

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Bacterias asociadas a muestras de sedimentos y zooplancton en el
Golfo de México**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias.

Presenta:

Biol. Pablo Bravo Baás

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por

Pablo Bravo Baás

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Marcial Leonardo Lizarraga Partida
Director de tesis

Miembro del comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Dr. Helmut Maske Rubach



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Pablo Bravo Baás © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Pablo Bravo Baás** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Bacterias asociadas a muestras de sedimentos y zooplancton en el Golfo de México

Resumen aprobado por:

Dr. Marcial Leonardo Lizarraga Patrida
Director de tesis

Las masas de agua que alimentan al Golfo de México (GM) entran principalmente a través del canal de Yucatán, formando a nivel superficial (<400 m) la corriente de rizo en su extremo este y la cual abandona al GM a través del estrecho de Florida. A mayor profundidad, se detecta en la parte oeste del Golfo otras masas de agua, donde la profunda del Atlántico Norte se detecta a partir de los 1000 m. Debido a la riqueza en hidrocarburos en todo el GM, la extracción de petróleo ha sido constante, incrementando el riesgo de un derrame, como el que ocurrió en la plataforma Deepwater Horizon en 2010. Los estudios bacteriológicos efectuados en el GM se han enfocado en las bacterias que intervienen en la degradación del petróleo, y en zonas estuarinas y costeras en bacterias patógenas para el humano como algunas del género *Vibrio*. Se sabe que el zooplancton representa un reservorio para estos organismos patógenos cerca de zonas costeras, sin embargo, no se ha comprobado si esta asociación se detecta en mar abierto, y tampoco si el zooplancton funge como reservorio para bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH). Debido a lo anterior, en el presente trabajo se determinó la presencia y abundancia de las BDH (*Marinobacter* spp., *Alcanivorax* spp. y *Cycloclasticus* spp.) y de vibrios (*Vibrio* spp., *V. cholerae*, *V. cholerae* *ctxA*⁺, *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*) en muestras de zooplancton y sedimento colectadas en el GM durante las campañas oceanográficas XIXIMI-04 (XIX-04) y 05 (XIX-05). Se extrajo DNA genómico para el análisis de las muestras por PCR punto final y qPCR con SYBRgreen I y sondas Taqman, para determinar la presencia y cuantificar la abundancia de las especies estudiadas. No se encontraron BDH asociadas al zooplancton en ambos cruceros, pero se detectó la presencia de vibrios asociados a zooplancton y sedimentos en XIX-04 y sólo en sedimento en XIX-05. En muestras de zooplancton de XIX-04 se detectó la presencia de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* toxigénico (*tdh*⁺), *V. cholerae* y *V. cholerae* toxigénico (*ctxA*⁺). Con base en los resultados obtenidos, se concluyó que el zooplancton no representa un nicho idóneo para BDH, pero sí para vibrios, constituyendo la primera evidencia de que vibrios patógenos para el ser humano, como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*, pueden encontrarse asociados al zooplancton en aguas oceánicas del Golfo de México y no sólo en zonas costeras, lo que representa otro posible medio de transmisión de estos organismos patógenos, además del agua de balastre y las bioincrustaciones en los cascos de los barcos.

Palabras clave: *Vibrio*, bacterias degradadoras de hidrocarburos, Golfo de México, PCR, qPCR, sondas, cólera, XIXIMI.

Abstract of the thesis presented by **Pablo Bravo Baás** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine biotechnology.

Bacteria associated to sediment and zooplankton samples from the Gulf of Mexico.

Abstract approved by:

PhD. Marcial Leonardo Lizarraga Partida
Thesis Director

Surface water masses (<400 m) that feed the Gulf of Mexico (GM) come from the Caribbean Sea and enter through the Yucatan Channel forming the loop current and leaving the GM through the Florida Strait. At levels deeper than 400 m different water masses are detected. Due to the GM oil richness, there has been a constant oil extraction, an industry that has increased the risk of an accident like the Deepwater Horizon in the US GM waters, in 2010. The bacteriological studies performed in the GM has been focused on hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) or on pathogenic bacteria such as *Vibrio spp.* Several reports indicate that zooplankton is a reservoir for pathogenic vibrios in estuarine and coastal zones, but this association has not been detected in the open sea. It is also unknown if zooplankton is a niche for (HDB). Therefore, in the present study, selected HDB such as *Marinobacter spp.*, *Alcanivorax spp.* and *Cycloclasticus spp.* as well as vibrios (*Vibrio spp.*, *V. cholerae*, *V. cholerae ctxA⁺*, *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus tdh⁺*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*) were studied from zooplankton and sediment samples, collected in the GM during the oceanographic cruises XIXIMI-04 (XIX-04) and XIXIMI-05 (XIX-05). Extracted DNA from zooplankton and sediment samples was used to detect the presence and abundance of those organisms with the endpoint PCR and qPCR with SYBRgreen I dye and Taqman probes techniques. The presence of HDB were not detected in zooplankton samples from XIX-04 and XIX-05, Nevertheless, vibrio species have been found in XIX-04 zooplankton and sediment samples in both oceanographic cruises. Human pathogenic vibrios such as *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus (tdh⁺)*, *V. cholerae* and *V. cholerae ctxA⁺*, have been detected in zooplankton samples. Therefore, zooplanktonic organisms are not a niche for HDB, as they are for vibrios. In this study, for the first time, pathogenic vibrios for humans were detected in zooplankton samples collected in the open waters of the Gulf of Mexico. This finding represents another vector of transmission of pathogenic organisms, besides the ballast water and the biofouling attached to commercial ship hulls.

Keywords: Vibrio, hydrocarbon degrading bacteria, Gulf of Mexico, PCR, qPCR, probes, cholera, XIXIMI.

Dedicatoria

A mi familia, que siempre me ha apoyado en todo momento.

A las amistades forjadas en el trayecto de la vida.

**A la memoria de Kora (2004-2018) y Azuzu (2008-2018)
En la pradera nos volveremos a encontrar y soñaremos a la sombra de un sauce.**

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por CONACYT y la Secretaría de Energía, fondo hidrocarburos con el proyecto No 201441. Esta es una contribución del consorcio de investigadores del Golfo de México. Igualmente se recibió apoyo parcial del proyecto interno CICESE No 682110.

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por la otorgarme la oportunidad de ser alumno de esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado a través del programa de becas de maestría a través del No. Becario 615290.

A mi director de tesis, Dr. Marcial Leonardo Lizarraga Partida, por recibirme en su laboratorio y apoyarme durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Edna Sánchez Castrejón, por tenerme paciencia con todas mis dudas que surgieron durante el desarrollo del trabajo, además de todo su apoyo en el trabajo experimental.

A los miembros de mi comité, Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez y Dr. Helmut Maske Rubach por sus comentarios, paciencia y correcciones que ayudaron a mejorar y enriquecer este trabajo de tesis.

A los chicos de Pos-Doc Edna Lorena y Abraham Guerrero que siempre me brindaron su ayuda en todo momento.

A Anaid Saavedra por su ayuda en el laboratorio y resolución de dudas existenciales.

A Jahaziel Gasperin por su ayuda en el laboratorio.

A mis amigos de Ensenada y CICESE, Ariana, Clara, Caro, Ivan, Arlet, Edgar, Leo, Joel, Louisina, Roger (Rogelio), Cristina, Mateo, Rodrigo, Daniel, Brenda, Felipe, Mane, Manuel, Tere, Quique, Cesar M y Nayeli (perdón si olvidé a alguien), por hacer de estos 2 años y cachito una experiencia genial y divertida, además de reducir el estrés generado por posgrado.

A mis amigos Magy, Mazaba, Andrés, Hansel, Jorge, Omar, Tlaca y Ariadna por su apoyo y cariño desde la distancia.

A la Dra. Icoquih Zapata, quien me enseñó que esfuerzo y dedicación las cosas salen adelante.

A mi familia, por siempre apoyarme en cada decisión que he tomado.

A Elizabeth García, por el apoyo, cariño y comprensión que me ha brindado.

Al personal del CICESE, por siempre ayudarme en todo lo que he requerido.

Finalmente, al lector del presente trabajo, que sea el inicio de una aventura de bacterias.

Tabla de Contenido

Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Lista de Tablas	viii
Lista de Figuras.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 El Golfo de México	1
1.2 Hidrocarburos en el Golfo de México	3
1.3 Zooplancton.....	4
1.4 Bacterias degradadoras de hidrocarburos	4
1.5 Género <i>Vibrio</i>	5
1.5.1 <i>Vibrio cholerae</i>	6
1.5.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6
1.5.3 <i>Vibrio vulnificus</i>	6
1.5.4 <i>Vibrio alginolyticus</i>	7
1.6 Antecedentes.....	7
1.7 Justificación	10
1.8 Hipótesis.....	10
1.9 Objetivos	10
1.9.1 Objetivo general	10
1.9.2 Objetivos específicos	11
Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Área de estudio.....	12
2.2 Colecta de muestras.....	12
2.3 Extracción de DNA	13
2.3.1 Muestras de zooplancton	13
2.3.2 Muestras sedimentos.....	14
2.4 Detección y cuantificación de los organismos por PCR.....	14

2.4.1 Amplificación por PCR punto final.....	14
2.4.2 Amplificación por qPCR SYBR Green I.....	15
2.4.3 Amplificaión de sondas Taqman por qPCR	16
2.5 Cuantificación de los grupos estudiados.....	18
2.5.1 Determinación de una curva estándar para la cuantificación de organismos de interés.....	18
2.5.2 Ecuación de la recta y cuantificación.....	19
2.6 Distribución de vibrios en el Golfo de México.	20
Capítulo 3 Resultados.	21
3.1 Detección de los organismos de interés medinate PCR punto final	21
3.1.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	21
3.1.2 <i>Vibrio</i> spp.....	22
3.1.3 <i>Vibrio cholerae</i>	23
3.1.4 Factor de patogenicidad ctx A de <i>Vibrio cholerae</i>	23
3.1.5 <i>Vibrio vulnificus</i>	24
3.2 Detección mediante qPCR con SYBR green I	24
3.2.1 <i>Vibrio</i> spp.....	24
3.2.2 <i>Vibrio alginolyticus</i>	25
3.2.3 Factor de patogenicidad ctx A de <i>Vibrio cholerae</i>	26
3.3 Detección de vibrios patógenos por q-PCR con sondas Taqman	26
3.3.1 <i>Vibrio cholerae</i>	26
3.3.2 Factor de patogenicidad ctx A de <i>Vibrio cholerae</i>	27
3.3.3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28
3.3.4 Factor de patogenicidad tdh de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
3.3.5 <i>Vibrio vulnificus</i>	30
3.4 Cuantificación	31
3.4.1 Determinación de cepas puras	31
3.4.2 Determinación de la ecuación de la recta.....	32
3.4.2.1 <i>Vibrio</i> spp.	32
3.4.2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
3.4.2.3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> tdh ⁺	33
3.4.2.4 <i>Vibrio alginolyticus</i>	33
3.4.2.5 <i>Vibrio cholerae ctxA</i> ⁺	34

3.4.3 Número de copias de vibrios en el Golfo de México	34
3.4.3.1 Zooplancton XIXIMI-04.....	34
3.4.3.2 Sedimento XIXIMI-04	37
3.4.3.3 Sedimento XIXIMI-05	37
3.4.4 Abundancia relativa de Vibrios en Golfo de México	38
3.4.5 Distribución de vibrios en el Golfo de México	39
3.4.5 1 Zooplancton XIXIMI-04.....	39
3.4.5 2 Sedimento XIXIMI-04 y XIXIMI-05	40
3.4.5 3 <i>Vibrio cholerae</i> Zooplancton XIXIMI-04	41
Capítulo 4 Discusión.....	43
4.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	43
4.2 Presencia de vibrios.....	44
4.3 Distribución de vibrios en el GM.....	46
Capítulo 5 Conclusiones	48
Literatura citada	49

Lista de Tablas

Tabla 1. Lista de primers para PCR punto final para BDH y vibrios	15
Tabla 2. Primers para qPCR SYBRgreen I para vibrios	16
Tabla 3. Primers y sondas para qPCR para vibrios.	17
Tabla 4. Cepas puras de colección CICESE para elaboración de curvas estándar.	18
Tabla 5. Primer PCR punto final para la identificación de cepas puras.....	19
Tabla 6. Concentración de vibrios por número de copias en XIXIMI-04 Zoplancton	35
Tabla 7. Concentración de vibrios por número de copias XIXIMI-04 sedimento.....	37
Tabla 8. Concentración de vibrios por número de copias en XIXIMI-05 sedimento	37

Lista de Figuras

Figura 1. Estaciones de los cruceros oceanográficos XIXIMI-04 y XIXIMI-05.....	13
Figura 2. Gel de agarosa con productos de PCR de las estaciones XIX-04 Bacteria degradadora de hidrocarburos.....	21
Figura 3 . Gel de agarosa con productos de PCR de las estaciones de XIXIMI-04 utilizando los primer para 16S rDNA de <i>Vibrio</i> spp.	22
Figura 4. Gel de agarosa con productos de PCR positivos para <i>V. cholerae</i> toxigénico	23
Figura 5. Gel de agarosa con productos de PCR del gen <i>ctxA</i> de <i>Vibrio cholerae</i> en estaciones XIX-04..	24
Figura 6. Amplificación 16S rDNA <i>Vibrio</i> spp.....	25
Figura 7. Amplificación <i>groEL</i> <i>Vibrio alginolyticus</i>	25
Figura 8. Amplificación <i>ctxA</i> para <i>Vibrio cholerae ctxA</i> ⁺	26
Figura 9. Gradiente de Tm para los primer F-hlyA y R-hlyA.....	27
Figura 10. Amplificación de <i>ctxA</i> de <i>V. cholerae ctxA</i> ⁺	27
Figura 11. Amplificación de <i>thl</i> en estaciones de XIXIMI-04 y -05.....	28
Figura 12. Amplificación de <i>tdh</i> en estaciones de XIXIMI-04 y -05.....	29
Figura 13 Optimización de <i>vvh</i> para <i>Vibrio vulnificus</i>	30
Figura 14. Cepas puras de distintas especies de <i>Vibrio</i>	31
Figura 15. Curva estándar de <i>Vibrio</i> spp	32
Figura 16. Curva estándar de <i>V. parahaemolyticus tdh</i> ⁺	32
Figura 17. Curva estándar de <i>V. parahaemolyticus</i>	33
Figura 18. Curva estándar de <i>V. alginolyticus</i>	33
Figura 19. Curva estándar de <i>V. cholerae ctxA</i> ⁺	34
Figura 20 . Abundancia relativa de Vibrios en XIXIMI-04	38
Figura 21 . Abundancia relativa de Vibrios en sedimento de XIXIMI-05.....	39
Figura 22. Distribución de Vibrios en XIXIMI-04 zooplancton.....	40
Figura 23. Distribución de Vibrios en XIXIMI-04 sedimento	41
Figura.24. Distribución de <i>V. cholerae</i> y <i>V. cholerae ctxA</i> ⁺ en muestras de zooplancton de XIXIMI-04..	42
Figura 25 <i>Vibrio</i> spp. asociado a zooplancton en XIXIMI-04 y patrones de circulación oceánica.	46

Capítulo 1. Introducción

1.1 El Golfo de México

El Golfo de México (GM) es una cuenca oceánica semicerrada donde diversas masas de agua entran principalmente a través del canal de Yucatán, forman la corriente de Lazo en su extremo Este y abandonan el GM a través del estrecho de Florida, formando posteriormente la corriente del Golfo. Se encuentra delimitado al oeste, sur y sureste por el litoral mexicano, al norte y noroeste por Estados Unidos, y al este por Cuba (Yañez-Arancibia y Day, 2004).

