fuertes corrientes de marea. Se distribuye desde la Laguna Ojo de Liebre en la península de Baja California Sur, México, hasta las costas de Paita, Perú, incluyendo islas oceánicas como Galápagos y Revillagigedo (Fig. 1; Maeda-Martínez, 1990). Se caracteriza por poseer una concha muy grande, fuerte, gruesa, y sólida (Fig. 2). Reposa en el fondo marino sobre su valva izquierda, principalmente en sustratos arenosos, pero no son sésiles, ya que como menciona Mazón-Suástegui (1996), algunos pectínidos pueden desplazarse nadando mediante la acción de corrientes enérgicas de agua que salen por las aurículas y que son provocadas por la contracción brusca del músculo abductor y el correspondiente cierre de las valvas, por tal motivo, en algunos países los pectínidos son conocidos como almejas peregrinas o almejas voladoras.



Figura 1. Distribución de la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus*. De acuerdo a Keen, 1971.

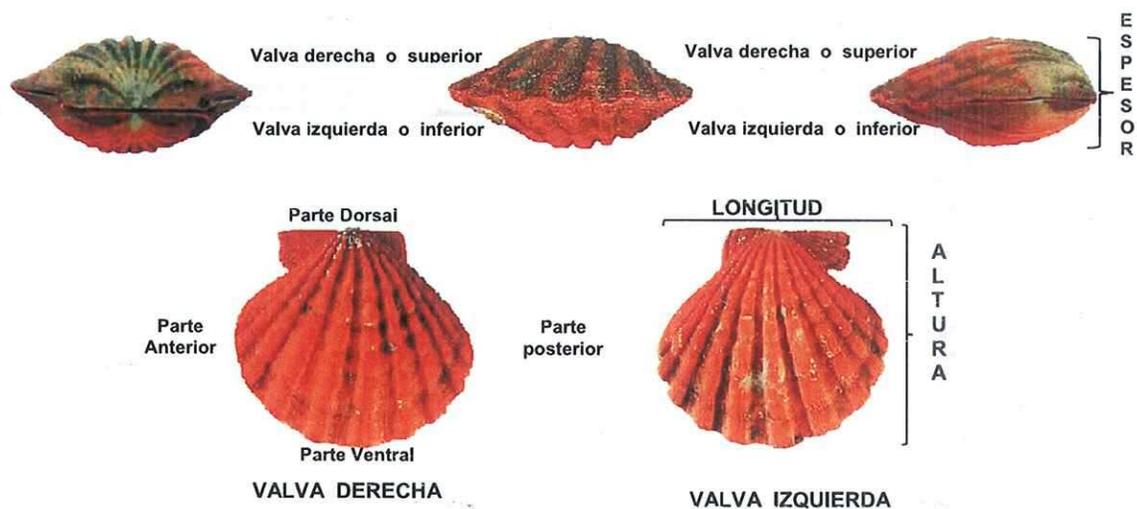


Figura 2. Morfometría de la concha de *Nodipecten subnodosus*. Tomado de Maeda-Martínez, 2001.

I.3 Morfología y Anatomía

La concha de la almeja Mano de león es curva y más o menos circular, con variedad de colores que van desde naranja, café, negro, blanco hasta el morado y con apariencia moteada en combinaciones diversas. Los distintivos importantes para la diferenciación de la especie son tres: (1) su tamaño, ya que se le considera la especie más grande y pesada de América tropical. Puede alcanzar una altura de 220 mm (Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996), (2) las orejas que son inequilaterales, ya que la anterior es más larga que la posterior y (3) los nodos huecos en la valva izquierda alternativamente sobre las costillas (9 a 10) la valva derecha carece de nodos, de donde deriva su nombre común porque se asemeja a una mano o garra de león (Félix-Pico *et al.*, 2003). Los detalles generales de la anatomía de los pectínidos se describen en la Figura 3.

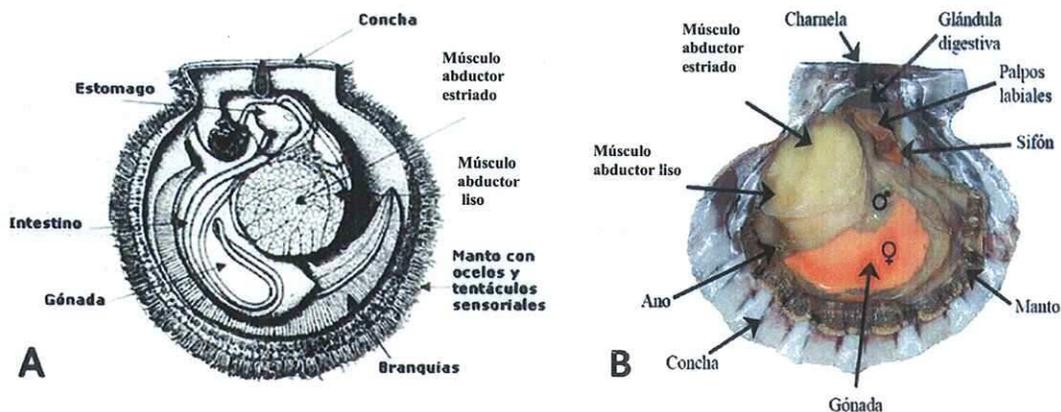


Figura 3. Anatomía general de los pectínidos (A) y de *Nodipecten subnodosus* (B). Modificado de Osuna, 2004.

El músculo abductor es de color blanco cremoso, su función es la de permitir el cierre y la apertura de sus valvas y por ende la locomoción y almacenamiento de sustancias de reserva en forma de glucógeno y es precisamente esta sustancia la que le confiere una consistencia especial y sabor al músculo o callo (Chung y Merrit, 1991). La coloración de la gónada es debido a que *Nodipecten subnodosus* es hermafrodita funcional, por lo que el esperma y los óvulos se encuentran simultáneamente dentro de la gónada, constituida por dos porciones sexuales, que en condiciones de madurez sexual, se diferencian, en una región anterior testicular de color blanco-lechoso (♂) y una región posterior ovárica de color rojo-naranja (♀) que ocupa la mayor parte de la gónada (Fig. 3). La función de la gónada es la formación de células germinales, utilizando para ello la energía almacenada en determinados órganos, entre ellos el músculo abductor (Barrios-Ruiz *et al.*, 2003).

I.4 Ciclo de Vida

Una vez que los adultos alcanzan una madurez sexual, liberan sus gametos en el agua de mar, donde se produce la fecundación y se inicia el desarrollo embrionario, que dará origen a una larva véliger de charnela recta. Al acercarse el término de su vida pelágica, la larva sufre una reducción en el tamaño del velo y desarrolla una mancha ocular,

característica que indica que finaliza su vida nadadora, por lo que requiere un sustrato para su fijación, utilizando para ello un organo denominado pie, que extiende hacia afuera de las valvas. A este nivel de desarrollo la larva se denomina pedivéliger porque puede nadar libremente y de manera alterna reptar sobre el sustrato buscando el lugar adecuado para asentarse por medio de secreciones filamentosas producidas por la glándula bisal localizada en el pie (Fig.4). Si las condiciones del sustrato no resultan convenientes la postlarva o juvenil temprano puede deshacerse del biso que le servía de anclaje y desplazarse a otro lugar donde podrá asentarse nuevamente, ya que la glándula bisal sigue siendo funcional en los juveniles y preadultos, pero pierde su función en el adulto (Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996).

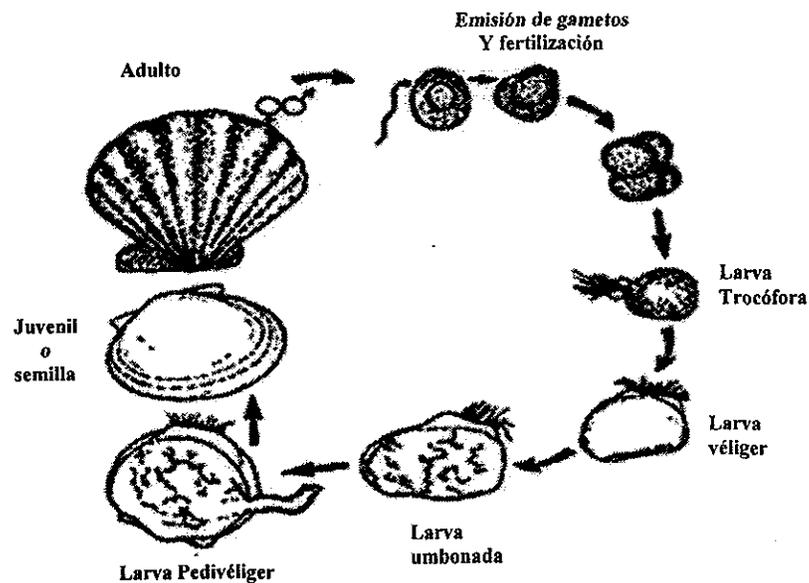


Figura 4. Ciclo de Vida de *Nodipecten subnodosus*. Tomado de Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996.

I.5 Pesquería y cultivo de *Nodipecten subnodosus*

Desde los años 80's, en la costa de Baja California Sur, la pesquería de los pectínidos ha sido una actividad muy importante. Esta pesquería está conformada por tres especies:

Pecten vogdesi, *Argopecten circularis* y *Nodipecten subnodosus*. Se tienen registros de producción de *Nodipecten subnodosus* en la laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur, México desde 1991 manteniendo una pesquería que en 1991 superó las 150 toneladas métricas de músculo (Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1996).

La captura de la almeja Mano de león, al igual que para otros pectínidos, involucra técnicas de buceo con equipo semiautónomo. El motorista localiza el banco de almeja y se posiciona para que el buzo se sumerja equipado con una bolsa de malla o java donde coloca el producto que recoge a mano. Una vez que la java se llena, ésta se envía a la embarcación y se traslada a la playa para llevar a cabo el proceso de desconchado. El producto del desconchado es el músculo abductor que se lava, se clasifica por tallas, se coloca en bolsas de plástico y se enhiela o se congela para ser enviado al mercado (Morales y Galván, 1990).

La almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* tiene una gran demanda comercial a nivel internacional debido al sabor de su músculo. Su importancia económica, ha provocado una sobreexplotación de este recurso en los diferentes cuerpos de agua de la península de Baja California, debido a ello su abundancia ha disminuido al grado de que su pesquería se ha restringido (Félix-Pico *et al.*, 1999). Con fundamento en los estudios del Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) se establece un periodo de veda del 15 de septiembre al 15 de diciembre y una talla mínima de captura de 140 mm de altura en zonas cercanas a Guerrero Negro B. C. S. (INAPESCA, 2010).

El interés creciente por el cultivo de estos organismos se debe a su alto valor económico y su rápido crecimiento (4 mm/día), así como al agotamiento de bancos naturales debido a la sobreexplotación pesquera mencionada anteriormente. A diferencia de otros pectínidos nativos como la almeja Catarina, para *Nodipecten subnodosus* la información sobre su biología y cultivo es limitada, lo cual dificulta su cultivo a escala comercial. La semilla se puede obtener de dos formas, la primera se basa en la captación del medio natural y la segunda en la producción controlada a nivel laboratorio. Los trabajos sobre cultivo de *Nodipecten subnodosus* son muy escasos. Unzueta-Bustamante y Olivias-

Valdéz (1997), evaluaron su potencial de cultivo utilizando la técnica conocida como “Long line” usando redes linterna suspendidas a 2 m en la Bahía de Bacohibampo, Sonora. Los autores, colocaron semilla de 18.2 a 37.7 mm de altura total para su engorda. Probaron diferentes densidades 30, 50, 75 y 200 org/m² manteniendo el cultivo durante 237 días. En este periodo se observó un crecimiento de 11 mm/mes y una supervivencia promedio del 71 %. Por su parte, Barrios-Ruiz *et al.* (2003), utilizaron cajas triangulares de plástico suspendidas a 5 m de la superficie para cultivar experimentalmente a la almeja Mano de león en la Bahía de La Paz, B.C.S., iniciando con organismos de 13.3 mm que durante 13 meses alcanzaron la altura de 54.5 mm y una supervivencia del 44 %.

Actualmente ya existen empresas e instituciones que cultivan *N. subnodosus* a nivel piloto comercial y comercial como son: Universidad de Sonora, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., Acuacultura Integral S. A. de C. V, Marimex del Pacífico S. A. de C. V, Maricultura del Pacífico, Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera de Bahía Tortugas S. C. L., Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera La Purísima S. C. L. (Fig. 5; Mazón-Suástegui *et al.*, 2003).

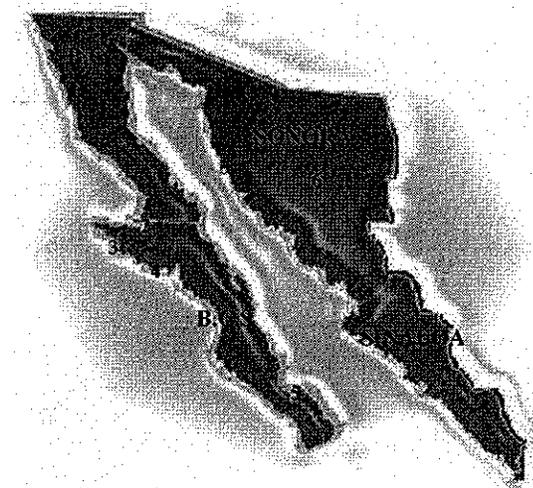


Figura 5. Ubicación de las empresas y cultivos pilotos-experimentales de Productores de *Nodipecten subnodosus*: 1) Acuacultura Integral S. A. de C. V., 2) Marimex del Pacífico S. A. de C. V., 3) Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera de Bahía Tortugas S. C. L., 4) Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera La Purísima S. C. L., 5) CIBNOR S.C., 6) Universidad de Sonora, 7) Maricultura del Pacífico. Modificado de Mazón-Suastegui *et al.*, 2003.

I.6 Parásitos y enfermedades de *Nodipecten subnodosus*

Los parásitos y enfermedades es uno de los problemas que puede enfrentar el cultivo de pectínidos, como el cultivo de cualquier otro bivalvo. Si bien los parásitos y enfermedades ocurren de manera natural como un mecanismo de control de las poblaciones, en condiciones de cultivo su presencia puede provocar pérdidas económicas y en el peor de los casos, la desaparición de la actividad (Cáceres-Martínez, 2007). Los parásitos y enfermedades son difíciles de detectar en el medio natural a menos que ocurran epizootias, por lo que en muchas ocasiones han sido poco estudiados (Barbosa *et al.*, 2001).

Un parásito es un organismo o un virus que vive en íntima relación con otro organismo vivo del cual utiliza un aporte esencial para su existencia sin proporcionarle ningún beneficio. El término parásito y patógeno no necesariamente significan lo mismo, el primero indica el modo de existencia de un organismo o un virus, mientras que el término patógeno se refiere al parásito capaz de causar una enfermedad. De este modo, un parásito puede convertirse en un patógeno cuando se rompe el equilibrio de interacción entre el parásito y su hospedero provocando una enfermedad (Cáceres-Martínez, 2001).

Al concentrar gran cantidad de organismos en una zona, como es el caso de un cultivo y debido a la operación del mismo (ej. manejo inapropiado de desechos), se puede incrementar la prevalencia e intensidad de parásitos y enfermedades (Harvell *et al.*, 1999). Las bacterias patógenas se encuentran entre los principales agentes causales de enfermedades y condiciones de mala calidad del agua y el estrés de los hospederos, favorecen su desarrollo. La proliferación excesiva de bacterias patógenas, asociadas a malas condiciones de cultivo, puede provocar enfermedades en los organismos.

Entre las bacterias que habitan normalmente los ecosistemas costeros, algunas pertenecientes al género *Vibrio* son consideradas el problema más común y serio en el cultivo de moluscos, ya que causan enfermedades y mortalidades masivas, particularmente en los estadios larvales de moluscos bivalvos (Sindermann, 1990). No solo las bacterias

causan enfermedades en los moluscos bivalvos y en particular en pectínidos, también podemos encontrar virus, protozoos y metazoos (Tabla I).

Tabla I. Parásitos y enfermedades de especies de pectínidos reportados en Iberoamérica. Modificado de Cáceres-Martínez, 2001.

Grupo de simbiote/ especie de pectínidos	Parásito	País	Enfermedad	Referencia
Virus				
<i>Nodipecten subnodosus</i>	Herpesvirus	México		Cáceres-Martínez <i>et al.</i> , 2010
Bacterias				
<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Moraxella</i> sp.	Chile	Infección bacteriana (larvas)	Riquelme <i>et al.</i> , 1995 Riquelme <i>et al.</i> , 1996
<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i>	Chile	Vibriosis larval	Riquelme <i>et al.</i> , 1995 Riquelme <i>et al.</i> , 1996
<i>Argopecten ventricosus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	México	Vibriosis larval	Sainz <i>et al.</i> , 1998
Gusanos anélidos				
<i>Argopecten purpuratus</i> <i>Argopecten ventricosus</i> <i>Nodipecten subnodosus</i>	<i>Polydora</i> sp.	Chile, México	Infestación por polidora	Basilio <i>et al.</i> , 1995 Oliva <i>et al.</i> , 1986 Cáceres-Martínez <i>et al.</i> , 2010
<i>Argopecten ventricosus</i> <i>Nodipecten subnodosus</i>	Hypotrichinidae	México	Infestación por planarias	Garduño, 1999
<i>Argopecten purpuratus</i> <i>Argopecten ventricosus</i>	Hirudineo, Larvas de céstodos	Chile, México	Parasitismo por gusanos	Oliva <i>et al.</i> , 1986 Garduño, 1999
<i>Argopecten ventricosus</i> <i>Nodipecten subnodosus</i>	<i>Echinocephalus</i> sp. <i>Echinocephalus</i> <i>pseudouncinatus</i> ?	México	Parasitismo por Echinocephalus	Gómez del Prado, 1982
Crustáceos				
<i>Argopecten ventricosus</i>	<i>Tumidoteres margarita</i>	México	Infestación por cangrejo chicharo	Garduño, 1999
<i>Argopecten ventricosus</i>	<i>Pseudomiycola spinosus</i>	México	Infestación por copépodos	Garduño, 1999

Con relación a la almeja Mano de león, destaca la presencia de esponjas perforadoras del género *Cliona* tales como *Cliona celata* y *Cliona vastifica* las cuales, sin ser verdaderos parásitos, causan diminutas perforaciones en la concha, que puede volverse porosa y quebradiza. Cuando las espículas de la esponja alcanzan la cara interna de la concha, esta

secreta capas de conchiolina y calcita para cubrir la perforación, si la perforación ocurre al nivel del músculo abductor, el cierre de la valvas puede verse comprometido facilitando el acceso de depredadores (Cáceres-Martínez, 2001). Las perforaciones también pueden ser causadas por poliquetos principalmente del género *Polydora*. Las larvas de estos helmintos se asientan sobre la concha y comienzan su acción perforadora que culmina en un canal ramificado o en forma de U con dos orificios de comunicación con el exterior, cuando estos canales alcanzan la cara interna de la concha y llegan al manto; este secreta capas de conchiolina y calcita para aislar al gusano formando una ampolla. En infestaciones severas la concha se vuelve quebradiza, si las perforaciones alcanzan la zona del músculo abductor se pueden presentar infecciones por bacterias que pueden causarle la muerte (Cáceres-Martínez *et al.*, 1998; Félix-Pico, 1993).

Recientemente en las almejas cultivadas en Bahía Tortugas, B.C.S. se han presentado deformidades y rupturas en la concha. Las características externas de las lesiones, las deformaciones, ruptura de las valvas y el depósito de color marrón sugieren que podrían estar relacionados con desarrollo bacteriano ya que, lesiones similares se han presentado en otros moluscos bivalvos tales como *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* y *Pecten maximus*. En este sentido, la finalidad del presente trabajo es identificar a las bacterias asociadas con las lesiones y deformaciones de la concha en la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus*.

Capítulo II

Hipótesis, Objetivos

II.1 Hipótesis

Las lesiones y deformaciones de la concha de la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* están asociadas con la presencia de bacterias.

II.2 Objetivo General

- ❖ Caracterizar las lesiones de la concha de la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus*, así como determinar la posible presencia de bacterias asociadas a las mismas y, en su caso, identificarlas mediante bacteriología convencional y análisis de ADN. Así mismo, describir las lesiones encontradas en el tejido del manto aledaño a las lesiones de la concha.

II.3 Objetivos Particulares

- ❖ Caracterizar la lesión en la concha de *Nodipecten subnodosus*.
 - ❖ Aislar e identificar por métodos bioquímicos convencionales a las bacterias más comunes asociadas con las lesiones encontradas en la concha.
 - ❖ Identificar por medio del análisis del ADN a las bacterias más comunes asociadas con las lesiones de la concha de *Nodipecten subnodosus*.
 - ❖ Describir, a nivel histológico, el daño observado en el tejido del manto aledaño a las lesiones de la concha.
-

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Área de estudio

Bahía Tortugas, es una localidad próxima a Punta Eugenia en el Municipio de Mulegé, Baja California Sur. Su localización geográfica está entre los 114°53'45" W y 27°41'30" N, y a una altitud de 10 msnm.

El cultivo de la almeja Mano de león se encuentra ubicado en la zona norte de la Bahía (Fig. 6) y consiste de una estructura flotante de forma trapezoidal "long line" que consiste en un cabo de polipropileno o nylon de 12 a 16 mm de diámetro y de 100 a 200 m de longitud. Este cabo se llama línea principal (línea madre), el cual se encuentra anclado al fondo, en los extremos, con dos bloques de concreto de 120 kg cada uno, con el fin de que la línea de cultivo no se corra. Ésta se encuentra suspendida entre 3 y 5 m de profundidad mediante boyas superficiales y sumergidas. De ella se desprenden líneas secundarias que mantienen las linternas en la columna de agua. En la parte inferior de cada arte de cultivo se instalan pesos pequeños (2 kg) para que éstas no se enreden y se mantengan siempre suspendidas.

Las redes linterna están construidas con alambre galvanizado calibre 9 y red de nylon con luz de malla de $\frac{3}{4}$ de pulgada. Se elabora una estructura base con hilo y se procede a unir a ella 10 aros, cada 15 cm. formando así los pisos de la linterna, en el extremo de cada una se debe colocar un peso de aproximadamente 2 kg, con el fin de mantenerla tensa mientras se encuentra inmersa en el agua.



Figura 6. Localización de la zona de cultivo de la almeja Mano de león en Bahía Tortugas. Mapa tomado de www.earth.google.es.

III.2 Toma de muestras

Para cumplir con el objetivo planteado, se realizó una visita a la zona de cultivo concesionada a la empresa MARIMEX del Pacífico S. A. de C. V. Con la ayuda del personal de la empresa se extrajeron tres jaulas tipo linternas del cultivo. Se vació el contenido de las jaulas y se seleccionaron 300 almejas con deformaciones y lesiones en la concha. Adicionalmente, se incluyeron 10 almejas sin lesiones por motivos comparativos. Ciento cincuenta almejas se procesaron directamente en las instalaciones de la empresa y 150 almejas se enviaron al Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, de acuerdo a las instrucciones de recolecta (Apéndice II).

III.3 Análisis del grado de lesión de la concha.

Las almejas fueron lavadas, pesadas en una balanza digital y medidas con un vernier. Como hemos mencionado, la concha de la almeja está formada por dos valvas unidas por la

charnela, por lo tanto se realizó el análisis de cada una de las valvas que forman la concha de cada ejemplar. De acuerdo con la apariencia de las valvas en su cara interna, se establecieron cuatro grados de lesión en función del porcentaje relativo de la zona dañada en cada valva. Este porcentaje relativo se estimó a partir del cálculo del área superficial total de cada valva. El cálculo se realizó a partir de moldes de papel aluminio y el posterior peso de la fracción del área dañada a partir del recorte del mismo molde. El molde se obtuvo ajustando el papel aluminio a los contornos de la valva, el papel aluminio se recortó cuidadosamente para eliminar el excedente, obteniendo un molde del interior de la concha (Fig. 7; Álvarez-Tinajero, 2000); el molde de papel aluminio se pesó en una balanza analítica y el área se determinó mediante una regresión lineal ajustada por mínimos cuadrados de áreas conocidas de papel aluminio previamente pesadas que generaron la ecuación:

$$x = \frac{y}{0.0042 - 0.0018} \quad (1)$$

Donde y es el peso del molde en gramos y x es el área en centímetros cuadrados. Se obtuvo un valor de $r = 0.997$, es decir, la relación entre el área conocida y el peso del papel aluminio se explica en un 99.7 %.