El GM cubre una superficie de 1'157,639 km², con una profundidad promedio de 1,615 m y máxima de aproximadamente 4,400 m (Mendelssohn *et al.*, 2017). Una característica importante del GM son los estuarios que han formado grandes deltas en las desembocaduras de los ríos, aportando importantes escurrimientos de aguas continentales hacia la costa (De la Maza y Bernárdez, 2004; Lara-Lara *et al.*, 2008). Estos escurrimientos han moldeado la geomorfología de la costa, que se caracteriza por presentar llanuras costeras planas con diversos ambientes marinos como lagunas, manglares, praderas de pastos marinos y arrecifes coralinos (De la Maza y Bernárdez, 2004; Lara-Lara *et al.*, 2008). Los estuarios del GM y hábitats relacionados realizan la función de guarderías para especies de importancia pesquera, en las que se capturan aproximadamente el 45% de la producción de camarón y 50% de ostión exportada (Yañez-Arancibia y Day, 2004).

El río Misisipi y otros ríos, como el sistema Grijalva-Usumacinta, proporcionan agua dulce rica en nutrientes, drenando alrededor de dos tercios de la cuenca continental de Estados Unidos y la mitad de la de México. (Lara-Lara *et al.*, 2008; Würsig, 2017). En la parte Sur del GM, los escurrimientos de los ríos Usumacinta, Grijalva, Coatzacoalcos, Papaloapan entre otros y lagunas costeras como la Laguna de Términos constituyen una fuente de nutrientes hacia el GM; otra entrada de nutrientes y de masas de agua hacia este sistema proviene del mar Caribe y del mar de los Sargazos, entrando a través del estrecho de Yucatán (Soto *et al.*, 2014).

La estacionalidad en el GM está marcada por temporadas climáticas, como son la temporada de lluvias, de nortes y de secas. La temporada de lluvias abarca de junio a octubre, a lo que le sigue un periodo de frentes fríos y fuertes vientos (nortes) de octubre a febrero, y un periodo de secas de febrero a mayo.

Debido a su ubicación latitudinal, el GM es un ecosistema marino que presenta mezclas de características

ecológicas de ambientes tropicales y templados (De la Maza y Bernárdez, 2004). Las masas de agua presentes en el GM entran principalmente por el estrecho de Yucatán; en un gradiente de profundidad se puede apreciar la conformación de estas masas de agua, donde la capa superficial es una dilución del mar caribe y el río Amazonas, la capa comprendida entre los 150-200m de profundidad se conforma de masas de agua tropical y subtropical proveniente de las masas de agua superficial del norte y sur del Ecuador (Rivas *et al.*, 2005).

La dinámica entre la atmósfera y el océano, así como la complejidad fisiográfica, que juega un papel importante en los patrones de circulación de las aguas costeras, hacen del GM un sistema ambientalmente heterogéneo de gran riqueza de formas de vida (Moreno-Casasola, 2016). La circulación del GM puede aproximarse a un sistema de dos capas, con una capa superficial de hasta 1,000 m de profundidad y una capa inferior que alcanza el fondo del océano a profundidades de aproximadamente 4,000 m (Lugo-Fernández y Green, 2011).

Los patrones de circulación son el resultado de complejas interacciones entre la batimetría y los mecanismos de forzado, tales como el viento, las condiciones atmosféricas, la densidad del agua (temperatura y salinidad) la corriente de lazo y los remolinos (Mendelssohn *et al.*, 2017). La corriente del Lazo es un sistema de circulación en forma de herradura que ingresa al GM desde el Caribe a través del Canal de Yucatán, y sale por el Estrecho de Florida (Mendelssohn *et al.*, 2017). Su gran inercia genera condiciones energéticas que influyen en los patrones de circulación al interior del GM. El agua que ingresa a través de dicha corriente presenta una mayor temperatura y concentración de sales que las aguas del GM. La ubicación de la corriente de Lazo es variable, y a medida que se desplaza hacia el norte se desprenden remolinos anticiclónicos de núcleos cálidos, que se mueven lentamente hacia el oeste e interactúan con remolinos ciclónicos de núcleos fríos. Las áreas entre los remolinos fríos y cálidos tienen niveles elevados de clorofila, una mayor productividad y biomasa que múltiples especies, utilizan como zonas de alimentación (Mendelssohn *et al.*, 2017; Würsig, 2017).

Además, el GM es una de las áreas con mayor actividad de hidrocarburos en el mundo, siendo una prolífica cuenca con aproximadamente 22,000 emanaciones naturales de hidrocarburos de las cuales, aproximadamente 1000 producen derrames perenes de aceite que pueden ser vistos desde el espacio (Joye *et al.*, 2016) estas zonas activas reciben el nombre de celdas de emanación (MacDonald *et al.*, 2015) y tienen una mayor abundancia hacia el noroeste del GM.

1.2 Hidrocarburos en el Golfo de México.

Las emanaciones naturales de hidrocarburos en el GM han sido utilizadas para determinar zonas de exploración petrolera. Desde hace algunos años, se han registrado constantes vertimientos de petróleo en sus aguas por causas antropogénicas, siendo los más destacados el ocurrido en la sonda de Campeche en junio de 1979 por el pozo petrolero mexicano IXTOC-1 (Patton *et al* 1981; Soto *et al.*, 2014), considerado, en esa época, el mayor desastre medioambiental sucedido en costas del GM. Sin embargo, en abril de 2010 el mayor derrame de petróleo en el GM ocurrió tras la explosión en la plataforma petrolífera sumergible Deepwater Horizon (DWH) del pozo Macondo, con un aproximado de 3.3 millones de barriles vertidos (Joye *et al.*, 2016) el incidente tuvo una extensión desde las costas de Louisiana hasta los cayos de Florida e impactó sobre la fauna marina afectando migraciones de tortuga verde (Gaskil, 2011) y poblaciones de arrecifes coralinos (DeLeo *et al.*, 2016), además, repercutió en pérdidas económicas de aproximadamente 2500 millones de dólares en la industria pesquera (NOAA, 2016).

Pese a los estragos ocasionados por el incidente, este trajo consigo muchas enseñanzas tanto para la industria petroquímica como a la academia en las distintas ramas de las ciencias marinas, pues dio pie a un estudio exhaustivo del GM.

En diciembre de 2014 fue aprobada una reforma energética en México, que permitiría la exploración y explotación de pozos petroleros por inversionistas privados (DOF, 2014). Posteriormente, en 2015 se llevó a cabo la ronda uno de licitaciones para la exploración y explotación de yacimientos petroleros en México (Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2017), donde se subastaron los pozos Amoca-3 (petrolera italiana ENI) en Campeche y Zama-1 (empresas Norteamericanas Talos energy y Premier Oil) en costas de Tabasco los cuales a finales de julio de 2017 reportaron yacimientos con una producción estimada de 1400 -2000 millones de barriles de crudo ligero para Zama-1 (Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2017) y 1000 millones de barriles para Amoca-3 (Eni , 2017). Un tercer yacimiento fue encontrado cerca de la península de Yucatán, pero tuvo que retirarse de la subasta de la ronda 2.4 de la Comisión Nacional de Hidrocarburos ya que conforma un área natural protegida por contener humedales, sitios Ramsar y arrecifes (García, 2017).

1.3 Zooplancton

Muchos procesos biológicos aeróbicos en el océano están regidos por la disponibilidad de luz, la cual tiene una penetración en algunos casos hasta los primeros 200 m de profundidad en aguas templadas, a este estrato se le conoce como zona fótica y alberga una gran diversidad de organismos planctónicos, entre estos se distingue al zooplancton, grupo conformado por organismos unicelulares coloniales y multicelulares, los cuales se clasifican en 2 grupos: Holoplanctónicos y Meroplanctónicos. Los primeros son conocidos como plancton permanente, ya que todos sus ciclos de vida se desarrollan en la columna de agua, mientras que los organismos meroplanctónicos son residentes temporales de la comunidad planctónica, entre ellos se encuentran principalmente organismos tales como huevos y larvas de peces, así como etapas larvales de muchos invertebrados bentónicos como almejas, caracoles y estrellas de mar. Por otra parte, los organismos holoplanctónicos incluyen a algunos subgrupos de protozoarios unicelulares como dinoflagelados, foraminíferos y radiolarios, además de quetognatos artrópodos como cladóceros y copépodos y cordados como apendiculados y sálpidos (Lalli y Parsons, 2006).

Para el GM se ha observado que la composición del zooplancton está conformada principalmente por copépodos (62%), ostrácodos (11.6 %) y otros crustáceos (7.7 %) (Howey, 1976). La distribución que presentan estos copépodos se mantiene polarizada hacia la plataforma continental, principalmente poblaciones de copépodos calanoides las cuales suelen concentrarse cerca de los deltas (Howey, 1976).

Se ha especulado sobre el papel de algunos copépodos como vectores para bacterias del género *Vibrio* en el GM, asociando a *Acartia tonsa* (*Calanoida:Acartiidae*) con la prevalencia de *Vibrio cholerae* El Tor durante la primavera (abril-mayo) de 1999 en costas de Veracruz (Lizarraga-Partida *et al.*, 2009).

1.4 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Estas bacterias son todas aquellas capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía; son un grupo con una distribución cosmopolita encontrándose tanto en aire como en suelo y agua, además, está conformado por un diverso grupo de géneros microbianos tales como *Aeromonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Burkholderia* (Rauch *et al.*, 2006), *Oceanospirillales*, *Pseudomonas*, *Alkanivorax*, *Cycloclasticus* (Teramoto *et al.*, 2013) y *Vibrio* (Hedlund y Staley, 2001) entre otras, unidos principalmente por su capacidad hidrocarbonoclástica. El estudio de estos

organismos resulta interesante desde una perspectiva bioquímica y molecular, además de su papel a una escala ecológica funcional.

1.5 Género *Vibrio*

Son gama-proteobacterias gram-negativas anaerobias facultativas, conforman un grupo heterogéneo y tienen una amplia distribución. Se localizan mayormente en aguas dulces, salobres y estuarinas (Robert-Pilot *et al.*, 2014) y a menudo están asociadas con animales y plantas acuáticas (Ceccarelli y Colwell, 2014). Pueden soportar diversas condiciones ambientales debido a que muchas de ellas se han especializado para habitar en distintos hospederos (v.gr: *V. fisheri*, *V. cholerae*, *V. logei*, *V. halioticoli*). Diversos estudios han demostrado que durante los meses más cálidos hay un aumento considerable en el número de organismos del género *Vibrio* (Johnson *et al.*, 2010) al igual que un incremento en el reporte de casos de infecciones por estos organismos (Baker-Austin *et al.*, 2018).

De acuerdo con el manual de Bergey de sistemática bacteriana en su 2ª edición (2005), han sido descritas 44 especies de *vibrio* aunque, se han propuesto alrededor de 88 (Sawabe *et al.*, 2014), independiente mente al número de especies, se estima que por lo menos 12 son patógenas para el ser humano (Panicker *et al.*, 2004), de las cuales las más comunes son *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, y *V. alginolyticus* (Robert-Pilot., *et al* 2014).

Las infecciones humanas causadas por vibrios patogénicos pueden separarse en 2 grupos:

1. **Infecciones coléricas:** Causantes de severas enfermedades diarreicas, usualmente transmitidas por la ingesta de agua y/o comida contaminada (Thompson *et al.*, 2005), además de la transmisión de persona a persona (Baker-Austin *et al.*, 2018).
2. **Infecciones no coléricas:** Producen un grupo de infecciones diferentes dependiendo de la especie patogénica, la ruta de infección y la susceptibilidad del hospedero. Estas pueden ser septicemia primaria, gastroenteritis aguda, septicemia secundaria que puede producir necrosis (Newton *et al.*, 2012).

1.5.1 *Vibrio cholerae*

Considerado como una de las mayores plagas de la humanidad, los primeros casos de infección por este organismo datan del año 500 e.c¹. cerca del Delta del río Ganges (Barua, 1992). Se han determinado más de 200 serogrupos de *V. cholerae* sin embargo, los principales serogrupos causantes de cólera han sido el serogrupo O1 (biotipo Clásico y El Tor) y el O139 (Bengala), aunque se han reportado casos de enfermedades gastrointestinales producidos por vibrios No-O1 y No-O139 (Robert-Pilot *et al.*,2014).

Uno de los agentes patogénicos de *V. cholerae* es la colerotoxina CT conformada por las subunidades A y B, su expresión está regulada por el operón *ctxAB*; los genes *ctxA* y *ctxB* han sido propuestos como marcadores moleculares para la determinación de los serotipos patógenos (Robles *et al.*, 1999).

1.5.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Ubicua de aguas templadas y tropicales, es una bacteria halófila causante del mayor número de infecciones gastrointestinales en zonas de costa a través del consumo de mariscos crudos o mal cocinados (Hurley *et al.*, 2006). La mayoría de los registros de este organismo se focalizaban en el continente asiático hasta 1960 por grupos heterogéneos, pero 1996 comenzaron a prevalecer los casos de infección por el serotipo O3:K6 el cual presenta como factor de virulencia a la hemolisina termoestable directa (*tdh*) pero no a la hemolisina relacionada a TDH (*Trh*) (Baker-Austin *et al.*, 2018).

1.5.3 *Vibrio vulnificus*

Es una bacteria oportunista que suele encontrarse en aguas estuarinas y puede agregarse en biofilm con otros microorganismos o entrar en estado de latencia (Froelich y Noble, 2016). Existen 3 biotipos, siendo el biotipo 1 un veloz agente de septicemia llegando a producir enfermedades diarreicas fulminantes, es el más común en infecciones en humanos. El biotipo 2 llega a producir infecciones en humanos, pero es más común en organismos acuáticos (Fouz *et al.*, 2007). Finalmente, el tercer biotipo sólo se ha encontrado en

¹ Era común.

Israel y causante de bacteremia e infecciones en heridas (Bisharat *et al.*, 1999). Todos los biotipos son agentes necróticos. No se han reconocido los factores de patogenicidad de este organismo, pero se sabe que produce hemolisina vvhA. Reportes clínicos muestran una mayor incidencia en personas con afecciones hepáticas e inmunocomprometidas (Lee *et al.*, 2013).

Las vías de infección más comunes son mediante la ingesta cruda de organismos contaminados y mediante la exposición de heridas abiertas a medios contaminados (Whitman y Flick, 1995).

1.5.4 *Vibrio alginolyticus*

Este microorganismo del género *Vibrio* se clasificaba anteriormente como un biotipo de *V. parahaemolyticus*, pero en 1965 Zen-Yoji y colaboradores sugirieron el cambio de nivel taxonómico a especie. *Vibrio alginolyticus* tiene un rango de crecimiento óptimo en temperaturas entre 18-22°C, es halófila, pudiendo desarrollarse en un rango de salinidad entre 3 al 10% de NaCl (Bergey's manual; Krieg y Holt, 1984). Al igual que otras especies patógenas de vibrio, *V. alginolyticus* está relacionada con la producción de enfermedades gastrointestinales en humanos, además puede producir septicemia y contaminar heridas expuestas, sin embargo, a diferencia de otros organismos del mismo género, puede producir necrosis no sólo en tejido epidérmico humano, sino en otros organismos de la fauna marina (Martins *et al.*, 2010).

La asociación de bacterias del género *Vibrio* a organismos zooplanctónicos ha sido expuesta por diferentes autores (Lizarraga-Partida *et al.*, 2009) sin embargo, se desconoce la posible influencia de las emanaciones naturales o accidentales de petróleo en el GM sobre dicha asociación, en especial con aquellas especies patógenas para el ser humano, lo que implica un aumento o disminución del riesgo de enfermedades infecciosas transmitidas por organismos marinos.

1.6 Antecedentes

Lizarraga-Partida (1996) presentó el caso de estudio de distintas campañas oceanográficas realizadas al sur del GM, en la península de Yucatán, donde, entre otras cosas, destacó algunos aspectos generales de

las bacterias degradadoras de petróleo y su respuesta de acuerdo con la magnitud de los aportes recibidos. Utilizando la tasa de bacterias heterótrofas degradadoras de petróleo/ bacterias heterótrofas viables (BHDP/BHV) como marcador de impacto por las aportaciones de hidrocarburos sobre la comunidad bacteriana en Laguna de Términos y La Sonda de Campeche se concluyó que los aportes de hidrocarburos provenientes del Caribe no afectan la zona de La Sonda de Campeche ya que la tasa BHDP/BHV sigue la dirección de la corriente de rizo, entrando al Golfo por el estrecho de Yucatán para dar un giro y salir por la península de Florida.

En la zona fótica existe una interacción constante entre comunidades de bacterioplancton fitoplancton, y zooplancton. En 2002 Heidelberg y colaboradores estudiaron la abundancia estacional de γ -proteobacterias asociadas al zooplancton en la bahía de Chesapeake, reportaron que una porción significativa de la flora externa natural bacteriana del zooplancton con exoesqueleto de quitina estaba representada por *Vibrio* spp. proponiendo que el acceso a estos recursos como fuente de carbono y nitrógeno les confieren ventajas adaptativas respecto a otras bacterias marina; concluyeron que durante las estaciones de primavera y verano es cuando ocurre un mayor florecimiento bacteriano, sin embargo, la asociación bacteria-zooplancton les permite continuar con su ciclo de vida durante épocas de bajas temperaturas, además de permitirles distribuciones boreales.

Por otra parte, Bickel y Tang en 2014 estudiando al bacterioplancton asociado al mesozooplancton concluyeron que esta relación provee de microhábitats aerobios y anaerobios, propiciando nuevos nichos para distintas poblaciones bacterianas, demostrando que la composición de bacterioplancton es significativamente diferente al resto de las bacterias marinas en otras zonas de dispersión. Además, estudiaron a las bacterias de la flora intestinal del zooplancton y propusieron que esta relación puede llegar a beneficiar tanto al hospedero como al huésped.

Kikuchi y colaboradores (2014) demostraron que la simbiosis entre microorganismos degradadores de hidrocarburos del género *Burkholderia* en el intestino del artrópodo *Riptortus pedestris*, le permite adaptarse a suelos tratados con pesticidas a base de fenitrotión.

En otro estudio, Patcharapon y colaboradores (2017) concluyeron por PCR cuantitativa (qPCR, quantitative chian reaction, por sus siglas en inglés) que bacterias simbióticas del grupo de las β -proteobacterias del orden *Burkholderiales* le confieren al crustáceo zooplanctónico *Daphnia magna* una mayor resistencia química a compuestos derivados de pesticidas que se han mezclado con la columna de agua.

Por otra parte, algunos autores han propuesto que una gran cantidad de bacterias degradadoras de petróleo en el medio no garantiza una óptima degradación del hidrocarburo, sin embargo, la presencia de estas bacterias sí delata la presencia de pequeñas cantidades de hidrocarburo, por lo que algunos investigadores han propuesto a estos microorganismos como bioindicadores para la detección de emanaciones de petróleo (Kimes *et al*, 2013).

A pesar de que las BDH (Bacterias degradadoras de hidrocarburos) poseen una plétora de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos, Hara y colaboradores en 2004, identificaron dos genes clave para la degradación de estos compuestos (*alkB1* y *alkB2*), mediante clonas de estos genes; este equipo de investigadores concluyó que el gen *alkB1* codifica para un alcano hidroxilasa responsable de la degradación de n-alcano de cadena corta.

Por otra parte, Dombrowski y colaboradores en 2016, utilizando a los genes *alkB1* y RNAr16S como huella dactilar reconstruyeron metagenomas de BDH de muestras ambientales de aguas someras obtenidas del GM después del derrame del DWH y reportaron una mayor abundancia de los géneros de *Alcanivorax*, *Cycloclasticus* y *Marinobacter*.

Alcanivorax borkumensis es una bacteria marina con distribución cosmopolita que utiliza exclusivamente hidrocarburos como fuente de carbono y energía, es el organismo modelo para estudio de BDH. Se cuenta con la secuencia del genoma completo de una estirpe *A. borkumensis* SK2 de la cual se ha observado que en presencia de alcanos tiene un aumento en la síntesis de tres proteínas, estas son: I) Malato sintasa GlcB, II) Subunidad α del complejo de oxidación de ácidos grasos y III) Citocromo p450 (*cyt p450*) (Sabirova *et al*, 2006).

A diferencia de *Alcanivorax*, poco se sabe sobre las rutas de degradación de hidrocarburos utilizadas por *Cyclocaasticus*, sin embargo, esta bacteria es capaz de degradar una gran variedad de hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre ellos fenantreno y naftaleno. Geiselbrecht y colaboradores/ (1998) realizaron estudios con muestras de sedimento del GM, encontrado la presencia de estos microorganismos.

En el presente trabajo, inicialmente se intentó la detección de bacterias degradadoras de hidrocarburos de los géneros *Alcanivorax*, *Cycloclasticus* y *Marinobacter*, asociadas al zooplancton, ya que previamente se había detectado su presencia en muestras de agua y sedimento por otros miembros del laboratorio, sin embargo, dichos géneros no fueron detectados por qPCR, por lo que el enfoque del estudio se centró en

la detección de vibrios patógenos para el ser humano asociados al zooplancton y en muestras de sedimento.

1.7 Justificación

Se ha comprobado la asociación de bacterias heterótrofas con los distintos organismos que conforman al zooplancton, pero se desconoce si bacterias degradadoras de hidrocarburos pueden albergarse en este sitio, por lo que es necesario esclarecer esta relación debido a que muchos derrames de hidrocarburos comienzan en la superficie del mar. Sin embargo, Dado que durante el desarrollo del presente trabajo no se registró la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos en las muestras de zooplancton, el estudio se enfocó en la detección de vibrios patógenos para el ser humano en muestras de zooplancton colectadas en mar abierto y en muestras de sedimento, para reforzar la hipótesis de que el zooplancton constituye un vector de transmisión de estos vibrios y el sedimento un posible reservorio.

1.8 Hipótesis

Por su diversidad y riqueza específica, el zooplancton puede representar un medio idóneo para el crecimiento y transporte de bacterias degradadoras de hidrocarburos y organismos patógenos pertenecientes al género *Vibrio* en el medio marino; De igual modo el sedimento del Golfo de México puede representar un reservorio para vibrios patogénicos.

1.9 Objetivos

- **1.9.1 Objetivo general**
 - Estimar la presencia y abundancia de bacterias degradadoras de petróleo y de bacterias patógenas para el ser humano del género *Vibrio* asociadas al zooplancton y al sedimento en muestras del Golfo de México.

- **1.9.2 Objetivos específicos**

- Obtener DNA de muestras de zooplancton colectadas en el Golfo de México durante las campañas XIXIMI-04 y XIXIMI-05, por parte del grupo de investigación del proyecto “Diversidad de ictioplancton y zooplancton en el Golfo de México: una aproximación metagenómica y taxonómica”.
- Analizar muestras de DNA de zooplancton de estaciones de XIXIMI-04 y XIXIMI-05 para detectar y cuantificar la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos de los géneros *Alcanivorax*, *Cycloclasticus* y *Marinobacter*
- Analizar muestras de DNA de zooplancton y sedimentos de estaciones de XIXIMI-04 y XIXIMI-05 para detectar y cuantificar *Vibrio* spp.
- Detectar y cuantificar la presencia de vibrios patógenos (*V. cholerae*, *V. cholerae* ctx⁺ *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus* tdh⁺)

Capítulo 2. Metodología

2.1 Área de estudio

Uno de los objetivos de las campañas oceanográficas “XIXIMI” es establecer una línea base para el conocimiento del Golfo de México desde distintas disciplinas a lo largo de una escala temporal, por lo que año con año se han realizado estas campañas, muestreando en 43 estaciones localizadas en el sur del GM (Fig. 1).

2.2 Colecta de muestras

Se trabajó con DNA de muestras de zooplancton obtenido de distintas estaciones (Fig. 1) durante los cruceros oceanográficos XIXIMI-04 (XIX-04, realizado del 27 de agosto al 16 de septiembre de 2015) y XIXIMI-05 (XIX-05, realizado del 10-25 de junio de 2016), además, se utilizaron muestras de sedimento de ambos cruceros, los cuales se realizaron a bordo del Buque oceanográfico “Justo Sierra” de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la colecta de zooplancton se utilizó una red tipo bongo, con dos redes con luz de malla de 333 μm , con boca de apertura de 60 cm y copos de colecta. Se realizaron arrastres oblicuos desde la superficie hasta una profundidad de 200 m, siguiendo la metodología de Smith y Richardson (1977). Las muestras obtenidas fueron concentradas en frascos de medio litro y fijadas con etanol al 96% con recambio a las 48 horas.

Las muestras de sedimento fueron colectadas a distintos niveles de profundidad utilizando un nucleador de caja tipo Reineck. De este núcleo se tomó una porción del sedimento de 10 cm de profundidad con jeringas estériles de 10 cm^3 . Las muestras fueron almacenadas en neveras a -4°C para su transporte y finalmente resguardadas a -80°C en los laboratorios del CICESE.

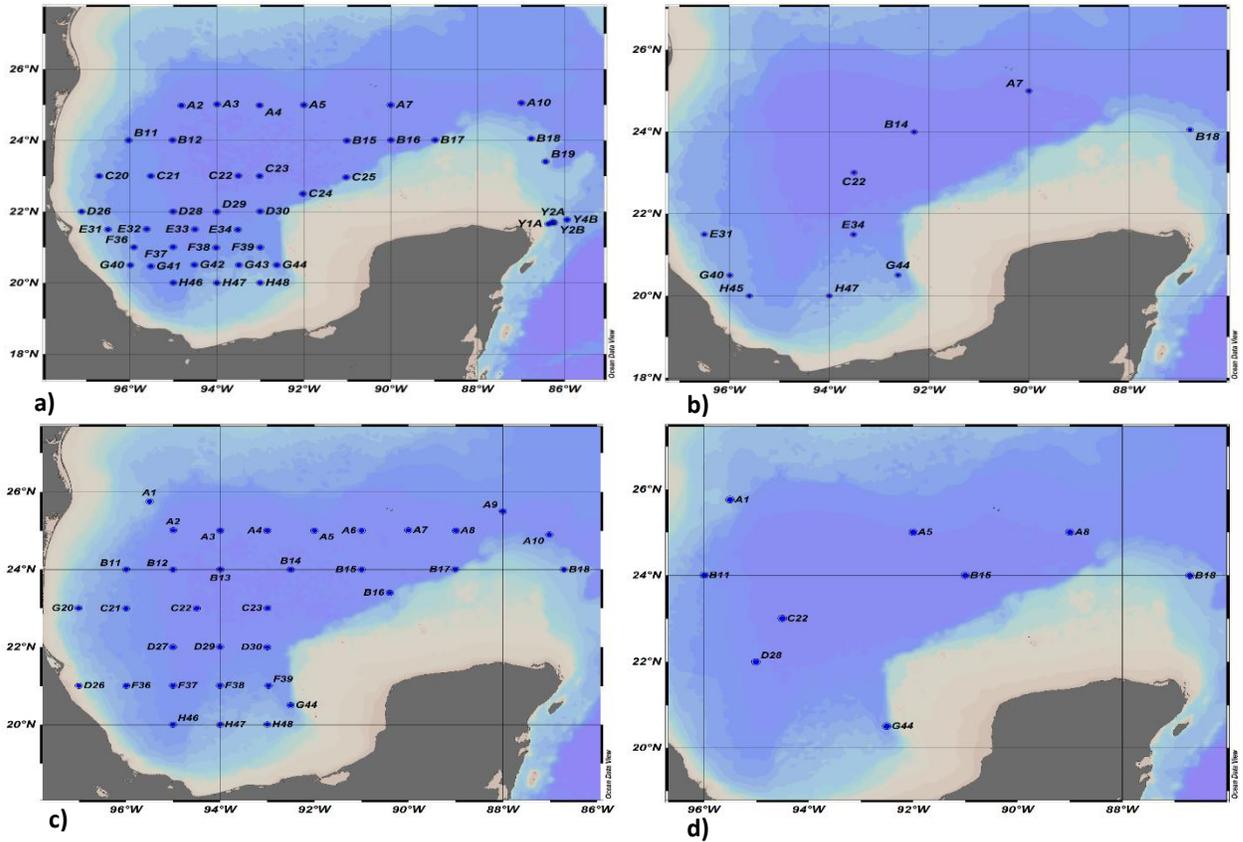


Figura 1. Estaciones del crucero oceanográfico XIXIMI-04 y XIXIMI-05, mostrando la ubicación de las estaciones de colecta de a) muestras de zooplancton XIX-04, b) muestras de sedimento XIX-04, c) muestras de zooplancton XIX-05 y d) muestras de sedimento XIX-05.