Figura 7. Concha de almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* y su respectivo molde de papel aluminio, utilizado para determinar el área de la lesión de la concha. La flecha señala el área dañada utilizada para determinar el porcentaje de cobertura de la lesión.

Posteriormente, se recortó el área de la lesión en el molde y se pesó en una balanza analítica, obteniéndose la siguiente relación:

(2)

$$\% \text{ de cobertura de la lesión} = \frac{\text{Peso del área de la lesión}}{\text{Peso del molde}} * 100$$

Se determinó la ubicación de los depósitos marrones, tanto para la valva izquierda como para la derecha, dividiendo la valva en tres zonas: anterior, centro, posterior. La comparación del grado de lesión entre las valvas, se realizó mediante una prueba t de student por medio del programa Statistica, 2008.

III.4 Técnicas de diagnóstico

III.4.1 Análisis Bacteriológico

Se eligieron tres pares de valvas correspondientes a cada uno de los grados de lesión establecidos, así como tres pares de valvas de ejemplares sin lesiones. De cada valva se hizo un raspado de la zona afectada, en condiciones asépticas y mediante el uso de un asa bacteriológica. Así mismo, se obtuvo un frotis del manto contiguo a la lesión, se tomó una muestra del fluido intervalvar así como del agua de la zona de cultivo. Cada muestra se inoculó por separado mediante el método de estría en diferentes placas Petri en medio Agar Marino (AM) y Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) al 2 % NaCl. Los medios se mantuvieron en incubación durante 36 h a temperatura ambiente (23 ± 2 °C). El aislamiento se continuó hasta obtener un solo tipo de colonia, basándose en una revisión macroscópica que incluyó la morfología colonial, coloración, tipo de crecimiento y la consistencia de la colonia (Bergey's Manual, 1994).

La caracterización fenotípica se realizó con pruebas convencionales considerando morfología colonial, tinción de Gram, movilidad, crecimiento en medio selectivo, sensibilidad al agente vibriostático 0/129 y crecimiento a las salinidades 3, 6, 8 y 10 %. Para la caracterización bioquímica se utilizaron las pruebas de citocromo oxidasa y catalasa, fermentación de la glucosa y se empleó el sistema de identificación rápida API20NE (BioMérieux), únicamente a las colonias bacterianas sensibles al agente vibriostático 0/129, siguiendo las instrucciones del fabricante y modificando la solución de dilución con agua de mar estéril.

Una vez que las bacterias se aislaron e identificaron se enviaron al banco de Germoplasma del CICESE, siguiendo la metodología propuesta por Sambrook y Russell (2001) para su preservación a -196 °C.

III.4.2 Análisis Histológico

De las almejas seleccionadas previamente, tanto para la caracterización de la concha como para el análisis bacteriológico, se obtuvo una fracción del manto en contacto con la lesión de la concha, que se colocó en un casete histológico y se fijó en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957; Apéndice III) por 24 h. Posteriormente los casetes con las muestras se colocaron en un procesador automático de tejidos para su deshidratación con cambios graduales de etanol (70 % hasta etanol absoluto) y se incluyeron en parafina utilizando un incluidor (Apéndice IV). Los cortes histológicos se hicieron en un micrótopo a 5 micrómetros de espesor. Los cortes obtenidos se colocaron en portaobjetos y se tiñeron mediante la técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina/Floxina (NOAA, 1983; Apéndice V). Las laminillas histológicas se revisaron en un microscopio compuesto para la determinación de la posible presencia de bacterias y daños asociados. La revisión de las muestras se hizo sistemáticamente realizando un barrido de zigzag longitudinal a la posición del corte con los objetivos de 20x, 40x y 100x. Se tomaron fotografías de los tejidos para documentar los daños encontrados.

III.4.3 Análisis molecular

III.4.3.1 Extracción y purificación de ADN genómico

Las colonias aisladas obtenidas de las lesiones correspondientes fueron transferidas a medio líquido Zobell para que, una vez obtenida la densidad óptima, se concentraran para realizar la extracción de ADN. Estas bacterias se cultivaron en tubos de ensayo con agitación continua a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 36 h. En un tubo de microcentrífuga estéril de 1.6 mL, se centrifugó una alícuota de 1.5 mL del cultivo a 12000 rpm por un minuto hasta concentrar a las bacterias. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 500 μ L de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril, 200 μ L de SDS 10 % (dodecil sulfato de sodio) y 10 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) dejándose incubar toda la noche a 56 °C. Después de ese tiempo, se agregaron 500 μ L del reactivo comercial DNAzol® siguiendo el protocolo del fabricante (Research Molecular Center), con la modificación de Chomczynski *et al.* (1997) donde se agregaron 240 μ g de Ribonucleasa pancreática. El tubo se incubó 1 hora a 56 °C homogeneizando cada 15 minutos. Después de ese tiempo, se centrifugó a 12600 rpm por 10 minutos. Se transfirieron 800 μ L de sobrenadante a un tubo nuevo y estéril y se agregaron 200 μ L de cloroformo frío, mezclando en el vórtex por 10 segundos e incubando por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12600 rpm por 10 minutos y se tomaron 600 μ L de la fase acuosa, que se transfirieron a un tubo nuevo y estéril, agregando 800 μ L de isopropanol, mezclando por inversión y se dejó por 30 minutos a -20 °C para precipitar el ADN. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se eliminó por decantación y el ADN precipitado se lavó con alcohol etílico al 70 %. Después se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm y se eliminó el alcohol etílico por decantación. El ADN se secó en la estufa a 56 °C por 10 minutos para eliminar los restos de etanol y el ADN se resuspendió en 300 μ L de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril y se almacenó a -20 °C.

El ADN genómico se detectó por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8 %. Se mezclaron 5 μL del ADN resuspendido con 2 μL del colorante de carga 5X (Xilencianol y Azul de bromofenol en Ficoll). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 3 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicó 100 voltios por espacio de una hora. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel utilizando una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por un tiempo de 10 minutos. Después de ese tiempo, se detectó bajo iluminación ultravioleta.

III.4.3.2 Preparación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los oligonucleótidos utilizados fueron el 16S forward: 5'-CCG-TCG-ACA-GAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TCA-G-3' y el 16S reverse: 5'-CGG-GAT-CCA-CCT-TGT-TAC-GAC-TTC-ACC-C-3', los cuales amplifican un fragmento de 1500 pb, siendo universales para procariontas. Ambos tienen una longitud de 28 nucleótidos y una temperatura de alineamiento de 55 °C. El volumen final de la reacción de PCR se realizó a 25 μL (Tabla II), las condiciones de amplificación se muestran en la tabla III.

Tabla II. Componentes para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del gen 16S ADNr. Tomado de García, 1997.

Componente	Cantidad	Concentración final
Agua destilada estéril	19.75	-
Buffer PCR 10X con cloruro de magnesio 15 mM	2.5	1 X, MgCl ₂ 1.5 mM
Primer Forward (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.5	20 ng/ μL
Primer Reverse (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.5	20 ng/ μL
dNTP's (10 mM)	0.5	200 μM
Taq polimerasa 5 U/ μL	0.25	1.25 U por reacción
ADN cromosomal (50 ng/ μL)	1	-

Tabla III. Condiciones de amplificación para la detección del gen 16S ADNr. Tomado de García, 1997.

Temperatura°C	Tiempo	Evento	Ciclos
95	5 minutos	Desnaturalización inicial	1
95	1 minutos	Desnaturalización	25
55	1 minutos	Alineamiento de los iniciadores	
72	2 minutos	Extensión	
72	10 minutos	Extensión final	1

III.4.3.3 Análisis de secuenciación

Los productos de PCR amplificados se secuenciaron de forma directa en ambas direcciones en la Universidad Estatal de San Diego (SDSU, CSUPERB MicroChemical Core Facility). Las secuencias obtenidas se editaron manualmente utilizando el software Geneious Pro 5.3. Las secuencias fueron comparadas por medio de BLAST con la base de datos del GenBank (banco de genes) para determinar su similitud. Una vez obtenidas las primeras diez secuencias con el mayor porcentaje de similitud y de cobertura, se alinearon con las secuencias consenso obtenidas de los genes de interés amplificados. A continuación, se realizó el árboles filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining por medio del modelo de Tamura-Nei (Kumar *et al.*, 2008).

Capítulo IV

Resultados

IV.1 Caracterización del grado de lesión de la concha

La altura promedio de las almejas estudiadas fue de 3.4 ± 0.5 cm con un peso promedio de 13 ± 0.5 g y una superficie de la cara interna de las valvas de 11.6 ± 0.5 cm². Los depósitos marrones son similares a capas de conchiolina que normalmente conforman el perióstraco. La prueba estadística t de student mostró que no existe diferencia significativa $P > 0.05$ en cuanto a la presencia de los depósitos marrones entre la valva izquierda y derecha.

Las deformaciones se ubican en el borde posterior externo de las valvas, mientras que los depósitos marrones se producen tanto en el borde posterior interno de la cara interna de las valvas como en diferentes zonas de la superficie total de las mismas. Se definieron cuatro grados correspondientes a la cobertura de los depósitos marrón a partir del porcentaje de cobertura de las valvas. Grado 1, del 1 al 10 %, grado 2 del 11 al 24 %; grado 3 del 25 al 40 % y grado 4, del 41 a 80 %. Del total de las valvas analizadas el 55.7 % presentan grado 1, el 20.5 % presentan grado 2, mientras que para el grado 3 y 4 se obtuvieron el 17.3 y 6.5 % respectivamente (Fig. 8). Los depósitos marrones se localizaron en las tres zonas de las valvas; sin embargo, la distribución de los grados fue diferente. El grado 1 se centró en la zona anterior-centro-posterior, mientras que los grados 2 y 3 se localizaron en las zonas anterior-centro-posterior, anterior-centro y centro-posterior. El grado 4, se ubicó en las zonas anterior-centro-posterior y centro-anterior (Fig. 9).

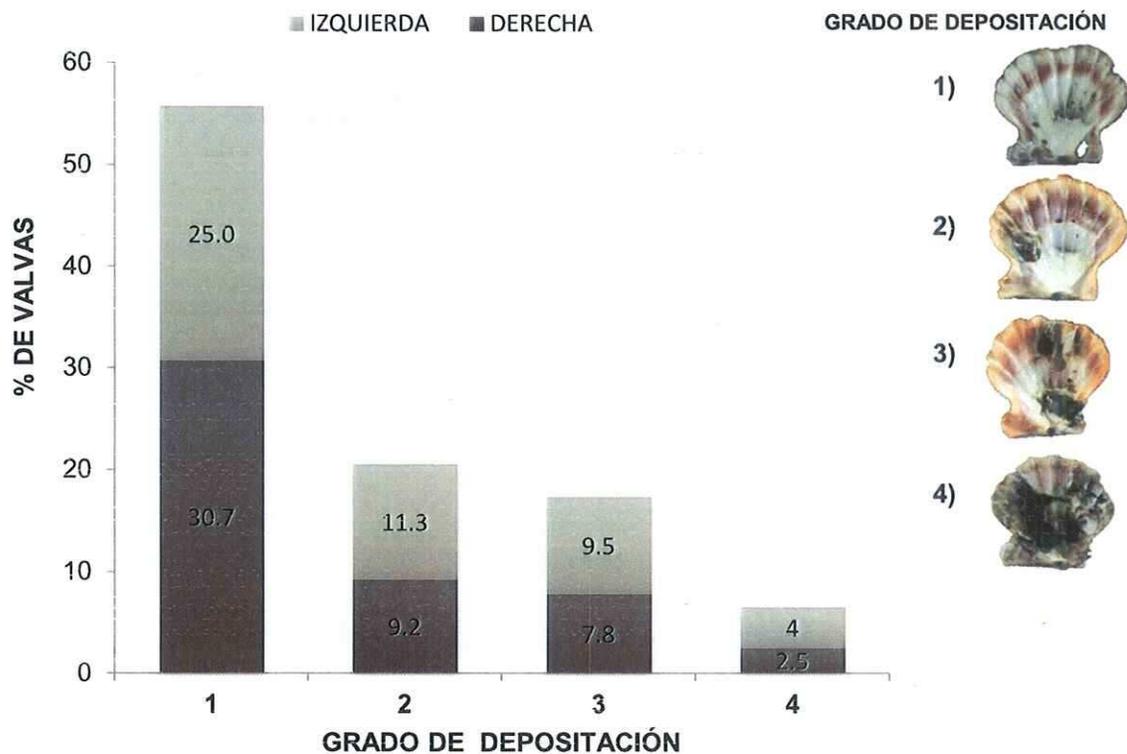


Figura 8. Porcentajes de valvas dañadas de acuerdo al grado de depositación tanto en la valva izquierda como en la valva derecha, los depósitos marrones a partir del porcentaje de cobertura de las valvas son: 1) del 1 al 10 %, 2) del 11 al 24 %; 3) del 25 al 40 % y 4) del 41 a 80 %.

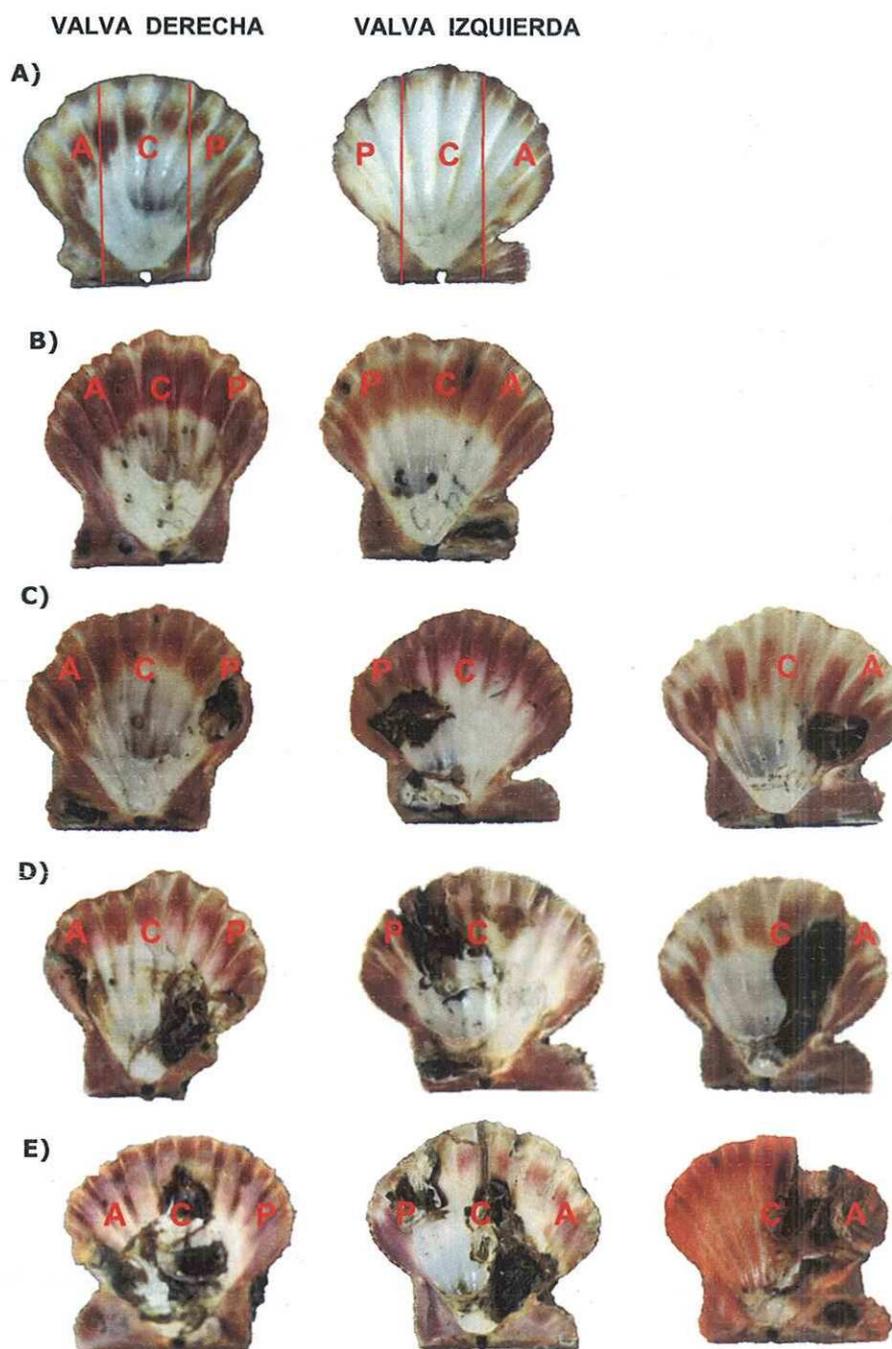


Figura 9. Ubicación de los depósitos marrones tanto en la valva izquierda como en la derecha: A) Valvas sin afectación; B) Grado 1; C) Grado 2; D) Grado 3; E) Grado 4.

* Posición del depósito: A-C-P = Anterior-Centro- Posterior; P-C-A = Posterior-Centro- Anterior; P-C = Posterior-Centro; C-A = Centro-Anterior

IV.2 Análisis Histológico

El análisis del tejido del manto de la almeja control (sin depósitos marrón ni deformaciones) mostró un arreglo normal del tejido conectivo con algunos hemocitos (Fig. 10A). En la zona epitelial apical del manto se observaron células columnares epiteliales uniformes con estructura también uniforme y núcleos bien definidos (Fig. 10B). También se observaron gránulos de melanina con una estructura normal (Fig. 10C).

En el tejido del manto de una almeja con un grado 4, se aprecia la deformación del tejido conectivo y gran cantidad de hemocitos. En la zona epitelial apical, se observan abundantes gránulos de melanina (gm) cubriendo un 80 % del borde epitelial (e). La estructura de los pliegues del manto (pe) no es uniforme y en ciertas zonas ésta se ha perdido por completo (Fig. 11A). En una vista general de la zona media del manto se observa la pérdida de la arquitectura normal del tejido, infiltración hemocitaria (Ih) y necrosis (Fig. 11B). Los hemocitos están hipertrofiados (Hh) y es evidente la pérdida de la estructura original del borde epitelial, donde han desaparecido las células columnares epiteliales y se aprecian aglutinaciones de gránulos de melanina (Fig. 11C).

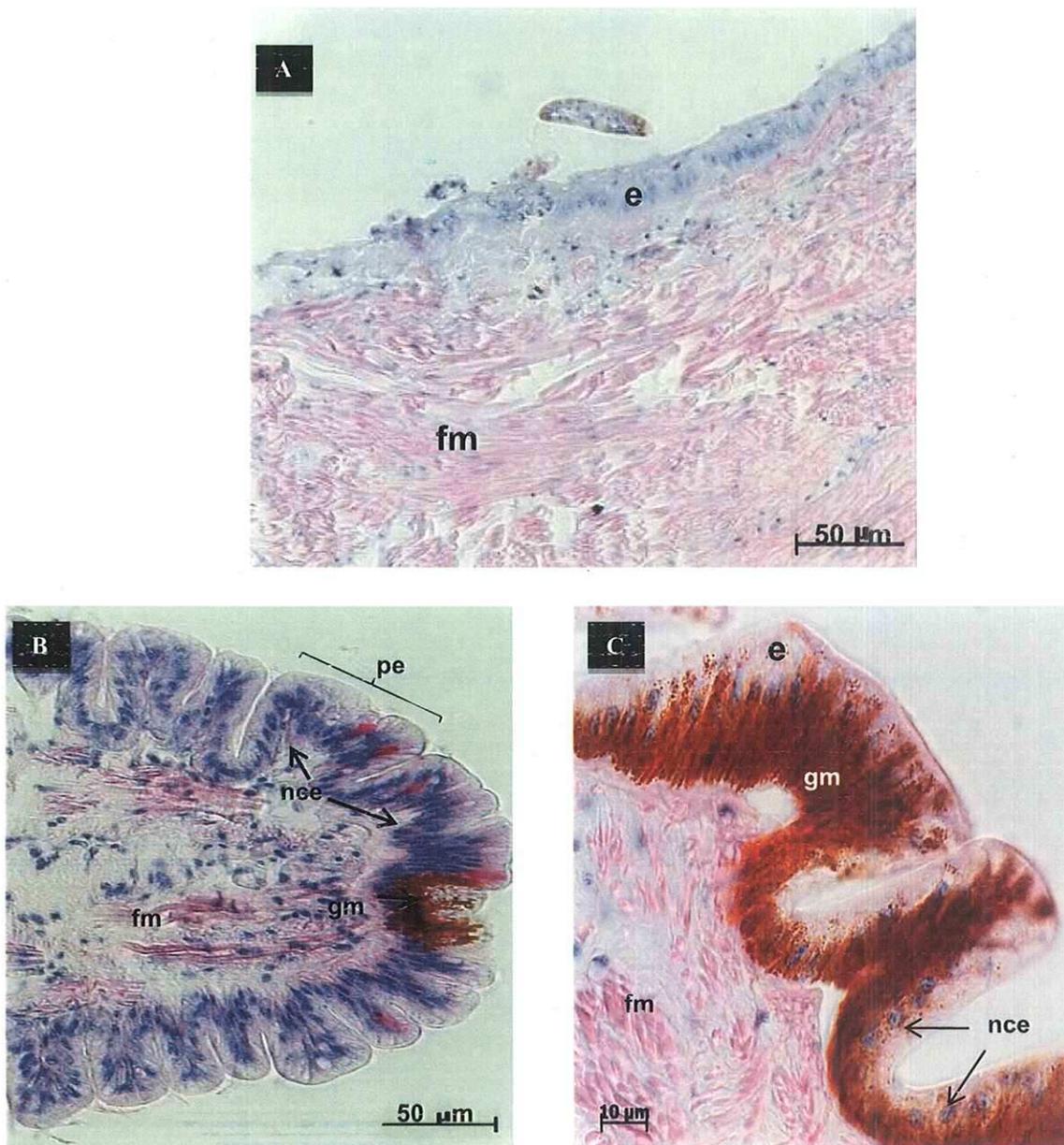


Figura 10. Corte transversal del manto en un organismo sano. A) Vista general del manto y epitelio (e) con fibras musculares (fm), en la imagen; B) se pueden apreciar los pliegues epiteliales (pe) y los núcleos de las células epiteliales (nce), así como fibras musculares (fm) y gránulos de melanina (gm), en C) se muestra un acercamiento de la zona con gránulos de melanina en la cual se pueden apreciar los núcleos de las células epiteliales que macroscópicamente corresponde a un borde dorsal uniforme del epitelio. Corte a 5 µm. Tinción HE/F.