2.3 Extracción de DNA

2.3.1 Muestras de zooplancton

El DNA genómico (DNAg) se extrajo utilizando una modificación al método de Corell y Rodríguez-Ezpelleta (2014), para las muestras de XIXIMI-04 se alternó el uso de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (F-C-I) y columna de sílice, mientras que para las muestras de XIXIMI-05 se utilizó únicamente F-C-I.

2.3.2 Muestras sedimentos

La extracción de DNA se realizó con el kit Power soil[®] (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se obtuvo un volumen final de extracción de DNA de 5000 μ L por 10 gr de sedimento para cada estación de XIXIMI-04 y de 100 μ L por 10 gr de sedimento para XIXIMI-05.

2.4 Detección y cuantificación de los organismos por PCR

La detección de los organismos de interés se realizó con el apoyo de tres variantes de la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa; utilizando PCR punto final para la detección de algunos organismos y PCR en tiempo real con SYBR green I y sondas Taqman para la detección y posterior cuantificación de los organismos.

2.4.1 Amplificación por PCR punto final

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti de 96 pocillos marca Applied Biosystems. La mezcla de reacción para todas las pruebas fue de un volumen de 20 μ L, compuesta por Buffer Green (Go Taq Flexi) 1x, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.3 mM dNTPs (de una mezcla total de 10 mM de dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP, 10 mM dGTP), 0.5 μ M primer forward, 0.5 μ M primer reverse, 1.25 unidades de taq polimerasa (Gotaq flexi), 2 μ l de templado y agua libre de nucleasas.

Se utilizaron los primers y las condiciones de PCR que se muestran en la tabla 1 específicos para cada cepa a identificar. En todos los casos se realizó un paso inicial a 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de reacción y un paso final de polimerización a 72°C durante 5 minutos.

Los amplicones obtenidos fueron evaluados por electroforesis con un voltaje de 70mV durante 50 min en un gel de agarosa al 2% sumergido en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE).

Tabla 1. Lista de rimers para PCR punto final para BDH y vibrios

Especie	Segundos/°C	Secuencia 5'-3'	Amplicón (bp)	Autor
<i>Alcanivorax spp</i>		Alcx-464F-GAG TAC TTG ACG TTA CCT ACA G		
Desnaturalización	30/95		211	Kostka <i>et al.</i> , 2011
Alineación	30/55	Alcx-675R-ACC GGA AAT TCC ACC TC		
Extensión	30/72			
<i>Cycloclasticus spp</i>		Cyc-467f-AAC CTT AGG CCC TGA CGT		Gutierrez <i>et al.</i> , 2015
Desnaturalización	30/95		128	
Alineación	30/60	Cyc-577r-TGT TTA ACC GCC TAC GCG		
Extensión	30/72			
<i>Marinobacter spp</i>		Marinob300F- GACTGAGACACGGCCCGA		Bonin <i>et al.</i> , 2014
Desnaturalización	30/95		297	
Alineación	30/56	Marinob600R- CCGGGGCTTTCACATCTCG		
Extensión	30/72			
<i>Vibrio spp</i>		567F- GGC GTA AAG CGC ATG CAG GT		Thompson <i>et al.</i> , 2004
Desnaturalización	30/95		114	
Alineación	30/56	680R- GAA ATT CTA CCC CCC TCT ACA G		
Extensión	20/72			
<i>V. cholerae</i>		ompW-f-CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG		Nandi <i>et al.</i> , 2000
Desnaturalización	30/95		588	
Alineación	30/61	ompW-r-GAACTTATAACCACCCGCG		
Extensión	40/72			
<i>V. cholerae ctxA+</i>		F- VCT1 ACAGAGTGAGTACTTTGACC		Hoshino <i>et al.</i> , 1998
Desnaturalización	30/95		308	
Alineación	30/58	R-VCT2 ATACCATCCATATATTTGGGAG		
Extensión	40/72			
<i>V. vulnificus</i>		vvh-785-CCGCGGTACAGGTTGGCGCA		FDA, 2004
Desnaturalización	30/95		519	
Alineación	30/62	vvh-1303-CGCCACCCACTTTCGGGCC		
Extensión	60/72			

2.4.2 Amplificación por qPCR SYBRgreen I

Las reacciones de qPCR con SYBRgreen I se realizaron en un equipo Step One Plus de Applied Biosystems con placas MicroAmp®Fast de 96 pocillos. Para una validez estadística, todas las muestras se analizaron por triplicado y se utilizó un blanco de reacción y un control positivo.

Se utilizó una mezcla de reacción con un volumen total de 10 μ l, estuvo conformada por 0.4 μ M de primer forward, 0.4 μ M del primer reverse, Buffer HotStart-IT SYBR Green MasterMix 1X y agua libre de nucleasas aforada a 10 μ l.

Se utilizaron los primers y condiciones de PCR que se muestran en la siguiente tabla 2. Para todos los casos se realizó un paso inicial de 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de reacción, finalmente se realizó una curva de disociación con un primer paso de 95°C por 15 segundos, un segundo paso de 1 minuto a 60°C seguido de un aumento gradual de la temperatura + 0.3°C cada 15 segundos hasta llegar a los 95°C.

Tabla 2. Primers para qPCR SYBRgreen I para vibrios

Especie	Segundos/°C	Secuencia 5'-3'	Amplicón (bp)	Autor
Vibrio spp		567F-GGCGTAAAGCGCATGCAGGT		Thompson
Desnaturalización	30/95		114	<i>et al.</i> , 2004
Alineación	30/60	680R-GAAATTCTACCCCCTCTACAG		
Extensión	30/72			
V. alginolyticus		groEL-F-GATTCGGTGAAGAAGAGAGATCT C		Ahmed <i>et al.</i> , 2016
Desnaturalización	30/95		310	
Alineación	30/60	groEL-R-TCTTCGTTGTCACCCGTTAGGTGA		
Extensión	30/72			
V. cholerae ctxA+		F- VCT-ACAGAGTGAGTACTTTGACC		Hoshino
Desnaturalización	30/95		308	<i>et al.</i> , 1998
Alineación	30/58	R-VCT2-ATACCATCCATATATTTGGGAG		
Extensión	40/72			

2.4.3 Amplificación de sondas Taqman por qPCR

Las reacciones de qPCR con sondas Taqman se realizaron en un equipo CTX96 C1000 Touch Bio-Rad® con placas de 96 pocillos. Para la detección y cuantificación de los organismos de interés se utilizaron distintos sets de primers y sondas específicas para distintos marcadores moleculares de acuerdo con los organismos a identificar; en la tabla 3 se muestran los primers, sondas y regiones a amplificar, además de las condiciones de PCR. Para todos los casos se realizó un paso inicial de 95°C durante 2 minutos seguido de 40 ciclos de reacción.

La mezcla de reacción constó de 0.4 μ M de primer forward y 0.4 μ M de primer reverse, además de 0.2 μ M de la sonda, buffer iQ Multiplex powermix (Bio-Rad) 1X y agua libre de nucleasas aforada a 10 μ l.

Se utilizaron los canales necesarios para la excitación y colecta de datos de cada fluoróforo de las distintas sondas según sus requerimientos.

Para una validez estadística, todas las muestras se analizaron por triplicado y se utilizó un blanco de reacción y un control positivo.

Se utilizaron las condiciones de PCR óptimas para cada par de primer junto con su sonda, como se describe más adelante.

Tabla 3. Primers y sondas para qPCR para vibrios.

Especie	Segundos/°C	Secuencia 5'-3'	Amplificación (bp)	Autor
<i>V. cholerae</i>		F-hlyA- TGC GTT AAA CAC GAA GCG AT		
Desnaturalización	30/95	R-hlyA- AAG TCT TAC ATT GTG CTT GGG TCA	70	Lyon, 2001
Alineación/ Extensión	45/58	P-hlyA- TCA ACC GAT GCG ATT GCC CAA GA		
<i>V. cholerae ctxA+</i>		Ctx2-F- CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G		Fields <i>et al.</i> , 1992
Desnaturalización	30/95	CtxA-R- ATA CCA TCC ATA TAT TTg ggA	564	
Alineación/ Extensión	45/58	P-CtxA- FAM-TAgCCACTgCACCCAACATg-BBQ		Robert-Pilot <i>et al.</i> , 2014
<i>V. parahaemolyticus</i>		F-tl-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC		
Desnaturalización	30/95	R-tl- GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	450	Ward y Bej, 2006
Alineación/ Extensión	45/58	P-tl952- TEXR-AAG AAC TTC ATG TTG ATG ACA CT-BHQ2		
<i>V. parahaemolyticus tdh+</i>		Ftdh170DG- GTA RAG GTC TCT GAC TTT TGG AC		
Desnaturalización	30/95	R-tdh403- CTA CAG AAT YAT AGG AAT GTT GAA G	229	Ward y Bej, 2006
Alineación/ Extensión	45/58	P-tdh-341R- CY5-ATT TTA CGA ACA CAG CAG AAT GA-Iowa Black-RQ		
<i>V. vulnificus</i>		F-vvh785- TTC CAA CTT CAA ACC GAA CTA TGA C		
Desnaturalización	30/95	Rvvh990- ATT CCA GTC GAT GCG AAT ACG TTG	205	Panicker y Bej 2005
Alineación/ Extensión	45/62	P-vvh874- ROX-AAC TAT CGT GCA CGC TTT GGT ACC GT-3-BHQ-2		

2.5 Cuantificación de los grupos estudiados

Para la cuantificación del número de copias de los organismos presentes en las distintas estaciones, se construyó una curva estándar utilizando como templado DNA de cepas puras de la colección del cepario del CICESE.

2.5.1 Determinación de una curva estándar para la cuantificación de organismos de interés

Se utilizaron muestras de DNA de cepas aisladas pertenecientes a la colección CICESE (tabla 4), el DNAg se purificó con el kit Wizard genomic de Promega, de acuerdo con las condiciones del fabricante.

Tabla 4. Cepas puras de colección CICESE para elaboración de curvas estándar.

Registro CICESE	Colección de origen	Cepa	Peso genoma	Comentarios
CICESE 4	ATCC 17749	<i>V. alginolyticus</i>	5.21047 Mb	RCC 256
CICESE 122	RCC 619/CNRVC 030096/Bartlett M5 91/285	<i>V. cholerae</i>	4.02664 Mb	O1, Ogawa <i>ctxA</i> , <i>tcpA</i> (+); <i>chxA</i> (-).Aislada en 1991. Taxcopan Hgo.
CICESE 21	CNRVC 010089	<i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i>	5.12239 Mb	Tdh (+) 269 pb; trh (+) 500pb.
CICESE 35	ATCC 27562	<i>V. vulnificus</i>	5.00716 Mb	RCC 260 productora de hemolisina

Para corroborar que las cepas de la colección CICESE fueran las correctas para el estudio se comprobó la presencia de los distintos genes de interés mediante PCR punto final, utilizando los primer y condiciones de PCR que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Primer PCR punto final para la identificación de cepas puras.

Cepa	Secuencia 5'-3'	Tm	Fragmento	Amplicón	Autor
<i>Vibrio cholerae</i>	ompW-f-CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG ompW-r-GAACTTATAACCACCCGCG	61°C	ompW	588	Nandi <i>et al.</i> , 2000.
<i>Vibrio cholerae</i> <i>ctxA</i> ⁺	F- VCT1 ACAGAGTGAGTACTTTGACC R-VCT2 ATACCATCCATATATTTGGGAG	58°C	ctxA	308	Hoshino <i>et al.</i> , 1998.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> ⁺	L-tdh. GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC R-tdh. TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	58°C	tdh	269	Bej <i>et al</i> 1999
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	tl-f. AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG tl-r. GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	58°C	tlh	450	Bej <i>et al</i> 1999
<i>Vibrio vulnificus</i>	vvh-785-CCGCGGTACAGGTTGGCGCA vvh-1303-CGCCACCCACTTTCGGGCC	62°C	vvh	519	FDA, 2004

Se prepararon diluciones seriadas 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} para generar una curva estándar logarítmica y se amplificó utilizando los primer y sondas con los que se cuantificaron las muestras de las distintas estaciones.

El número de bacterias tentativas se determinó al conocer el peso molecular del genoma de las distintas especies. Al sólo presentar una copia del gen diana fue posible una cuantificación absoluta con la siguiente fórmula propuesta por Hein (*et al.*, 2001), Staroscik (2004), y Shikuma y Hadfield (2010) para calcular el número de copias del genoma de cada especie.

$$\text{Copias (genoma)} = \frac{(\text{DNAng})(6.023 \times 10^{23})}{(\text{bp})(1 \times 10^9 \text{ng})(650 \text{D})}$$

Donde bp=pares de bases del genoma, DNAng= DNA en 1 ng

2.5.2 Ecuación de la recta y cuantificación

La cuantificación se realizó comparando los valores de Ct obtenidos contra una curva estándar previamente establecida.

Para determinar el número de copias de las muestras se obtuvo la ecuación de la recta mediante una regresión lineal simple.

$$y' = a + bx$$

$$a = \frac{n \sum_1^n x_i y_i - (\sum_1^n x_i)(\sum_1^n y_i)}{n \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2}$$

$$b = \frac{n \sum_1^n y_i - a \sum_1^n x_i}{n}$$

$$a = \textit{intersección}$$

$$b = \textit{pendiente}$$

Posteriormente, el valor del número de copias estimado fue multiplicado por el factor de dilución de cada muestra, el volumen de agua de mar filtrada, volumen final de extracción de DNA y la concentración de DNA utilizada para la amplificación en tiempo real.

Se calculó la eficiencia de la reacción de PCR utilizando la siguiente fórmula:

$$\left(-1 + 10^{\frac{-1}{m}}\right)100$$

$$m = \textit{pendiente}$$

2.6 Distribución de vibrios en el Golfo de México

Se utilizó un método geoestadístico de estimación de puntos por el análisis variacional de interpolación de datos ("*Data interpolating variational analysis*") o DIVA por sus siglas en inglés, desarrollado por Troupin y colaboradores (2012). La visualización de la distribución de los organismos se realizó con el software Ocean Data View v5.0 (Schlitzer, 2018).

Capítulo 3. Resultados

Se trabajó con muestras de DNA de zooplancton de 43 estaciones colectadas en XIXIMI-04 y de 33 estaciones colectadas en XIXIMI-05; además se utilizaron muestras de sedimento de ambas campañas oceanográficas, con un total de 10 estaciones para XIXIMI-04 y 9 estaciones para XIXIMI-05.

3.1 Detección de los organismos de interés mediante PCR punto final

3.1.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Se seleccionaron muestras al azar de 8 estaciones de XIX-04 y XIX-05 para analizar por PCR punto final la presencia de los géneros *Alcanivorax* spp., *Marinobacter* spp., *Cycloclasticus* spp., en muestras de zooplancton colectadas en el sur del GM. Se probaron distintas concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción y diferentes condiciones de PCR, sin embargo, no se logró obtener amplicón para los géneros estudiados (Fig. 2).

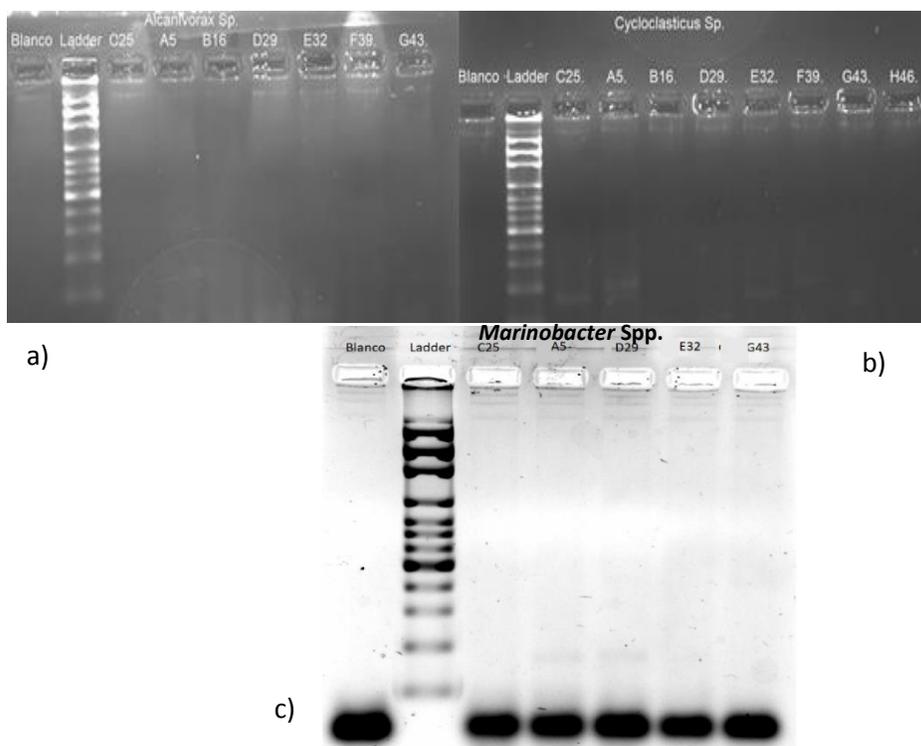


Figura 2 Gel de agarosa con productos de PCR de las estaciones XIX-04 Bacteria degradadora de hidrocarburos. **a)** Estaciones analizadas para determinar la presencia de *Alcanivorax* spp. **b)** Estaciones analizadas para determinar la presencia de *Cycloclasticus* spp. **c)** Estaciones analizadas para determinar la presencia de *Marinobacter* spp.

3.1.2 *Vibrio* spp.

Se registró la presencia de especies del género *Vibrio* en 17 estaciones de XIX-04. En las muestras analizadas para el crucero XIX-05, no se obtuvieron amplicones para especies de este género, a pesar de cambios en las condiciones del análisis. (Fig. 3).

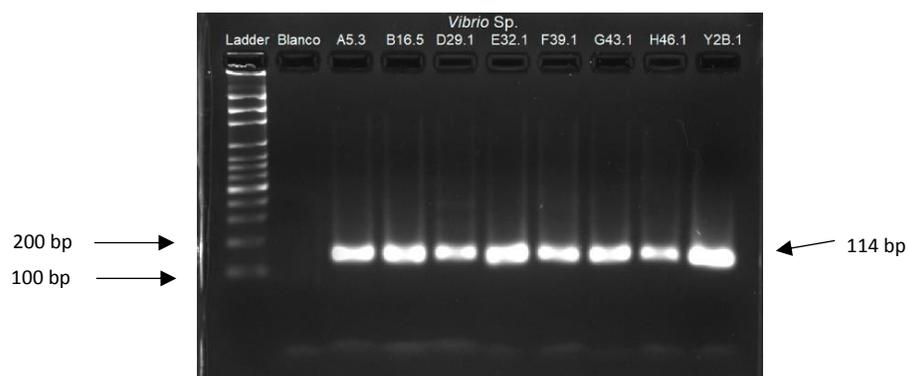


Figura 3 . Gel de agarosa con productos de PCR de las estaciones de XIX-04 utilizando los primer para 16S rDNA de *Vibrio* spp.

3.1.3 *Vibrio cholerae*

De las 17 estaciones de XIX-04 donde se detectó la presencia del género *Vibrio* spp., en zooplancton, únicamente en 10 de ellas se registró la presencia de la especie *V. cholerae*, con los primers para *ompW*, con los cuales el amplicón esperado corresponde a un peso aproximado de 588 pares de bases (Fig.4).

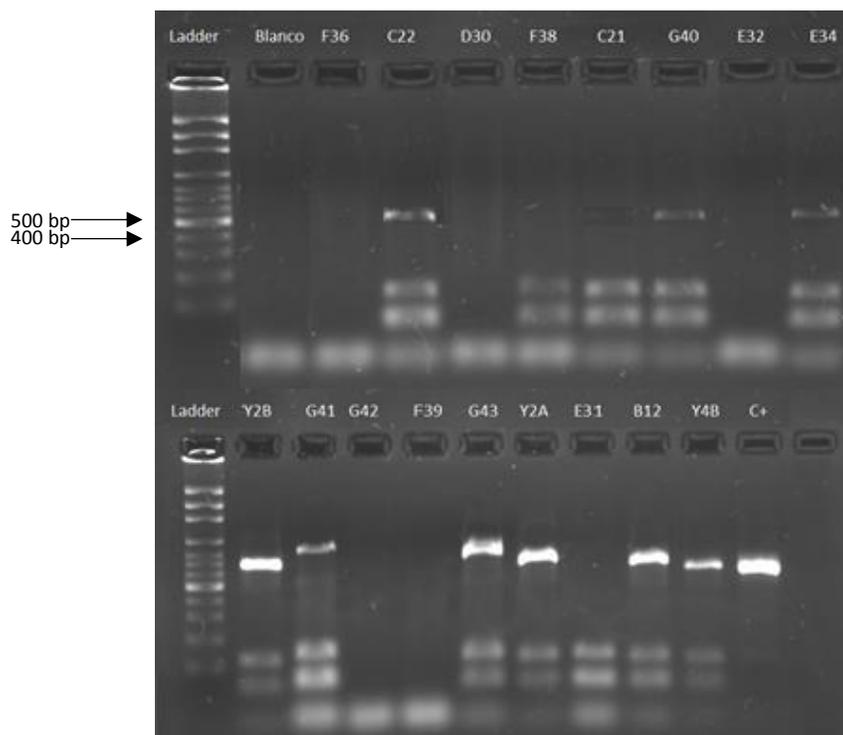


Figura 4. Gel de agarosa con productos de PCR positivos para *V. cholerae* toxigénico. Se analizaron todas las estaciones en las que se encontró la presencia de *Vibrio* spp, de estas, en 10 se encontró la presencia de *V. cholerae* toxigénico.

3.1.4 Factor de patogenicidad *ctx A* de *Vibrio cholerae*

De las 10 estaciones donde se registró *V. cholerae* en XIX-04, sólo en 5 de ellas se detectó la toxina *ctxA* (figura 5), lo que indica la presencia, en estas muestras, de *V. cholerae* toxigénico (Fig. 5). En estas 5 muestras se procedió a cuantificar al número de copias de *V. cholerae ctxA*⁺ utilizando la técnica de qPCR con SYBR green I

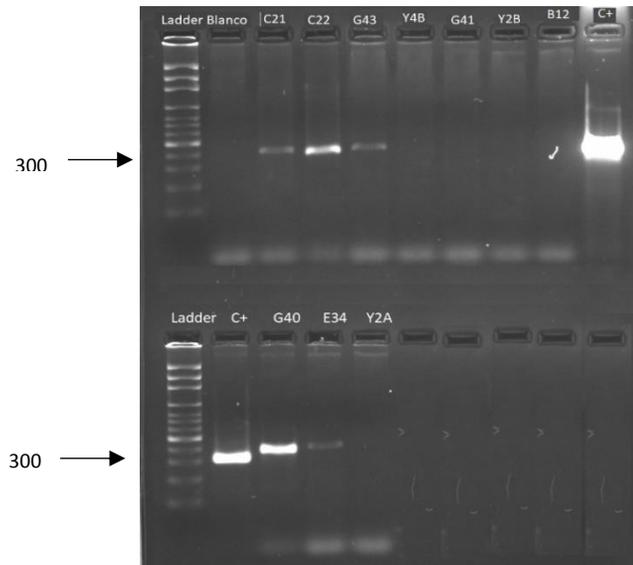


Figura 5. Gel de agarosa con productos de PCR del gen *ctxA* de *V. cholerae* toxigénico en estaciones de XIX-04.

3.1.5 *Vibrio vulnificus*

Esta especie no fue posible detectarla por PCR punto final, con el par de primers vvh F-785 y vvh R-1303, en las muestras positivas para *Vibrio spp.* del crucero XIX-04, único en donde se registró presencia de vibrios (figura 13).

3.2 Detección mediante qPCR con SYBR green I

3.2.1 *Vibrio spp.*

De las 43 estaciones muestreadas en XIX-04, la detección de *Vibrio spp.* asociado al zooplancton *Vibrio spp.* se registró en 25 de ellas, como se muestra en la figura 6a. Como se observa en la figura 6b, la temperatura de fusión (t_m) tuvo un valor aproximado de 80° C, demostrando la ausencia de dímeros.

Las muestras de sedimento para la detección y cuantificación por qPCR de *Vibrio spp.* en XIX-04 y 05, fueron estudiadas por el grupo de investigación del proyecto “Distribución de bacterias hidrocarbonoclasticas en sedimentos y aguas profundas del Golfo de México”, donde detectaron la presencia de *Vibrio spp.* en todas las estaciones analizadas de XIX-04 y 05 (10 estaciones y 9 estaciones

respectivamente). Sus resultados fueron utilizados para estimar la abundancia relativa de las especies estudiadas en el presente trabajo.

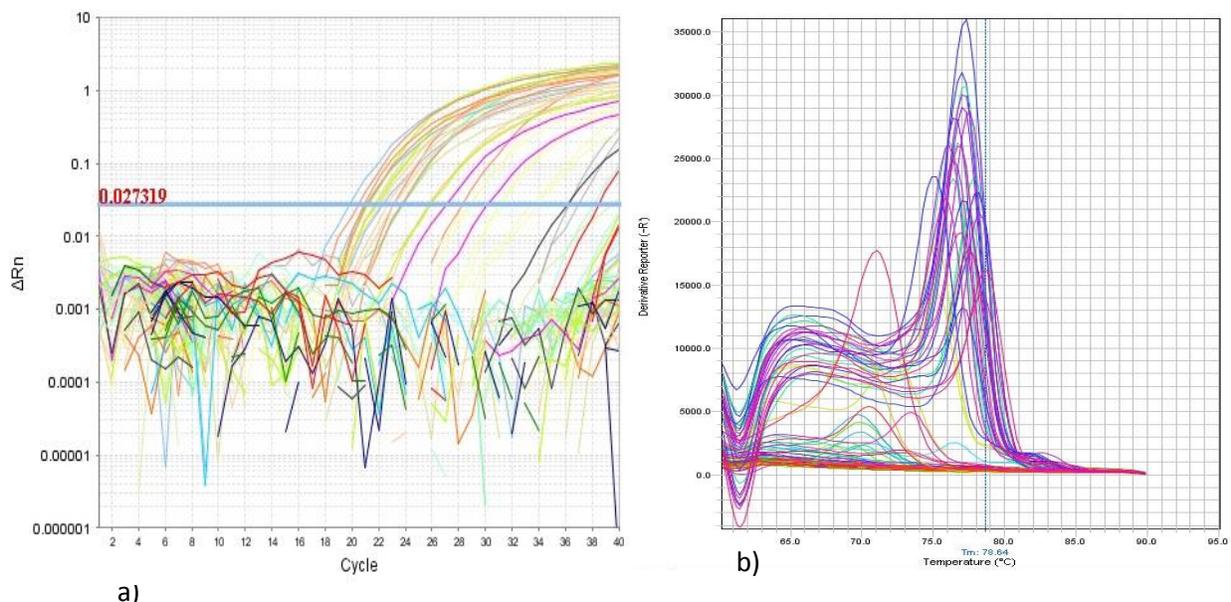


Figura 6. Amplificación de 16S rDNA *Vibrio* spp. a) Curva de amplificación con SYBR green I. De 25 muestras b) Curva de disociación.

3.2.2 *Vibrio alginolyticus*

Para las 25 estaciones de XIX-04 en donde se detectó a *Vibrio* spp., la detección de *V. alginolyticus* asociado al zooplancton fue positiva en 21 de ellas, mientras que para muestras de sedimento fue detectada en 7 de las 10 estaciones analizadas. Por otra parte, en sedimentos de XIX-05, *V. alginolyticus* fue registrado en todas las 9 estaciones analizadas (Fig. 7).