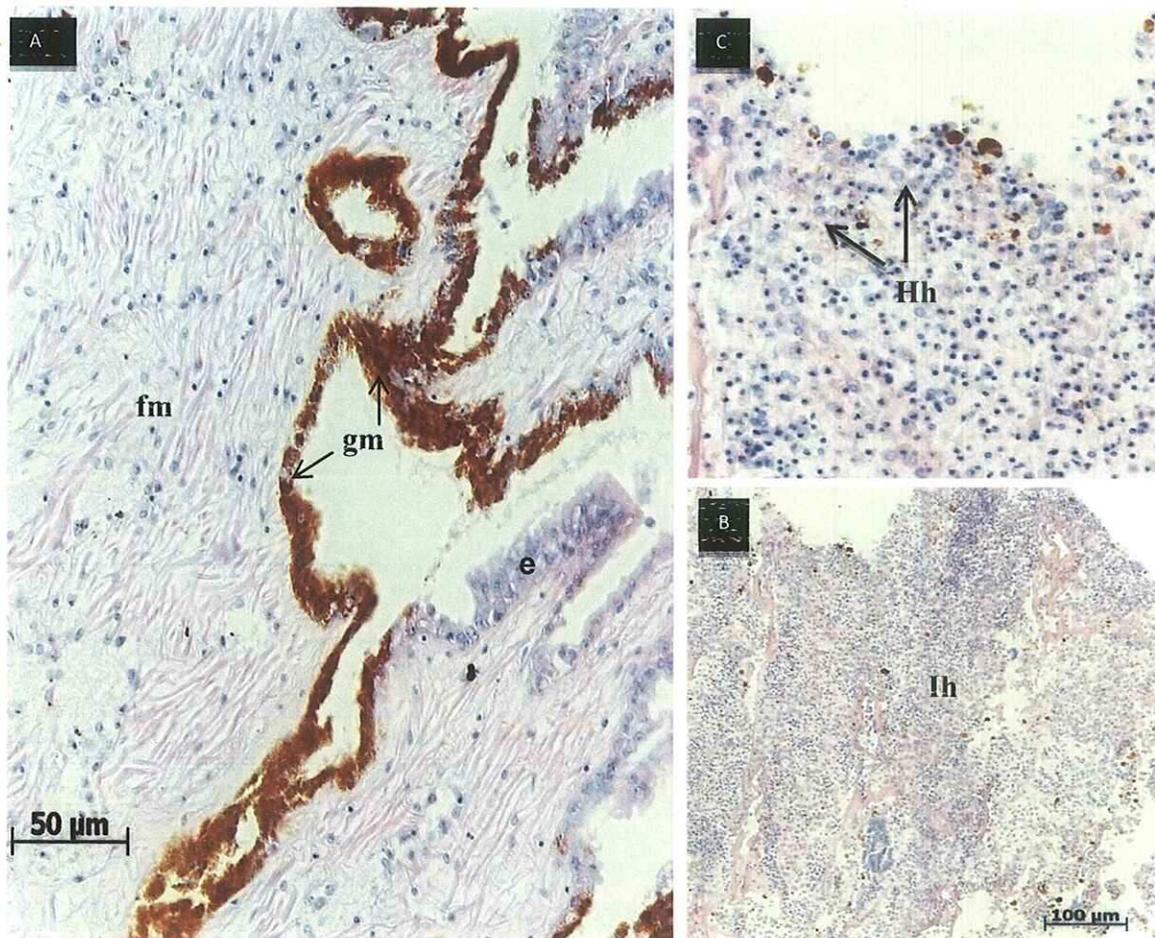


Figura 11. Corte transversal del manto adjunto a la lesión de la concha en un organismo con lesión de grado 4. A) Acercamiento de la zona media del manto con algunas fibras musculares (fm), en la mayoría del borde del epitelio se aprecian los gránulos de melanina (gm); B) Vista panorámica del manto, donde se puede observar infiltración hemocitaria (Ih) y el tejido totalmente necrosado; C) Acercamiento de la infiltración hemocitaria con hemocitos hipertrofiados (Hh), así como la destrucción de la estructura normal del borde epitelial. Corte a 5 μm . Tinción HE/F.

IV.3 Análisis bacteriológico

Del aislamiento de bacterias realizado en las almejas estudiadas, se obtuvieron 48 colonias de las cuales, 16 corresponden a las muestras de depósitos marrones, 13 a muestras del manto, 11 de fluido intervalvar y 8 del agua de la zona de cultivo (Apéndice VI). Las morfologías de las colonias variaron de bacilos cortos con extremos curvos, con un tamaño aproximado de 1.5 μm , cocobacilos de 0.5 μm de tamaño y bacilos cortos con un tamaño de 1.8 μm , todas ellas Gram negativas. Dos colonias aisladas del agua de la zona de cultivo fueron Gram positivas, con una morfología de bacilos largos con un tamaño aproximado de 2.3 μm . Todas las colonias fueron citocromo oxidasa y catalasa positivas.

De las 48 colonias, 18 de ellas fueron sensibles al agente vibriostático 0/129, presentaron movilidad y crecieron en medios preparados con NaCl al 3 y 6 %. Estas bacterias fueron identificadas como *Vibrio* sp. con el kit API20NE.

IV.4 Análisis Molecular

IV.4.1 Amplificación del gen 16S ADNr

De 18 colonias que fueron sensibles al agente vibriostático 0/129, se amplificó el gen 16S ADNr en todos los casos se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1500 pb (Fig. 12).

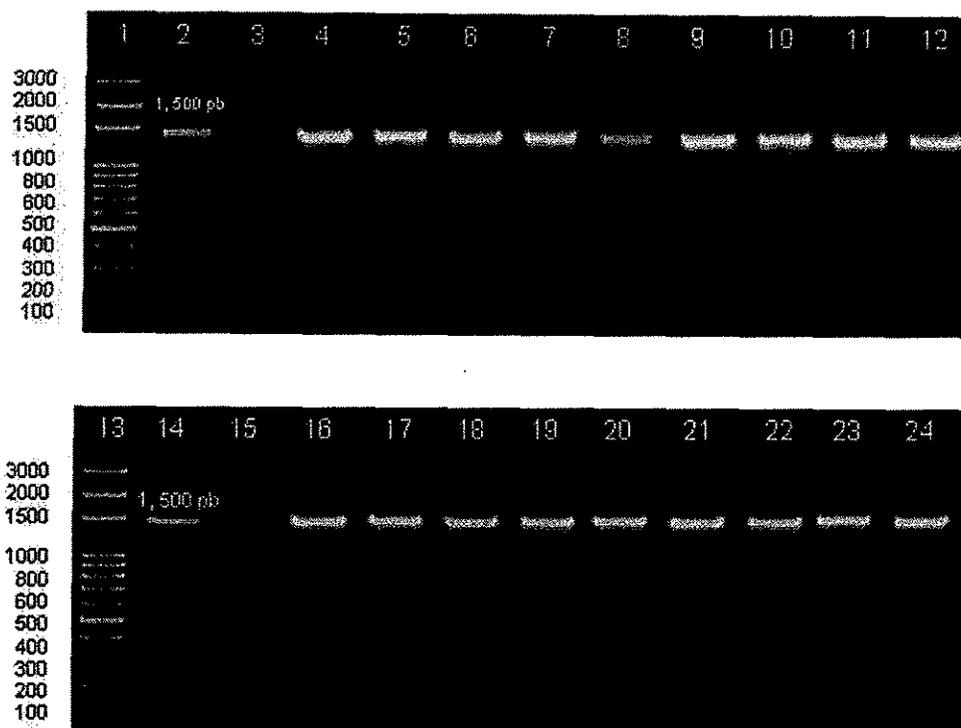


Figura 12. Resultado de la técnica de PCR para la detección del gen 16S ADNr (tamaño aproximado 1,500 pb). Carriles 1 y 13 Marcador molecular de 0.1 a 3 Kpb (Invitrogen); 2 y 14) Control positivo (ADN genómico *Vibrio harveyi*); 3 y 15) Control negativo (agua grado biología molecular estéril); 4 a 9) Muestras positivas de depósitos marrón, 10 a 12 y 16 a 17) Muestras positivas de manto, 18 a 21) Muestras positivas de fluido intervalvar, 22 a 24) Muestras positivas del agua de la zona del cultivo.

IV.4.2 Análisis de secuenciación

El análisis de secuenciación mostro la longitud total de las secuencias así como la composición nucleotídica (Tabla IV).

Tabla IV. Composición nucleotídica de la secuencias analizadas para el gen 16S ADNr de *Nodipecten subnodosus*, T (timina), C (citosina), G (guanina), A (adenina).

SECUENCIAS	T (%)	C (%)	G (%)	A (%)	Total
Depósitos marrón					
3CQ3	20.2	32.4	21.7	25.7	931
3CQ2A	19.9	31.4	19.9	25.2	925
3CQ2K	20.4	32.1	20.4	26.0	922
3CQ1	20.7	32.0	20.7	26.2	873
2CQ2	22.4	32.9	22.4	23.2	237
1CQK	20.3	31.7	22.5	25.5	961
Manto					
3M3	27.9	30.3	21.4	20.4	928
3M1	25.8	32.2	21.8	20.2	924
2M2V	20.4	32.5	21.5	20.6	862
2M1	25.3	33.0	21.3	20.4	906
1M3K	25.3	32.7	21.6	20.4	943
Fluido Intervalvar					
4L1	26.0	32.9	21.1	20.1	901
3L2	25.8	32.5	21.9	19.8	933
2L2V	26.1	32.0	21.1	20.8	870
1L1V	25.8	32.7	21.2	20.3	892
Agua de la zona del cultivo					
AGC	24.1	32.7	21.0	22.1	942
A2AA	24.3	32.7	22.4	20.6	559
A1B	25.7	32.6	21.9	19.7	937
Control	20.4	32.1	20.4	26.0	922

La comparación de las secuencias de *Nodipecten subnodosus* con las secuencias reportadas en el GenBank mostró que presentaron semejanza con los géneros *Photobacterium*, *Ruegeria*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Los valores de cobertura así como de identidad se pueden observar en la Tabla V.

Tabla V. Comparación por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de las secuencias de bacterias obtenidas del gen 16S ADNr con las bacterias aisladas de *Nodipecten subnodosus*.

No de acceso en el GenBank		Cobertura	Identidad
	Depósitos marrón		
HM584062.1	<i>Photobacterium lutimaris</i>	96%	97%
FJ460034.1	<i>Ruegeria</i> sp.	92%	96%
EF474167.1	<i>Vibrio</i> sp.	96%	97%
AY620969.1	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	94%	97%
FM954972.2	<i>Vibrio splendidus</i>	89%	93%
EU091332.1	<i>Vibrio splendidus</i>	99%	96%
	Manto		
EF094888.1	<i>Vibrio splendidus</i>	99%	96%
FJ457378.1	<i>Vibrio gigantis</i>	97%	93%
FJ457573.1	<i>Vibrio</i> sp.	99%	96%
AY620969.1	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	98%	95%
AB550660.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	95%	94%
	Fluido Intervalvar		
AB562594.1	<i>Vibrio</i> sp.	96%	97%
EU834018.1	<i>Vibrio hepatarius</i>	95%	95%
HM584093.1	<i>Vibrio gigantis</i>	95%	98%
EF094888.1	<i>Vibrio</i> sp.	98%	98%
	Agua de la zona del cultivo		
GU726845.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	83%	96%
EU091332.1	<i>Vibrio splendidus</i>	99%	94%
AJ514917.1	<i>Vibrio fortis</i>	93%	96%
	Control		
FJ460034.1	<i>Ruegeria</i> sp.	91%	99%

Se realizó un árbol filogenético de Neighbor-Joining donde el análisis muestra que las cepas se encuentran divididas en ocho grupos: 1M3K con *Pseudomonas* sp.; MC y 3CQ2A con *Ruegeria* sp.; 3CQ3 con *Photobacterium lutimaris*; 3L2 con *Vibrio hepatarius*; AGC y 4L1 con *Vibrio alginolyticus*; 1BV y 3M1 con *Vibrio fortis*; 1L1, 2L1V, 3M3 y 2M2V con *Vibrio gigantis* y *Vibrio splendidus*; 3CQ1, 3CQ2K, 2CQ2, A2AA, 2M1 y 1CQK se encuentran en el grupo de *Vibrio tasmaniensis* (Fig. 13).