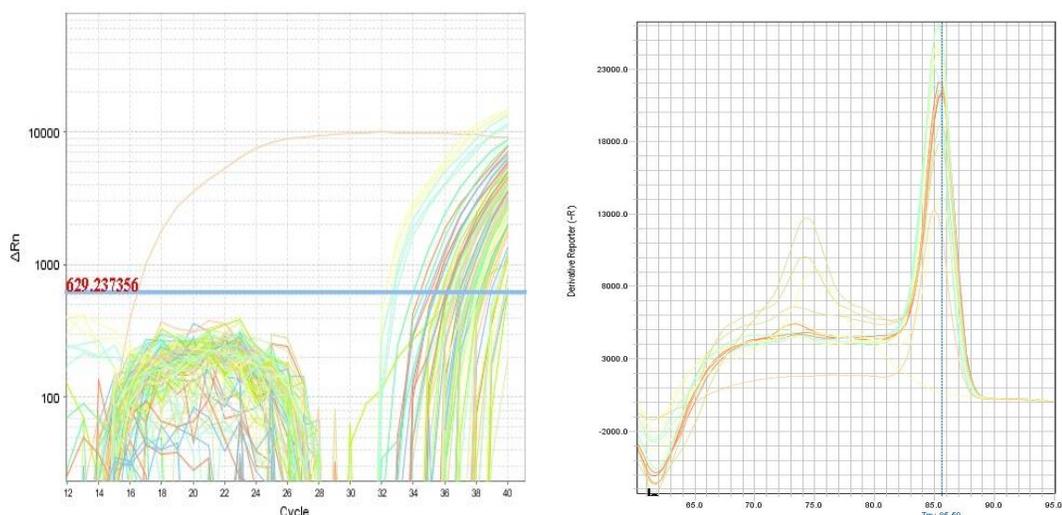


Figura 7. Amplificación con *groEL* *V. alginolyticus*. a) Curva de amplificación con SYBR green I. b) Curva de disociación.

3.2.3 Factor de patogenicidad *ctxA* de *Vibrio cholerae*

Tras analizar las 10 muestras de DNA positivas para *V. cholerae* por PCR punto final, provenientes de XIX-04 se encontró la presencia de *V. cholerae ctxA*⁺ (Fig. 8) en 5 estaciones, confirmando la presencia de *V. cholerae* toxigénico (*ctxA*⁺) asociado a muestras de zooplancton colectadas en el GM. La curva de disociación que se muestra en el apartado (Figura 8b), muestra la ausencia de dímeros en la reacción de PCR ya que la *T_m* se mantuvo dentro del rango de 80°C.

3.3 Detección de vibrios patógenos por q-PCR con sondas Taqman

3.3.1 *Vibrio cholerae*

Utilizando el par de primers F-hlyA y R-hlyA y el DNA de la cepa control, no fue posible determinar la presencia de *V. cholerae* en ninguna de las estaciones debido a la formación de dímeros que se originaban por la reacción. A pesar de que se intentó optimizar las condiciones de PCR (Fig. 9), no fue posible eliminar la aparición de estos dímeros, por lo que se descartó este método para determinar la presencia de *V. cholerae*.

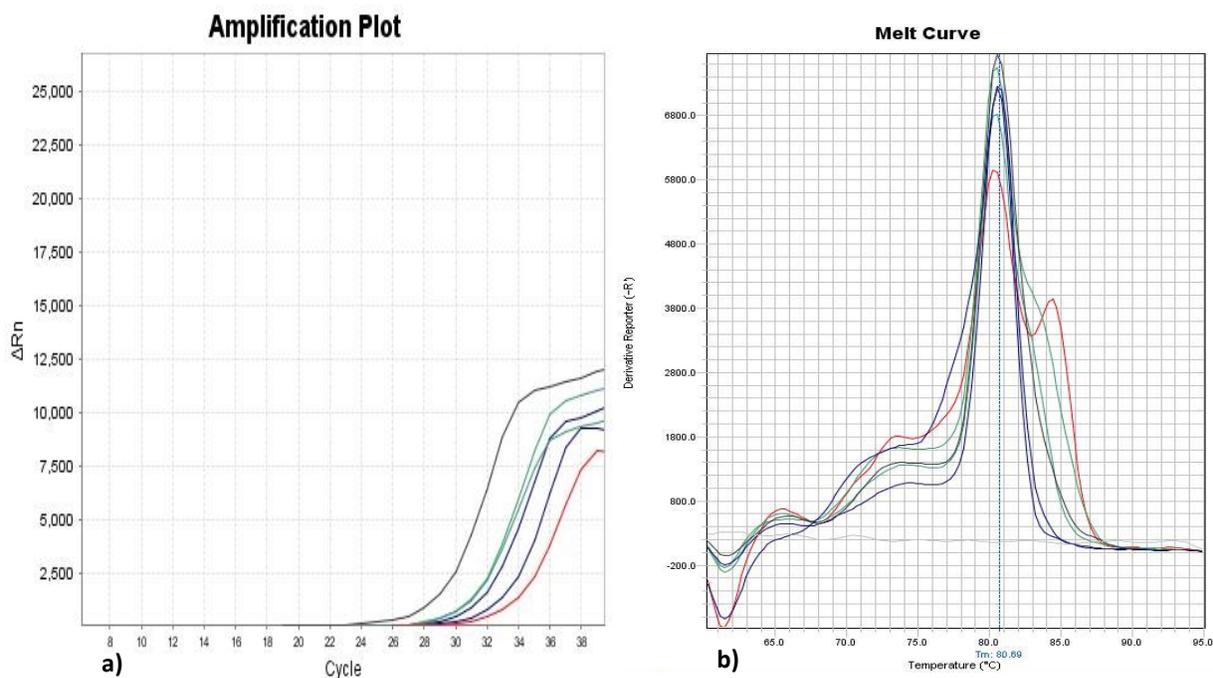


Figura 8. Amplificación *ctxA* para *V. cholerae ctxA*⁺. a) Curva de amplificación con SYBR green. b) Curva de disociación.

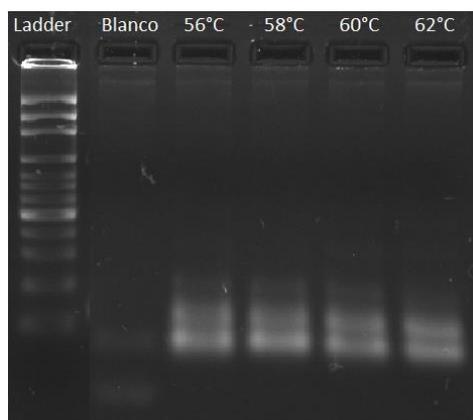


Figura 9. Gradiente de Tm para primer F-hlyA y R-hlyA.

3.3.2 Factor de patogenicidad *ctxA* de *Vibrio cholerae*

No fue posible determinar la presencia de *V. cholerae ctxA*⁺ mediante qPCR con sondas Taqman ya que con el DNA control a una concentración de 150ng/μl de templado, se obtuvo un valor de Ct de 25 ciclos (Fig. 10) por lo que se determinó que las muestras ambientales utilizadas para el presente estudio, al tener una menor concentración del microorganismo que la cepa pura, no se podrían analizar mediante este método, por lo que se optó por utilizar los primers VCT1 y VCT2 con SYBRgreen I (Fig. 8).

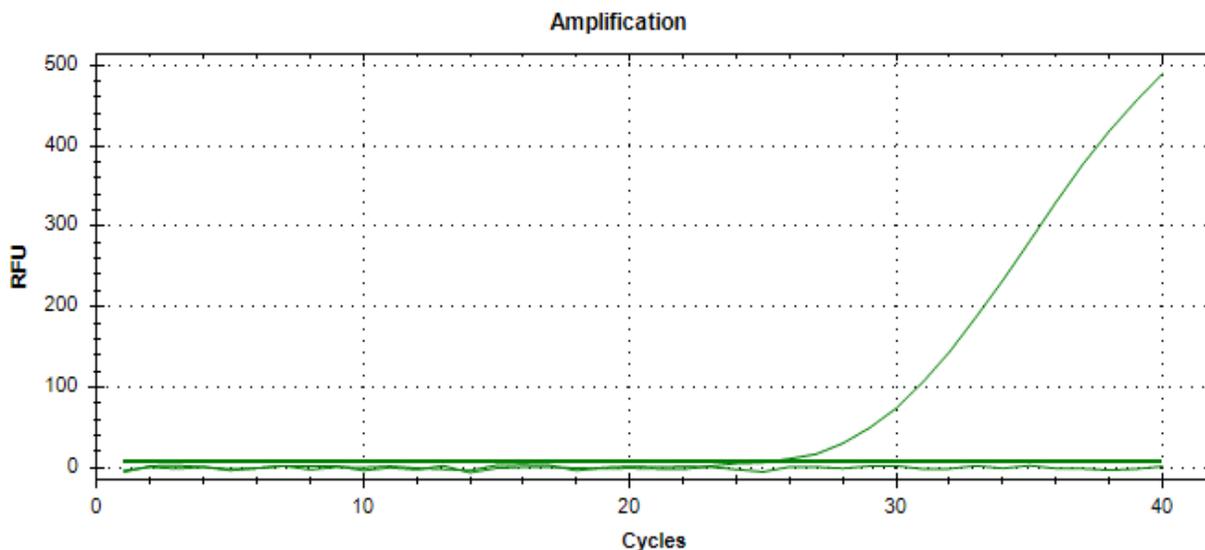


Figura 10. Amplificación del fragmento *ctxA* de *V. cholerae ctxA*⁺.

3.3.3 *Vibrio parahaemolyticus*

En la figura 11 se observa que los valores de Ct para los controles positivos (DNA de cepas puras) muestran una baja cantidad de número de copias de *V. parahaemolyticus*, por lo que los valores determinados con DNA de muestras ambientales pueden presentar un mayor rango de error. Este resultado es consecuencia de un amplicón con un tamaño de 450 bp ya que el peso óptimo de un amplicón para qPCR abarca un rango de 120-250 bp.

En muestras de zooplancton de XIX-04 se detectaron valores de Ct ≥ 35 ciclos en 6 estaciones, lo que podría indicar la presencia de *V. parahaemolyticus* asociado a zooplancton en el GM.

En las muestras de sedimento tanto para XIX-04 como para XIX-05 la presencia de este microorganismo no fue detectada (Fig. 11).

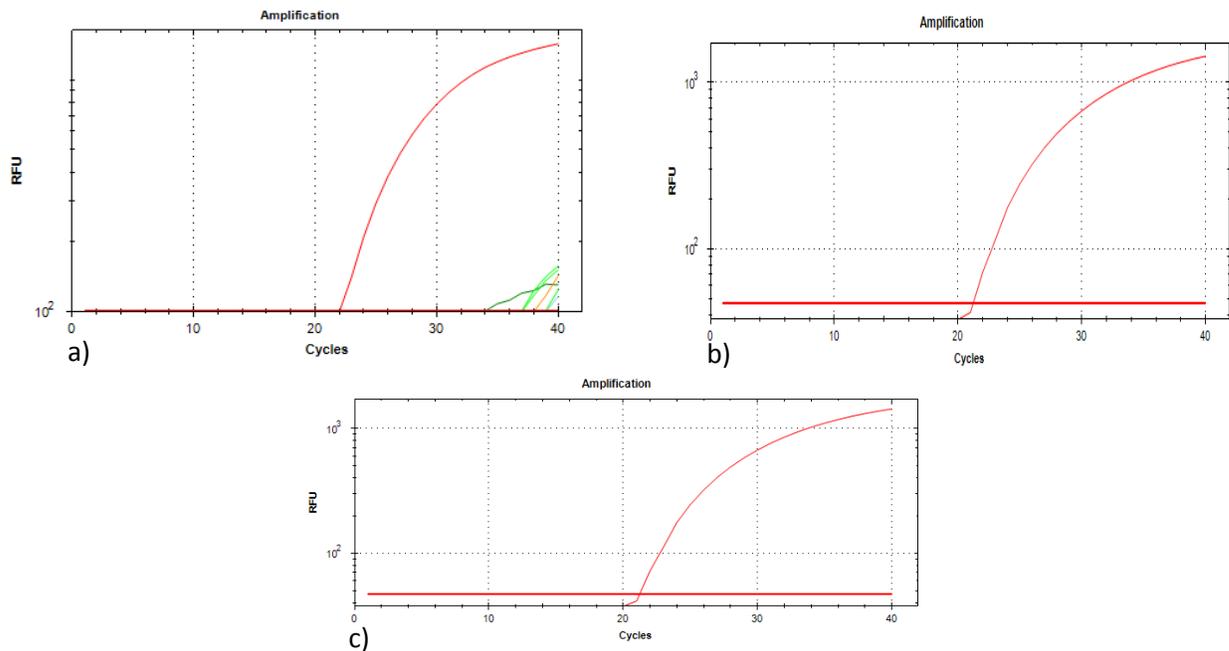


Figura 11. Amplificación *t/h* en estaciones de XIX-04 y 05. a) amplificación de *t/h* en muestras de zooplancton XIX-04. b) amplificación de *t/h* en muestras de sedimento XIX-04. c) Se muestra la amplificación de *t/h* en muestras de sedimento XIX-05.

3.3.4 Factor de patogenicidad *tdh* de *Vibrio parahaemolyticus*

Para XIX-04 la presencia de *V. parahaemolyticus tdh*⁺ fue detectada en las 25 estaciones donde se detectó *Vibrio* spp por PCR punto final en muestras de zooplancton, mientras que en sedimento sólo fue positiva su presencia en 6 estaciones de las 10 estaciones positivas para *Vibrio* spp. En tanto en muestras de sedimento de XIX-05 esta especie estuvo presente en 2 estaciones de las 9 donde se detectó *Vibrio* spp. por qPCR. (Fig. 12).