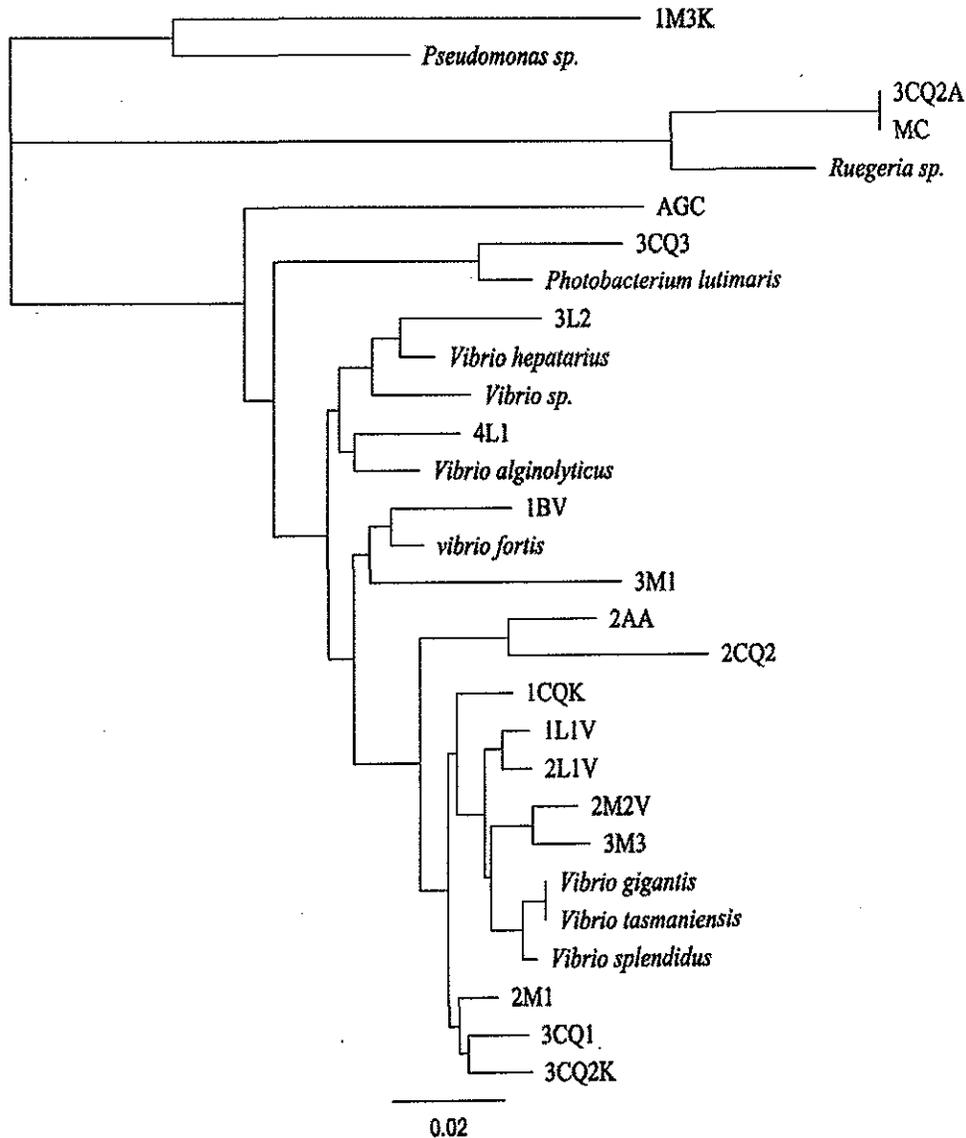


Figura 13. Árbol filogenético (método de Neighbor-Joining) de las secuencias obtenidas para el gen 16S ADNr de las bacterias aisladas de *Nodipecten subnodosus* con secuencias obtenidas de GenBank. Secuencia de organismo sano (MC), secuencias del Manto (3M3, 3M1, 2M1, 2M2V, 1M3K), secuencias de depósitos marrón (3CQ3, 3CQ2A, 3CQ2K, 2CQ2, 3CQ1, 1CQK), secuencias de fluido intervalvar (4L1, 3L2, 2L1V, 1L1V) secuencias de Agua de la zona de cultivo (AGC, A2AA, 1BV).

Capítulo V

Discusiones, Conclusiones y Recomendaciones

V.1 Discusiones

Aunque las bacterias forman parte de la flora autóctona de los organismos marinos y su ecosistema, representando hasta un 60 % de la población de microorganismos totales en algunas lagunas costeras, son una fuente constante de posibles infecciones para moluscos, crustáceos y peces (Robert *et al.*, 1996). En los últimos años, el progreso de la acuicultura ha propiciado la utilización de sistemas de cultivo intensivos, los cuales crean un ambiente artificial que favorece la proliferación de poblaciones bacterianas oportunistas que normalmente se encuentran en el medio marino, tomando ventaja de los cambios ecológicos introducidos (Sindermann, 1990). La proliferación bacteriana en los sistemas de cultivo puede ser favorecida por las altas densidades de organismos, asociado con las condiciones ambientales y el propio manejo de los organismos. Estas altas densidades en el cultivo implican competencia por oxígeno, competencia por alimento, elevadas cantidades de excretas, incomodidad de los organismos por hacinamiento y por el manejo por parte del acuicultor. Estas condiciones estresantes aumentan la susceptibilidad de los organismos a infecciones bacterianas oportunistas como las encontradas en el presente estudio.

Los resultados de este trabajo, mostró la presencia tanto de bacterias no oportunistas, como de bacterias altamente patógenas. Miembros del género *Vibrio* han sido descritos como agentes patógenos oportunistas afectando a todos los estadios del ciclo de vida de los moluscos bivalvos, desde larva, juvenil y adulto (Allam *et al.*, 2002). *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio splendidus* y *Vibrio neptunis*, son especies que se encuentran distribuidas en todo el mundo asociadas con los cultivos y registradas como causantes de enfermedades en organismos acuáticos cuando encuentran las condiciones ambientales favorables (Guisande, 2004). En particular, *Vibrio splendidus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio tapetis*, han sido

relacionados con “enfermedades de la concha” en moluscos bivalvos. Este tipo de enfermedades se caracterizan por producir depósitos orgánicos anómalos de materia orgánica sobre la superficie interna de las valvas y una coloración café del tejido del manto en las partes en contacto con los depósitos de materia orgánica (Paillard *et al.*, 1994; Gay *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 1982; Perkins, 1996; Comps *et al.*, 2001). Estas características coinciden con lo encontrado en el presente estudio.

Entre los casos con características similares a las descritas anteriormente, destacan los que se presentaron en almejas adultas de los géneros *Tapes* y *Ruditapes*, donde se presentaron elevadas mortalidades. En estos casos, los depósitos de materia orgánica se caracterizan por formar, principalmente, un anillo de color marrón en el borde de la cara interna de la concha, aunque, también pueden distribuirse en diferentes zonas de la superficie de la cara interna. Esta enfermedad causó mortalidades en España, Francia e Inglaterra. El agente causal fue un vibrio, hasta ese entonces desconocido y denominado como *Vibrio tapetis*. La enfermedad fue llamada “enfermedad del anillo marrón” (Paillard, 2004). Cabe subrayar que en este estudio, hay cierta similitud entre el anillo marrón descrito en las almejas europeas y los depósitos marrones encontrados en la almeja Mano de León. La localización del depósito en diferentes zonas de las valvas no está bien entendida, aunque podría estar relacionada con zonas de la concha más vulnerables que otras con relación a la epibiosis preexistente; sin embargo, este aspecto merece ser estudiado a detalle.

Otro evento de características similares asociado a mortalidades de juveniles de *Crassostrea gigas* en Francia durante los meses de verano fue asociado con *Vibrio splendidus*. A esta enfermedad se le llamó “enfermedad de las ostras o JOD por sus siglas en inglés (Juvenile Oyster Disease)”. Los signos de la misma son retracción del manto, depósitos anormales de materia orgánica, en algunos casos crecimiento excesivo de la valva izquierda sobre el nivel de la valva derecha. Esta enfermedad causó importantes pérdidas económicas en la región (Gay *et al.*, 2004).

Enfermedades similares también se observaron en el cultivo de la ostra plana *Ostrea edulis* y la almeja *Mercenaria mercenaria* en Massachusetts, U.S.A en 1980. Las mortalidades se asociaron a bacterias del género *Vibrio* sin llegarse a identificar a la o las especies involucradas (Elston *et al.*, 1982). Otros casos de enfermedades en moluscos bivalvos que involucran depósitos anómalos de materia orgánica en la cara interna de la concha, se presentaron en las ostras perleras *Pinctada maxima* y *Pinctada margaritifera* en Australia en 1987 y en la Polinesia Francesa en 1996-1997. Estos eventos se asociaron a bacterias del género *Vibrio* y se reportaron cuantiosas pérdidas (Perkins, 1996; Comps *et al.*, 2001).

El hecho de que depósitos de materia orgánica, similares entre ellos, hayan sido detectados en diferentes episodios de mortalidades de moluscos bivalvos, están asociados con el hecho de que los depósitos de materia orgánica son un mecanismo de defensa en bivalvos, que actúan como una barrera física contra la invasión de bacterias o algún daño físico (Paillard *et al.*, 1994). La lámina orgánica en contacto con la cara interna de la concha constituye el perióstraco (primera capa de la concha formada por conchiolina, una matriz orgánica de naturaleza proteica), con pequeñas lagunas que incluyen células lisadas cubiertas por varias láminas de perióstraco alternando con capas de tejido granulomatoso que se forma como consecuencia de la incapacidad de las células para eliminar totalmente a las bacterias (Comps *et al.*, 2001). En estas áreas se presentan dislocaciones o defectos cristalinos formados por bordes prismáticos, constituidos de calcita y conchiolina, lo cual ocasiona un grado de descalcificación de la concha que aumenta con los depósitos de materia orgánica los cuales evitan una mineralización adecuada de la concha (Elston *et al.*, 1982). Al parecer, un proceso muy similar ocurre en las lesiones observadas en este trabajo y sería importante realizar el estudio correspondiente de arquitectura de la concha para confirmar este proceso.

Estas láminas de conchiolina que rodean al manto, en la superficie interna de la concha en ambas valvas, ocasionan la retracción del manto y lesiones en el epitelio, en el cual se observan células de color marrón. Como consecuencia el organismo muere, mostrando

pérdida de hemolinfa en el epitelio del manto y el desprendimiento del músculo abductor. La retracción del manto difiere con la especie de molusco. Por ejemplo, se ha observado que en el género *Crassostrea* el manto no presenta alteraciones (Perkins, 1996). En eventos donde se presenta la enfermedad de la concha, los animales muestran signos de debilidad, asociado con secreción anormal de moco. Los análisis histológicos muestran una abundante infiltración hemolítica en las branquias, manto (en especies de metíllicos), tejido conectivo y alrededor del músculo abductor, presencia de tejido granulomatoso compuesto de granulocitos, macrófagos, células marrón y restos celulares (Comps *et al.*, 2001). En el presente estudio, se observó un proceso muy similar como lo demuestra el análisis histopatológico.

En estudios realizados en ejemplares de *Crassostrea virginica* se encontraron células marrones, en el tejido conectivo, aurícula y la glándula del pericardio. El citoplasma de estas células contiene vesículas de diferentes tamaños cuyo color varía de intensidad, desde un color café claro hasta un café oscuro (Zagoorian *et al.*, 1989). En ostras sanas, las células marrones se encuentran en el tejido conectivo y en las fibras musculares, mientras que en ostras moribundas se localizan rodeando principalmente los divertículos digestivos, entre las células epiteliales y la pared auricular. Los autores han observado un incremento de células marrón en asociación con hemocitos en respuesta a una inflamación aguda o crónica, lo cual sugiere que las células marrones participan en la acumulación y eliminación de toxinas o subproductos metabólicos que se producen durante la respuesta inflamatoria (Zaroogian *et al.*, 1994). La caracterización bioquímica de estas células mostró la presencia de fosfatasa ácida, lisozimas y la glutatión reductasa. La función primaria de la glutatión reductasa es el mantenimiento de la concentración de glutatión reducido, el cual es importante en la desintoxicación celular de xenobióticos; por otro lado, las lisozimas participan en los procesos de desintoxicación y degradación celular (Kramer *et al.*, 1988). Se recomienda profundizar en estos aspectos con respecto a la enfermedad encontrada en este estudio.