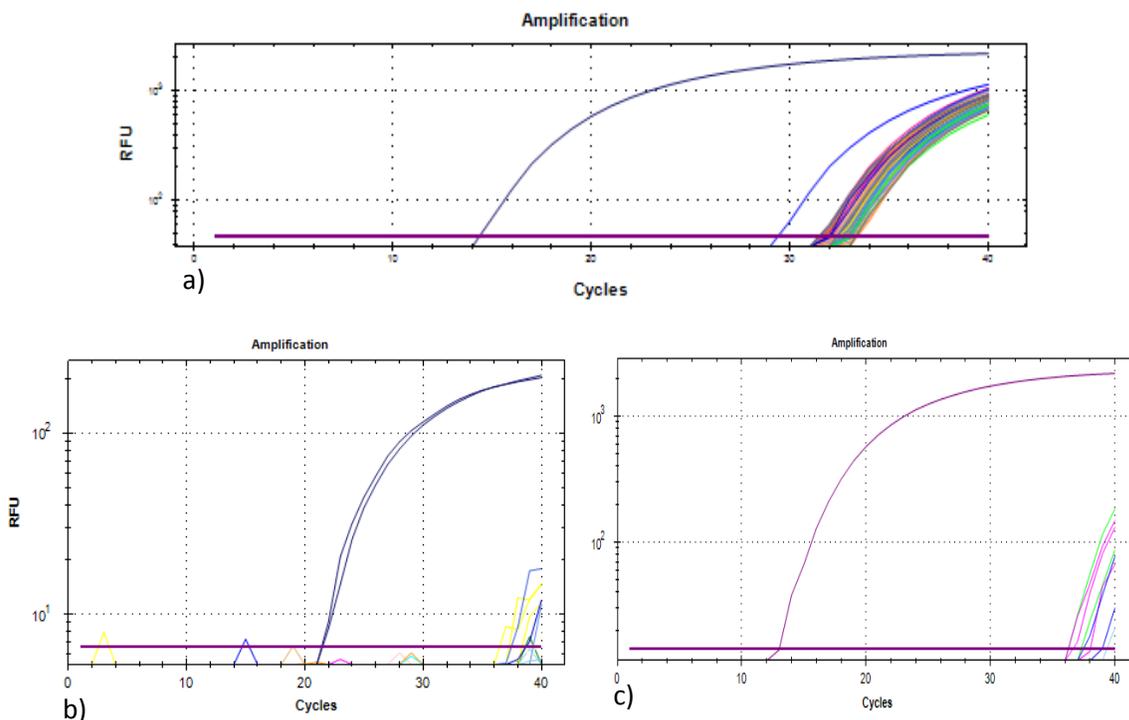


Figura 12. Amplificación *tdh* en estaciones de XIX-04 y 05. a) amplificación de *tdh* en muestras de zooplancton XIX-04. b) amplificación de *tdh* en muestras de sedimento XIX-04. c) amplificación de *tdh* en muestras de sedimento XIX-05.

3.3.5 *Vibrio vulnificus*

No fue posible detectar organismos pertenecientes a este género debido a la imposibilidad de obtener buenos resultados con la amplificación con el par de primers vvh F-785 y vvh R-1303 pese a los intentos por optimizar las condiciones de PCR (Fig. 13).

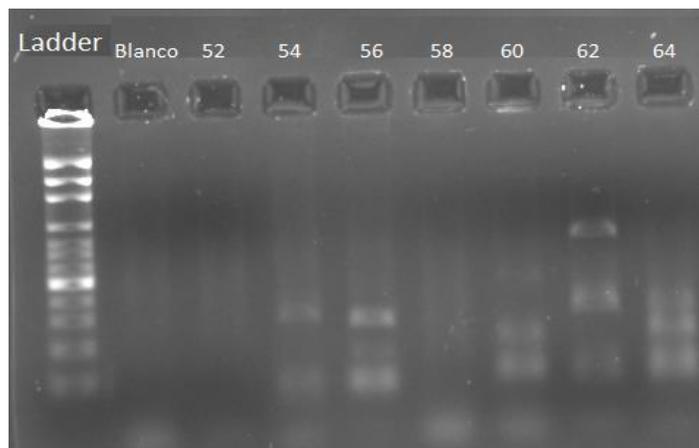


Figura 13 Optimización de vvh para *Vibrio vulnificus*.

3.4 Cuantificación

3.4.1 Determinación de cepas puras

Mediante PCR punto final se ratificó que la identidad de las cepas del cepario del CICESE, empleadas como referencia para la elaboración de la curva estándar correspondiente a cada especie. (Fig. 14).

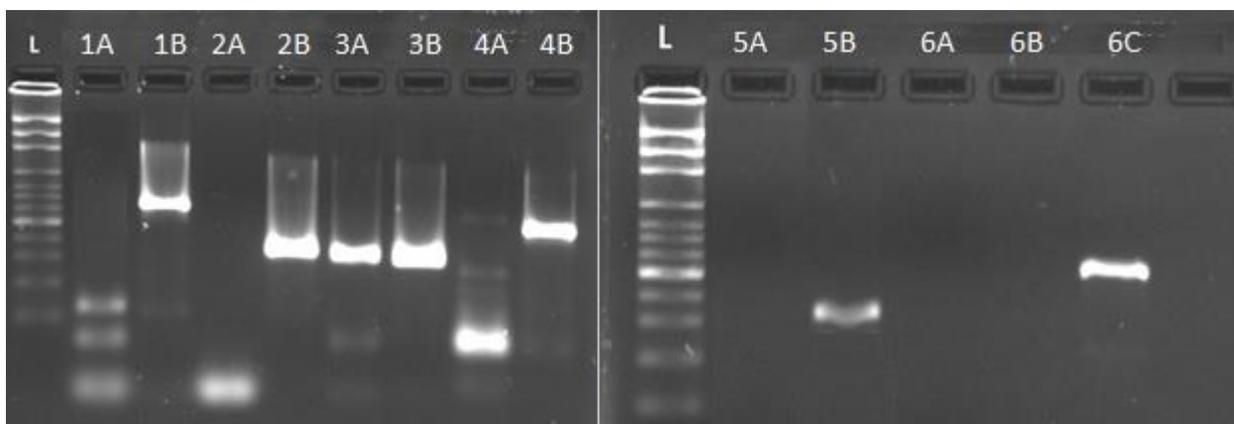


Figura 14. Cepas puras de distintas especies de vibrio. 1A=blanco *V. cholerae*, 1B= *V.cholerae* , 2A= blanco *V. cholerae* ctx⁺, 2B= *V. cholerae* ctx⁺, 3A= Blanco *V. parahemolyticus* TDH⁺, 3B= *V. parahemolyticus* TDH⁺,4A= Blanco *V. parahemolyticus*, 4B= *V. parahemolyticus*, 5A= Blanco *V. vulnificus*, 5B= *V. vulnificus*, 6A= Blanco *V. alginolyticus*, 6B= *V. alginolyticus* y 6C= *V. parahemolyticus* con el primer para la región R75H.

3.4.2 Determinación de la ecuación de la recta

3.4.2.1 *Vibrio spp*

Con diluciones 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} y 1×10^0 se realizó la curva de calibración para *Vibrio spp*. los valores se presentan con logaritmo base 10 (Fig. 15).

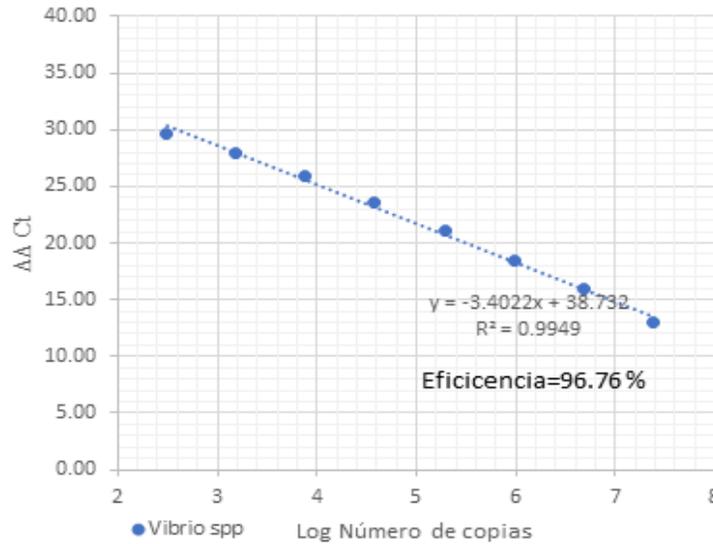


Figura 15. Curva estándar de *Vibrio spp* con SYBR green I. Se obtuvo una pendiente (m) de -3.40 de acuerdo con la ecuación de la recta ($y = -3.4022x + 38.73$), el coeficiente de determinación (R^2) tuvo un valor de 0.99, con base en la pendiente se estimó una eficiencia de la reacción del 96.76%.

3.4.2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Con diluciones 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} y 1×10^0 se realizó la curva de calibración para *V. parahaemolyticus*. los valores se normalizaron con logaritmo base 10 (Fig. 16).

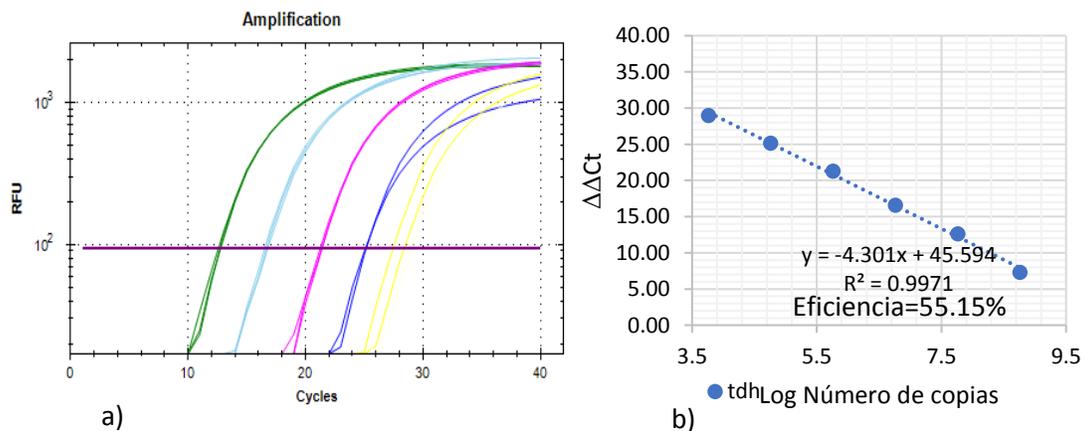


Figura 16. Curva estándar de *V. parahaemolyticus*. a) Amplificación de *V. parahaemolyticus* con factores de dilución 1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} . b) Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados. Se obtuvo una pendiente (m) de -4.301 de acuerdo con la ecuación de la recta ($y = -4.301x + 45.59$), el coeficiente de determinación (R^2) tuvo un valor de 0.99, con base en la pendiente se estimó una eficiencia de la reacción del 55.15%.

3.4.2.3 *Vibrio parahaemolyticus* *tdh*⁺

Con diluciones 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} y 1×10^0 se realizó la curva de calibración para *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺, los valores se normalizaron con logaritmo base 10 (Fig. 17).

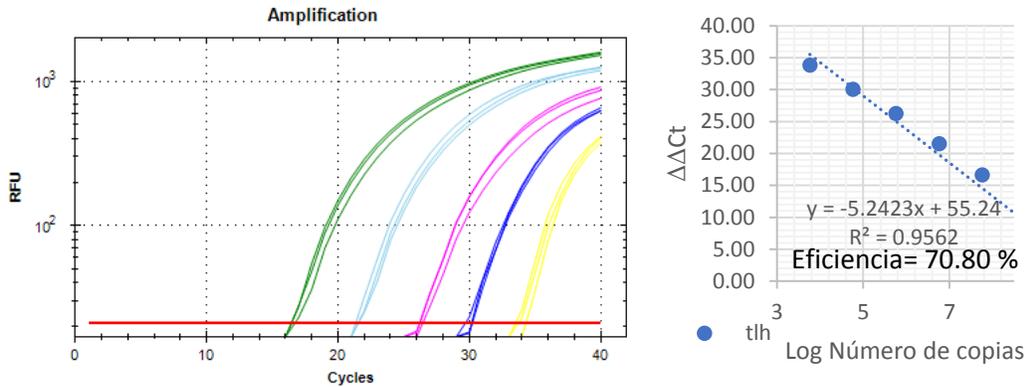


Figura 17. Curva estándar de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺. a) Amplificación de *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺ con factores de dilución 1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} . b) Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados. Se obtuvo una pendiente (m) de -4.288 de acuerdo con la ecuación de la recta ($y = -4.288X + 50.37$), el coeficiente de determinación (R^2) tuvo un valor de 0.99, con base en la pendiente se estimó una eficiencia de la reacción del 70.80%.

3.4.2.4 *Vibrio alginolyticus*

Con diluciones 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} y 1×10^0 se realizó la curva de calibración para *V. alginolyticus*, los valores se normalizaron con logaritmo base 10 (Fig. 18).

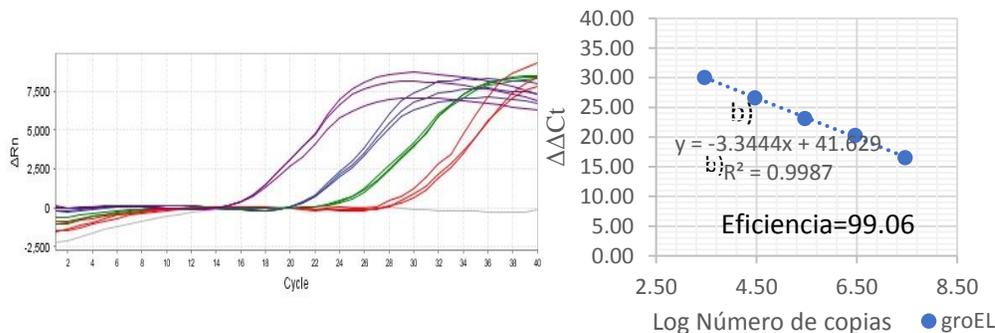


Figura 18. Curva estándar de *V. alginolyticus*. a) Amplificación de *V. alginolyticus* con factores de dilución 1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} . b) Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados. Se obtuvo una pendiente (m) de -3.34 de acuerdo con la ecuación de la recta ($y = -3.3444X + 41.62$), el coeficiente de determinación (R^2) tuvo un valor de 0.99, con base en la pendiente se estimó una eficiencia de la reacción del 99.06%.

3.4.2.5 *Vibrio cholerae* *ctxA*⁺

Se realizó una curva de calibración con diluciones 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} y 1×10^0 de DNA de una cepa pura de *V. cholerae* *ctxA*⁺ y se calculó la ecuación de la recta con el método de mínimos cuadrados (Fig. 19).