De acuerdo con lo anterior, entre el grupo de vibrios encontrados en este estudio, el que presenta un papel principal en el desarrollo de la enfermedad, es *Vibrio splendidus*; ya que aparece tanto en los depósitos marrón como en el tejido del manto y en el medio circundante. Por su parte, *Vibrio tasmaniensis* aparece en el depósito y en el manto. Como ya hemos mencionado, de estas dos especies de vibrios, *Vibrio splendidus* se ha encontrado en lesiones similares en otros moluscos bivalvos, mientras que a *Vibrio tasmaniensis* se le reporta como oportunista. Tales observaciones sugieren que el posible agente primario causal de la enfermedad es *Vibrio splendidus*. Sin embargo, es necesario probar esta hipótesis mediante el postulado de Koch. También es posible que estos vibrios actúen en sinergia, lo cual, a su vez, podría ser comprobado bajo el postulado de Koch. Esto permitiría confirmar si es *Vibrio splendidus* o *Vibrio splendidus-Vibrio tasmaniensis* o el consorcio de varios vibrios los responsables directos de la ocurrencia de ésta enfermedad a la que se sugiere llamar “Vibriosis de la concha y el manto de la almeja Mano de león”. La presencia por sí misma de *Vibrio splendidus* o de los otros vibrios no explicaría el desarrollo de la enfermedad, a menos de que se tratase de una variedad altamente patógena resultado de una mutación. Por lo tanto, es indispensable determinar las condiciones ambientales asociadas con su presencia y la del hospedero, que puedan ser los disparadores de la enfermedad. Recordemos que actualmente en el océano están ocurriendo cambios dramáticos en asociación con el desequilibrio climático global y el impacto del hombre. La acidificación del océano, la ocurrencia de episodios de hipoxia o anoxia (escases o falta de oxígeno) y contaminación en las zonas costeras pueden ser, entre otros, detonantes de este tipo de problemas sanitarios.

Por otro lado es necesario profundizar en la caracterización genética de *Vibrio splendidus*, ya que como se aprecia en los resultados hay ciertas diferencias de cobertura e identidad entre las secuencias obtenidas. Si bien ese tipo de vibriosis no se transmiten directamente al ser humano, sí afecta a la industria ya que las almejas infectadas pierden toda su calidad y valor de mercado.

Los resultados aquí presentados y los encontrados por otros autores sobre enfermedades similares en moluscos bivalvos alrededor del mundo (Paillard, 2004; Gay *et al.*, 2004; Perkins, 1996; Elston *et al.*, 1982), nos alertan sobre la necesidad de adoptar medidas de bioseguridad inmediatas para evitar la dispersión del problema.

V.2 Conclusiones

Las deformaciones se presentan en el borde externo de la concha, los depósitos marrones se producen en la cara interna de la concha, cubriendo del 6.18 ± 1.3 % al 61.70 ± 4.7 % de la superficie total.

El análisis histológico mostró infiltración de hemocitos y necrosis en el tejido conectivo en contacto con la lesión.

El análisis bacteriológico llevado a cabo por métodos convencionales, así como el análisis de ADN, demostraron que las bacterias dominantes fueron: *Vibrio* sp., *Vibrio splendidus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio gigantis*, *Vibrio hepatarius* y *Photobacterium lutimaris*. De estas especies, *Vibrio splendidus* ha sido directamente asociado con una enfermedad similar en las ostras del género *Crassostrea* y en otros bivalvos.

V.3 Recomendaciones

Mantener bajas densidades de cultivo y realizar mantenimientos frecuentes.

Llevar a cabo un tratamiento a los desechos sólidos y no verter los restos de organismos del desdoble de lavado.

No devolver las conchas al mar y tratar las conchas con solución de cloro en caso de que se utilicen.

Retirar del mar los organismos muertos y moribundos.

No realizar transferencias de almejas de un lugar a otro sin una previa certificación sanitaria.

Capítulo VI

Bibliografía

- Allam, B., Paillard, C. y Ford, S. E. 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of Aquatic Organisms*. 48: 221-231 p.
- Álvarez-Tinajero, Ma. Del C. 2000. Simbiontes de los abulones amarillo (*Haliotis corrugata*) y azul (*Haliotis fulgens*) de Islas de Cedros e Islas San Benito, Baja California, México. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C., México. 107 p.
- Barbosa V., A. Luna-González, G. Aguirre-Guzmán, C. Riquelme y F. Ascencio-Valle 2001. Enfermedades microbianas de pectínidos cultivadas en Iberoamérica. En: Maeda-Martínez A.N. (Eds.). *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. Limusa. México. 325-342 p.
- Barrios-Ruiz, D., J. Chávez Villalba y C. Cáceres Martínez 2003. Grow of *Nodipecten subnodosus* (Bivalvia: Pectinidae) in the Paz Bay, México. *Aquaculture Research*. 34: 633-639 p.
- Basilio, C. D., J.I. Cañete y N. Rozbaczylo 1995. *Polydora* sp. (Spionidae), un poliqueto perforador de las valvas del ostión *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae) en Bahía de Tongoy, Chile. *Revista Biología Marina*. 30(1): 71-77 p.
- Bergey, D.H., Holt, J.G., Krieg, N.R. y H.A. Sneath 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Eds. Lippincott Williams & Wilkins. 787 p.
- Boss, K.J. 1982. Mollusca. En: Peña, B. J. 2001. *Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los moluscos pectínidos Iberoamericanos*, En: Maeda-Martínez A.N. (Ed). *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. Limusa. México. 1-25 p.
-

- Cáceres-Martínez, J., P. Macías y R. Vásquez-Yeomans 1998. *Polydora* sp. infestation and health in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW México. *Journal Shellfish Resource*. 17(1):259-264 p.
- Cáceres-Martínez, J. 2001. Parasitología en moluscos pectínidos. En: Maeda-Martínez A.N. (Ed). *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. Limusa. México. 17: 343-356 p.
- Cáceres-Martínez, J. 2007. Acerca de las enfermedades infecciosas emergentes en moluscos bivalvos cultivados. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*. 1(37): 4-6 p.
- Cáceres-Martínez, J., y R. Vásquez-Yeomans 2010. Presence of epibionts and Herpesvirus in the Lion-Paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *World Aquaculture Society. Aquaculture 2010*. March 1-5, 2010 San Diego, California, U.S.A. 669 p.
- Chomczynski P., Mackey K., Drews R. y W. Wilfinger. 1997. DNAzol®: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques*. 22: 550-553 p.
- Chung, S. L. y J. H. Merritt 1991. Physical measures of sensory texture in thawed sea scallop meat. *Int: J. Food Sci. Technol.*, 26: 207-210 p.
- Comps, M., Herbaut C., Fougerouse A., y F. Laporte 2001. Progress in pathological characterization of Syndrome 85 in the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquatic Living Resources*. 14(3): 195-202 p.
- Elston, R., Elliot, E. L., y Colwell, R. R. 1982. Conchiolin Infection and Surface Coating Vibrio Shell Fragility Growth Depression and Mortalities in Cultured Oysters and Clams *Crassostrea-Virginica Ostrea-Edulis* and *Mercenaria-Mercenaria*. *Journal of Fish Diseases*. 5(4): 265-284 p.
- Félix-Pico, E. F. 1993. Estudio biológico de la almeja Catarina *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835), en Bahía Magdalena, B.C.S, México. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, B.C.S., México. 89 pp.

- Félix-Pico, E. F., M. Villalejo-Fuente, A. Tripp-Quezada y O. Holguín-Quifiones. 1999. Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1985) in suspended culture at the national marine park of Bahía de Loreto, B.C.S. México. Book of abstracts 12th International Pectinid Wordshop, Bergen, Norway. 39-40 p.
- Félix-Pico, E.F.M., Arellano-Martínez y B.P. Ceballos-Vázquez 2003. Grow of *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended culture in the Guerrero Negro lagoon, B.C.S., México. 11-12 p.
- Food and Agriculture Organization F.A.O. 2008. National Aquaculture Sector Overview. Consultado en: http://www.fao.org/figis/servlet/static?xml=/naso_mexico.
- Funge-Smith, S., y M.J. Phillips. 2001. Aquaculture systems and species. En: NACA/FAO, 2001. Aquaculture in the Third Millennium. R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.E. Arthur (eds.) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 471 pp.
- García, O. A. M. 1997. Caracterización molecular de especies marinas del genero *Vibrio*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Químicas, Tijuana, B.C., México. 45 pp.
- García-Pamánes, L., G. Chi Barragan, G. Pares-Sierra, O. Medina-Hurtado y F. Nuñez-Cabrero 1994. Desarrollo de tecnologías para el cultivo integral de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus*. En: Libro de Resúmenes. Simposium Internacional de Ciencia y Tecnología del Mar, San Carlos Guaymas Sonora (17-19 Nov.) SEP/SEIT, Unidad de Ciencia y Tecnología del Mar, México. 31 pp.
- Garduño, M.M.L. 1999. Simbiontes de la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842), en Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. México. 74 pp.
- Gay, M., T. Renault, A.M. Pons y F. Le Roux. 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Diseases of Aquatic Organisms. 62: 65-74 p.

- Gómez-del-Prado, R.M. 1982. *Echinocephalus pseudouncinatus* nemátodo parásito de *Argopecten circularis* (Mollusca: Bivalvia) y *Heterodontus francisci* (Pisces: Elasmobranchia) en la costa occidental de Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 125 p.
- Gómez-León J., L. Villamil, M. L. Lemos, B. Novoa, y A. Figueras 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from Aquacultured Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Larvae Associated with Mass Mortalities. Applied and Environmental Microbiology. 98–104 p.
- Guisande, J.A., Montes, M., Farto, R., Armada, S.P., Pérez, M.J., y Nieto, T.P. 2004. A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusk production. Journal Shellfish Resource. 23: 599–610 p.
- Hana Y., Young -Woon L. y Jongsik C. 2007. Taxonomic evaluation of the genera *Ruegeria* and *Silicibacter*: a proposal to transfer the genus *Silicibacter* (Petursdottir and Kristjansson, 1999) to the genus *Ruegeria* (Uchino, 1999). Systematic and Evolutionary Microbiology. 57: 815–81 p.
- Harvell, C.D., K. Kim, J.M. Berkholder, R.R. Colwell, P.R. Epstein, y D.J. Grimes 1999. Emerging marine diseases-climate link and anthropogenic factors. Science. 285:1505-1510 p.
- Instituto Nacional de Pesca 2010. Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación. Segunda edición. 11-12 p.
- Jeffries, V.E. 1982. Three vibrio strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture. 29: 201-226 p.
- Keen, A.M. y Coan, 1974. Marine molluscan genera of western north America, and illustrated key. Stanford University Press. 208 p.
- Kiyong L., Yoe-Jin C., J. Giovannoni y Jang-Cheon C. 2007. *Ruegeria pelagia* sp. nov., isolated from the Sargasso Sea, Atlantic Ocean. Systematic and Evolutionary Microbiology. 57: 1815–1818 p.
-

- Kramer, R. A., Fakker, J. y Kim, G. 1988. Role of glutathione redox cycle in acquired and *de novo* multidrug resistance. *Science*. 241: 694-697 p.
- Kumar Sudhir, Nei Masatoshi, Dudley Joel y Tamura Koichiro. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinf.*, 4: 299-306 p.
- Le Roux F., Goubet, A., Thompson F.L., Faury N., Gay, M., Swings J. y D. Saulnier 2005. *Vibrio gigantis* sp. Nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 2251-2255 p.
- Lodeiros, C., J. Bolinches, C.P. Dopazo, y A.E. Toranxo. 1987. Bacillary necrosis in hatchery of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*. 64: 15-29 p.
- Lodeiros, C., L. Freites y A. Velez. 1992. Necrosis bacillar en larvas del bivalvo *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) causada por una *Pseudomonas* sp. *Microbiol. Acta Cient. Venez.*, 43:154-158 p.
- Maeda-Martínez A.N 1990. Problemas y perspectivas de cultivo de moluscos en el pacífico mexicano. Serie Científica. AMAC. UABCS. México. 1:7-12 p.
- Madigan, T.M., J.M. Martinko y J. Parker. 1998. Brock Biología de los Microorganismos. Prentice Hall Internacional, Ltd., UK. 1089 p.
- Mazón-Suástegui J.M. 1996. Cultivo de la almeja Catarina *Argopecten circularis*. Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. (Eds.) Casa Valdés, M. y G. Ponce Díaz. 2: 513-544 p.
- Mazón-Suástegui J.M., Robles Mungaray y M. Osuna-García 2003. Informe anual-final de actividades realizadas al amparo de un permiso de acuicultura de fomento, otorgado a la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Punta Abrejos" S.C.L, permiso PAF/DGOPA-06/2002. Expediente AF/DGOPA-024/2002. Presentada a SAGARPA-CONAPESCA, La Paz, B.C.S., México. 14 p.
- Morales-Hernández, R. y C. Cáceres-Martínez 1996. Pesquería de almeja mano de león *L. subnodosus* en: M. Casas & Ponce (Ed). Estudio del potencial pesquero y acuícola de

Baja California Sur. SEMARNAP. GFAO. INP.UABCS. CIBNOR: CICIMAR. UECYTM. La Paz, B.C.S., México. 1: 87-100 p.

Morales, R. y M. A. Galván López 1990. Inspección de equipos de buceo en Bahía Magdalena B. C. S. Documento interno Departamento de acuicultura SEMARNAP B. C. S.

Morse, M.P. y J.D. Zardus. 1997. Bivalvia. En: Peña, B. J. (2001). Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los moluscos pectínidos Iberoamericanos, En: Maeda-Martínez A.N. (Ed). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura. Limusa. México. Cap. 1: 1-25 p.

NOAA, 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusk. NMFS-F/NEC-25. 97 p.

Oliva, M., H. Herrera, J. Matulic y B. Severino 1986. Parasitismo en el ostión del Norte *Chlamys Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Parasitol. al Día., 10: 83-86 p.

Osuna, G. M. (2004). Efecto en la densidad de cultivo en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) en la península de Baja California, México. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, B.C.S., México. 95 p.

Paillard, C., Maes, P. (1994). Brown ring disease in the manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. Diseases of Aquatic Organisms. 19: 137-146 p.

Paillard, C. (2004). A short review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* *Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources. 17:467-475 p.

Peña, B. J. (2001). Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los moluscos pectínidos Iberoamericanos, En: Maeda-Martínez A.N. (Ed). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura. Limusa. México. Cap. 1: 1-25 p.

Perkins, F.O., 1996. Shell disease in the gold lip pearl oyster, *Pinctada maxima*, and the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Aquatic Living Resources. 9: 159-168 p.

- Riquelme, C., G. Hayashida, N. Vergara, A. Vásquez, Y. Morales y P. Chávez 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture*. 138: 49-60 p.
- Riquelme, C., A.E. Toranzo, J.L. Barja, N. Vergara y R. Araya 1996. Association of *Aeromonas hydrophyla* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *J. Inv. Path.*, 67: 213-218 p.
- Robert, R., P. Miner y J.L. Nicolas. 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult. Inter.*, 4: 305-313 p.
- Sainz, J.C., A.N. Maeda-Martínez y F. Ascencio 1998. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the catarina scallop (*Argopecten ventricosus* = *circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb. Ecol.*, 35: 188-192 p.
- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd edition. 999 p.
- Seo-Youn J., Yong-Taek J., Tae-Kwang O., y Jung-Hoon Y. 2007. *Photobacterium lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 332-336 p.
- Shaw, B.L. e I.H. Battle. 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.*, 35: 325-346 p.
- Sinderman, C.J. 1990. *Principal diseases of marine fish and shellfish*. Ed. Academic Press. 516 p.
- Sugumar G, Nakai T., Hirata Y, Matsubara D., y Muroga K. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 33: 111-118 p.
- Sumudo, U. y K. Tsukamoto 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marines member of de family vibriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 781-790 p.
-

- Swick, R.A. y M.C. Cremer. 2001. Livestock production: a model for aquaculture? Guest lecture. *En*: NACA/FAO, 2001. Aquaculture in the Third Millennium. R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.E. Arthur (eds.) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 471 p.
- Thompson, F.L., Thompson, C. C. y Swings J. 2003. *Vibrio tasmaniensis* isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *System. Appl. Microbiol.*, 26: 65-69 p.
- Unzueta Bustamante M. L. y J. A. Olivas Valdez 1997. Evaluación del potencial de cultivo de la almeja Mano de León (*Lyropecten subnudosus*) en el municipio de Guaymas, Sonora, México. Manuscrito, documento interno, CIBNOR S. C. Unidad Guaymas. 22 p.
- Zarogian, G. E., Yevich, P. y Pavignano, S. 1989. The role of the red gland in *Mercenaria mercenaria* in detoxification. *Mar. Environ. Res.*, 28: 447-450 p.
- Zarogian, G. E., y Yevich, P. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, 37: 355- 373 p.
-

APENDICE I

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cm²	Centímetros cuadrados
dNTP's	2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilen-di-amino-tetra-acético
FAO	Food and Agriculture Organization
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de potasio
Kb	Kilo bases
MgCl₂	Cloruro de magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimoles
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
° C	Grados centígrados
p.H.	Potencial de hidrogeno
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borate/EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano

APENDICE II

Requisitos para envío y recepción de muestras

Moluscos bivalvos vivos.

Estos deben ser colocados en una hielera de poliestireno que en el fondo contengan bolsas de "Blue Ice". Sobre el "Blue Ice" se coloca un separador de poliestireno (de esta manera se evita que el molusco esté en contacto directo con la bolsa). Cada organismo se coloca en una bolsa de plástico individual y el conjunto dentro de otra bolsa de plástico (grande y gruesa). Se tapa la hielera con cinta adhesiva y se envía al laboratorio con sus correspondientes antecedentes sanitarios, es decir, la información concerniente a la localidad, observaciones de las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, marea, eventos particulares tales como lluvias, descargas, etc.). Es importante que no pase de 24 horas el envío de los organismos vivos hasta el laboratorio.

APENDICE III

Preparación de la solución fijadora de Davidson

Solución Fijadora Davidson (para preparar 1 litro)

Glicerina	100 ml
Formaldehído 37%	200 ml
Etanol 96%	300 ml
Agua de mar filtrada	300 ml
Ácido Acético	100 ml

Es importante añadir por orden cada una de las diferentes sustancias.

Agitar antes de usarse.

El tiempo de fijación es de 24 a 48 horas (en una relación de 1:5). Después de transcurrido ese tiempo, y en caso de que no se continúe inmediatamente con la deshidratación, la muestra deberá colocarse en la solución Davidson conservante (solución que no contiene ácido acético) hasta su procesamiento.

APENDICE IV

Técnica de inclusión en parafina

Etanol 70%	1 hora
Etanol 96% - I	2 horas
Etanol 96% - II	2 horas
Etanol 100% - I	2 horas
Etanol 100% - II	2 horas
Etanol 100% - Benceno	3 horas
Benceno I	2 horas
Benceno II	2 horas
Benceno – Parafina	3 horas
Parafina I	2 horas
Parafina II	2 horas

Total 23 horas

Incluir en Parafina.

APENDICE V

Técnica de Tinción de Hematoxilina-Eosina/Floxina

Esta técnica permite demostrar claramente un enorme número de diferentes estructuras tisulares. Esencialmente la hematoxilina tiñe al núcleo de la célula de un color azul a negro, con un buen detalle intranuclear; por otro lado, la Eosina tiñe al citoplasma celular y a la mayoría de las fibras del tejido conectivo en variadas intensidades de rosa, naranja y rojo.

Desparafinación e Hidratación.

Xileno I	10 min. *
Xileno II	5 min. *
Xileno III	5 min. *
Etanol 100% - I	5 min.
Etanol 100% - II	5 min.
Etanol 96%	5 min.
Etanol 10%	5 min.
Agua destilada	

* El Xileno se debe de mantener a una temperatura entre 30°C a 35°C.

Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua.

Hematoxilina	30 min.
Agua corriente	Lavar.
Etanol ácido	5 seg.
Carbonato de litio	2 min.
Agua destilada	5 seg.
Etanol 96%	3 min.
Eosina/Floxina	1 min.
Etanol 96% - I	2 min.
Etanol 96% - II	2 min.
Etanol 100% - I	3 min.
Etanol 100% - II	3 min.
Xileno I	5 min.
Xileno II	5 min.
Xileno III	5 min.
Montar en resina sintética.	

APENDICE VII

Estudios realizados en las especies de referencia

Photobacterium lutimaris, especie localizada en el cieno marinos, de donde deriva el nombre *lutum* cieno; *maris* de mar, es Gram negativa, presenta flagelo polar, no es bioluminiscente, crece a temperatura de 4 a 41 °C, en presencia de NaCl de 2-3 % (w/v), ha sido reconocida como especie no patógena (Seo-Youn *et al.*, 2007).

Ruegeria sp. pertenece a las Rhodobacteraceae, no ha sido reconocida como patógena, se ha aislado de sedimentos y sargazo marino (Ki-Young, 2007; Hana *et al.*, 2007).

Las *Pseudomonas* son bacilos rectos o ligeramente curvados (0.5 a 4.0 µm) con uno o varios flagelos polares. Son Gram negativos y quimioorganotróficos aeróbicos, sin metabolismo fermentativo, pueden ocasionar necrosis bacilar, en cultivos larvarios de *Ostrea edulis* y *Euvola ziczac* (Lodeiros *et al.*, 1992; Lodeiros *et al.*, 1987).

Vibrio gigantis sp. ha sido aislado de la hemolinfa del ostión Japonés *Crassostrea gigas*, de donde deriva el nombre *gigantis*. Presenta una morfología de bacilo curvo de 1 µm de ancho y 2-3 µm de largo, Gram negativo, tiene un flagelo polar, requiere de 0 a 8 % de NaCl para crecer, es anaerobio facultativo y posee un metabolismo fermentativo. Por estudios moleculares del gen 16S de ARNr se le relaciona con *Vibrio splendidus*, en un 98% de similitud. Aunque no se han desarrollado pruebas experimentales de patogenicidad y virulencia se ha registrado su presencia en organismos enfermos y moribundos en los cultivos de *Crassostrea gigas* de La Tremblade, en Francia (Le Roux *et al.*, 2005).

Vibrio tasmaniensis, otra especie de vibrio encontrada en este estudio cuyo nombre lo recibe por haber sido aislado de los cultivos de salmón en Tasmania, presenta una morfología ligeramente curva de 1 µm de ancho por 2-3 µm de largo, Gram negativo, no

crece en ausencia de NaCl o $\geq 8\%$, anaerobio facultativo y posee un metabolismo fermentativo, es sensible al agente vibriostático O/129, los estudios moleculares del gen 16S ADNr, muestran una similitud del 98.2% con *Vibrio splendidus*. Tampoco se han desarrollado pruebas de patogenicidad y virulencia de este organismo, sin embargo se ha encontrado junto a *Vibrio splendidus* y *Vibrio aestuarianus* durante episodios de mortalidad de *Crassostrea gigas* en granjas ostrícolas de Francia (Thompson *et al.*, 2003; Saulnier *et al.*, 2010).

Vibrio alginolyticus es un organismo marino ubicuo en estuarios. Su distribución es cosmopolita, por lo general en las zonas costeras de países con climas templados. Morfológicamente es un bacilo corto, Gram negativo, móvil por flagelos peritricos y polares. Se encuentra en cualquier organismo marino ya sean peces, almejas, ostiones, corales, entre otros. En estudios de virulencia realizados en larvas de almejas *Ruditapes decussatus* en España, se observó que bajo ciertas condiciones puede actuar como patógeno ocasionando pérdida del velum, necrosis de tejido, pérdida de la estructura muscular y epitelial y posteriormente la muerte de las almejas (Gómez-León *et al.*, 2005).

APENDICE VIII

Participación en Congresos derivados del trabajo de tesis

Villalva-Vega J. N., Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R. 2011. Characterization of bacteria associated with lesions in the shell of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), cultured in Bahía Tortugas, Baja California Sur. 44^a Reunión Anual de la Western Society of Malacologists y la XII Reunión Bienal Nacional de Malacología y Conquiología, de la Sociedad Mexicana de Malacológica A.C., La Paz B.C.S. México. Junio.