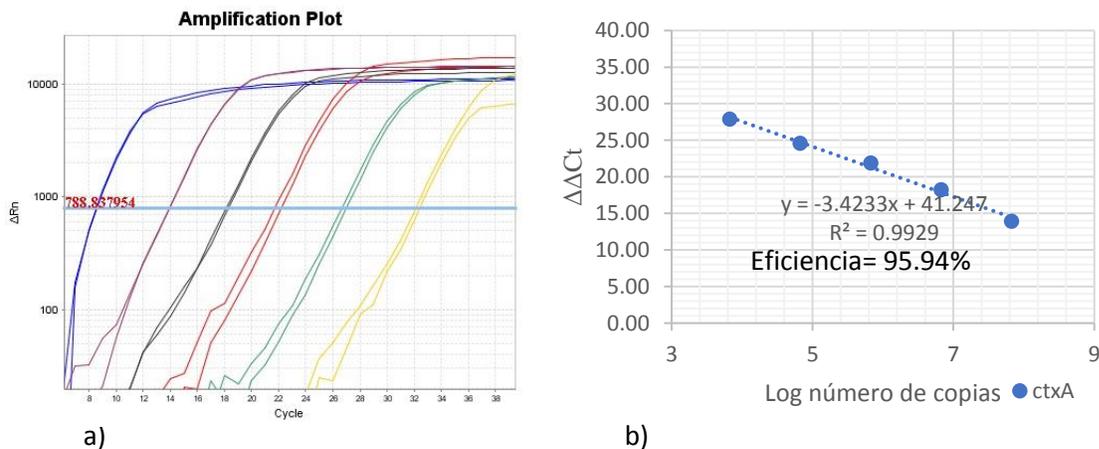


Figura 19. Curva estándar de *V. cholerae* *ctxA*⁺. a) Amplificación de *V. cholerae* *ctxA*⁺ con factores de dilución 1×10^0 , 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} . b) Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados. Se obtuvo una pendiente (m) de -3.4233 de acuerdo con la ecuación de la recta ($y = -3.4233x + 41.24$), el coeficiente de determinación (R^2) tuvo un valor de 0.99, con base en la pendiente se estimó una eficiencia de la reacción del 95.94%.

3.4.3 Número de copias de vibrios en el Golfo de México

3.4.3 Zooplancton XIXIMI-04

Utilizando la ecuación de la recta y la fórmula para calcular el número de copias, se estimó el número de bacterias por 1 gramo (peso húmedo) de zooplancton, correspondiente a cada especie.

Tabla 6. Concentración de vibrios por 1 gramo de muestra de Zoplancton colectadas en XIX-04.

Estación	<i>Vibrio</i> Spp.	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh</i> ⁺	<i>V. cholerae</i> <i>ctxA</i> ⁺
A2	83583	0	0	7178	0
A3	0	0	0	0	0
A4	0	0	0	0	0
A5	0	0	0	0	0
A7	0	0	0	0	0
A10	0	0	0	0	0
B11	29904	16895	1395	1625	0
B12	5298	1274	0	3357	0
B15	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0
B17	0	0	0	0	0
B18	0	0	0	0	0
B19	0	0	0	0	0
C20	0	0	0	0	0
C21	14903	4126	0	258	2887
C22	506515	3300	0	12079	2564
C23	14059	1013	395	135	0
C24	0	0	0	0	0
C25	0	0	0	0	0
D26	0	0	0	0	0
D28	0	0	0	0	0
D29	42498	2429	3110	3420	0
D30	42260	0	0	491	0
E31	24597	6463	0	5947	0
E32	172010	90852	0	8609	0
E33	0	0	0	0	0

E34	97411	17467	0	6244	1794
F36	64314	557	0	305	0
F37	14327	4174	0	2066	0
F38	323072	158181	0	3418	0
F39	20436	0	0	1942	0
G40	43122	7041	0	437	17249
G41	71375	23302	0	5858	0
G42	5245	596	0	662	0
G43	40855	3204	4344	3666	17774
G44	567	283	147	75	0
H46	0	0	0	0	0
H47	39298	26460	1493	1329	0
H48	0	0	0	0	0
Y1A	47286	0	0	8038	0
Y2A	57335	9240	0	7401	0
Y2B	342581	76100	0	24741	0
Y4B	33287	5446	0	7732	0

*unidades: Número de copias por 5 gramos de zooplancton.

3.4.3.2 Sedimento XIXIMI-04

Tabla 7. Concentración de vibrios por por gramo (peso húmedo) de sedimento en muestras de XIX-04.

Estación	<i>Vibrio spp</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.paraahaemolyticus tdh+</i>	<i>V.paraahaemolyticus</i>
A7	539617	8467	0.00	0
B14	214168	2704	2384	0
B18	134232	1123	5137	0
C22	239609	1351	4160	0
E31	674820	890	12806	0
E34	122829	1451	6796	0
G40	556875	8474	0.00	0
G44	308837	0.00	0.00	0
H45	636014	17479	0.00	0
H47	2537831	2903	8970	0

*unidades: Número de copias por gramo de sedimento.

3.4.3 3 Sedimento XIX-05

Tabla 8. Concentración de vibrios por gramo (peso húmedo) de sedimento en XIX-05 .

Estación	<i>Vibrio spp</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.paraahaemolyticus tdh+</i>	<i>V.paraahaemolyticus</i>
A1	917782	139	759	0.00
A5	423230	346	849	0.00
A8	625460	69	0.00	0.00
B11	571682	68	0.00	0.00
B15	215824	198	0.00	0.00
B18	367474	3286	0.00	0.00
C22	110208	132	0.00	0.00
D28	607403	283	0.00	0.00
G44	26951833	277	0.00	0.00

*unidades: Número de copias por

3.4.4 Abundancia relativa de vibrios en Golfo de México

Se determinó la abundancia relativa de los organismos de interés por cada estación. En la figura 20 se observa que para todas las estaciones estudiadas (XIX-04 y -05) la comunidad dominante estuvo constituida por especies de vibrios que no fueron contemplados para el estudio, por lo que se clasificaron dentro del taxón *Vibrio* spp.

Dentro de las especies estudiadas, para las muestras de zooplancton hubo una mayor abundancia de *V. alginolyticus* en la mayoría de las estaciones. La estación G23 fue la que presentó una mayor diversidad, pues se encuentran presentes todas las especies analizadas.

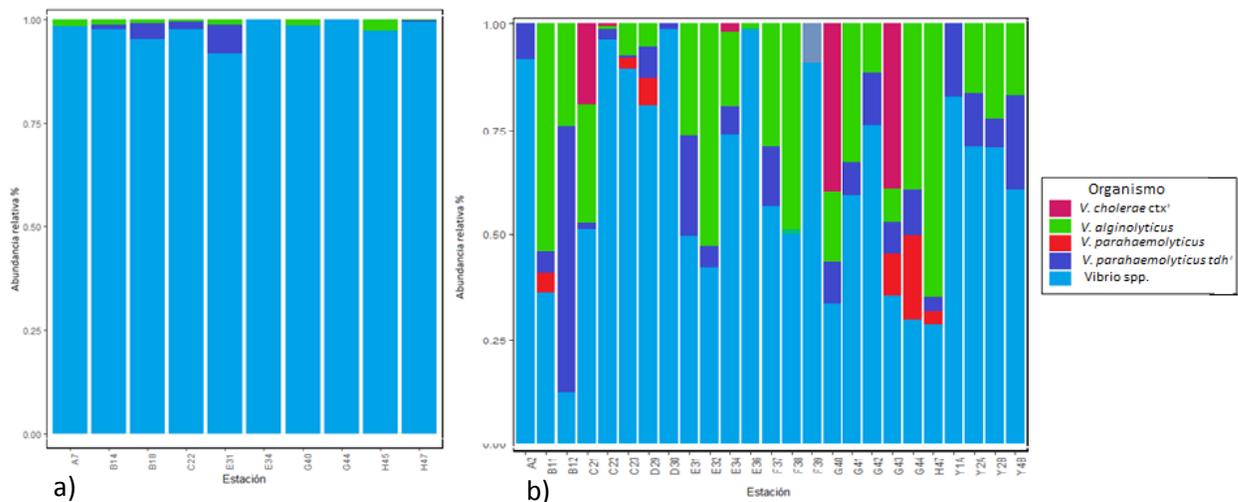


Figura 20. Abundancia relativa de vibrios en XIX-04. a) vibrio asociado a sedimento. b) vibrio asociado a zooplancton

En sedimentos, tanto para XIX-04 (Fig. 20) como para XIX-05 (Fig. 21) el grupo taxonómico más abundante fue *Vibrio* spp. Cabe destacar que en XIX-04 hubo una abundancia relativa ligeramente mayor de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* tdh⁺ en comparación con XIX-05 (Fig.20 y Fig. 21).

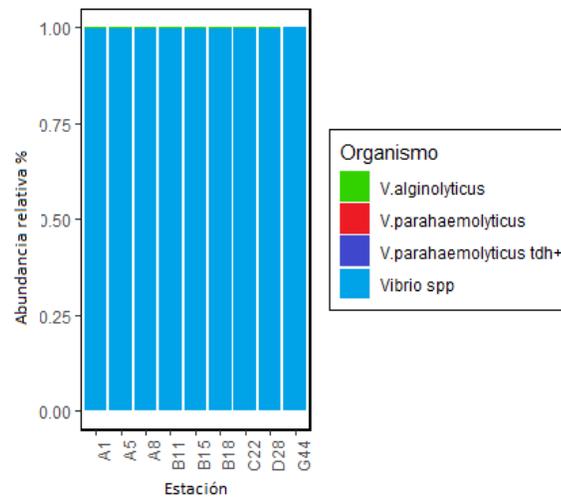


Figura 21. Abundancia relativa de vibrios en sedimento de XIXIMI-05.

3.4.5 Distribución de vibrios en el Golfo de México

3.4.5.1 Zooplancton XIXIMI-04

Una vez determinada la presencia de los distintos organismos de interés y estimado la abundancia relativa, se graficó la distribución de los vibrios a lo largo del GM. En la figura 22 se muestra la distribución *Vibrio* spp., *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus tdh⁺* y *V. alginolyticus* donde se aprecia que la distribución se encuentra focalizada en 2 zonas. La primera zona abarca los meridianos 96°-92° W (oeste) mientras que la segunda zona se encuentra en el canal de Yucatán, en el meridiano 86°W, entre los paralelos 20°-22°N (norte).

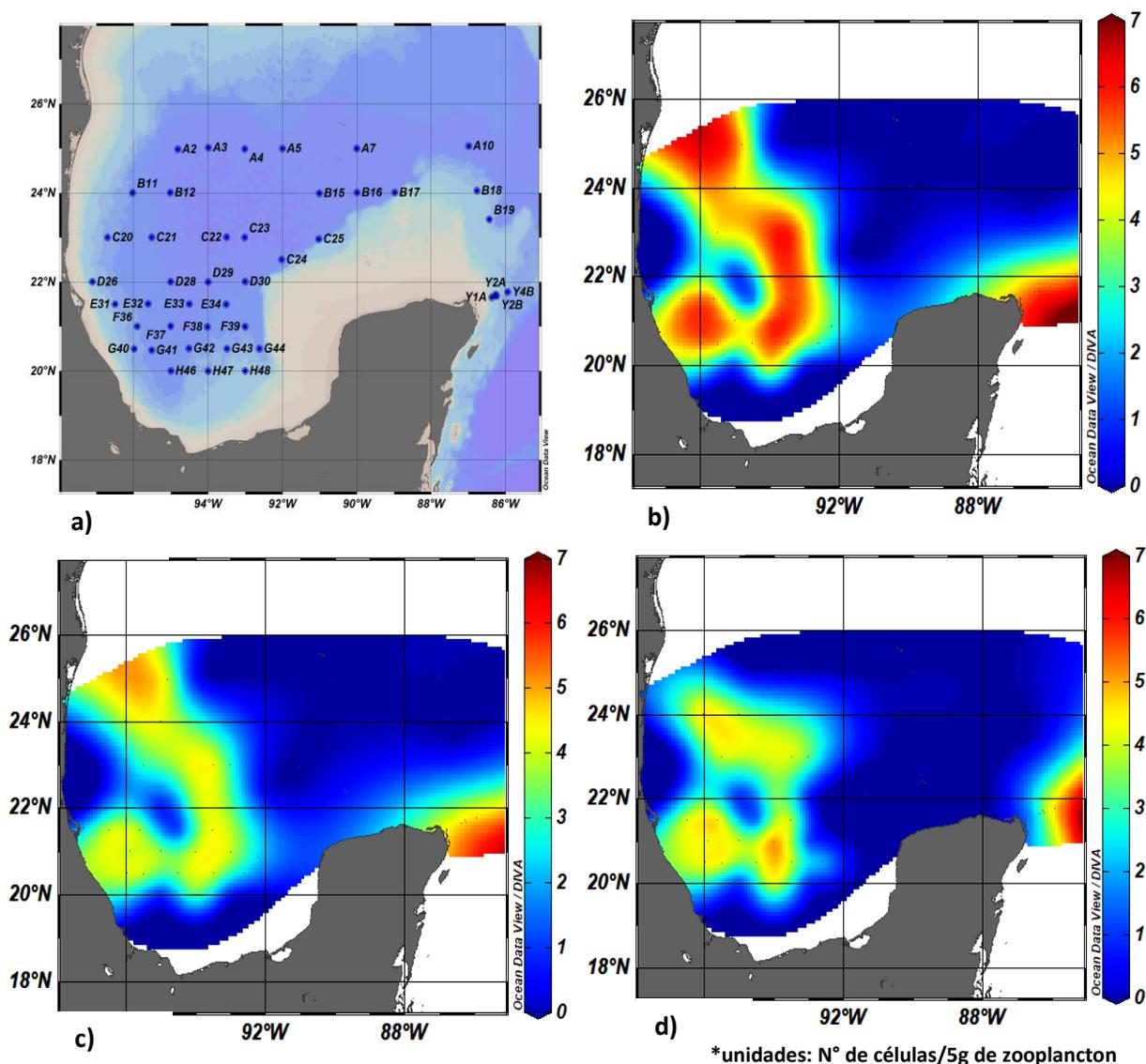


Figura 22. Distribución de vibrios en muestras de zooplancton en XIX-04 a) Estaciones. b) *Vibrio* spp. c) *V. parahaemolyticus* d) *V. alginolyticus*.

3.4.5.2 Sedimento XIXIMI-04 y XIXIMI-05

El diseño experimental para la colecta de muestras de sedimento no contempla un estudio longitudinal, por lo que las muestras colectadas durante los distintos cruceros (XIX-04, XIX-05 y futuros cruceros) se interpretan como un sólo evento, es decir, que para el presente trabajo la distribución y abundancia de las distintas especies de vibrios en XIX-04 y XIX-05 se interpretaron en el mismo gráfico.

En sedimento, se observa la presencia de *Vibrio* spp. en todas las estaciones analizadas (Fig. 23), sin embargo, se concentra una mayor abundancia de estos microorganismos en los meridianos 96°-92°W,

pasando por el paralelo 20°N. De las especies estudiadas, se observó que la más abundante, es *V. parahaemolyticus* toxigénico y su presencia se encuentra agrupada entre los meridianos 96°-92°W y los paralelos 24°-26°N. Por otra parte, se observó que *V. alginolyticus* (Fig. 23d) tiene una menor población respecto a *V. parahaemolyticus* toxigénico, *V. alginolyticus* se encuentra mayormente agrupada en la intersección entre el meridiano 96°W y el paralelo 20°N.

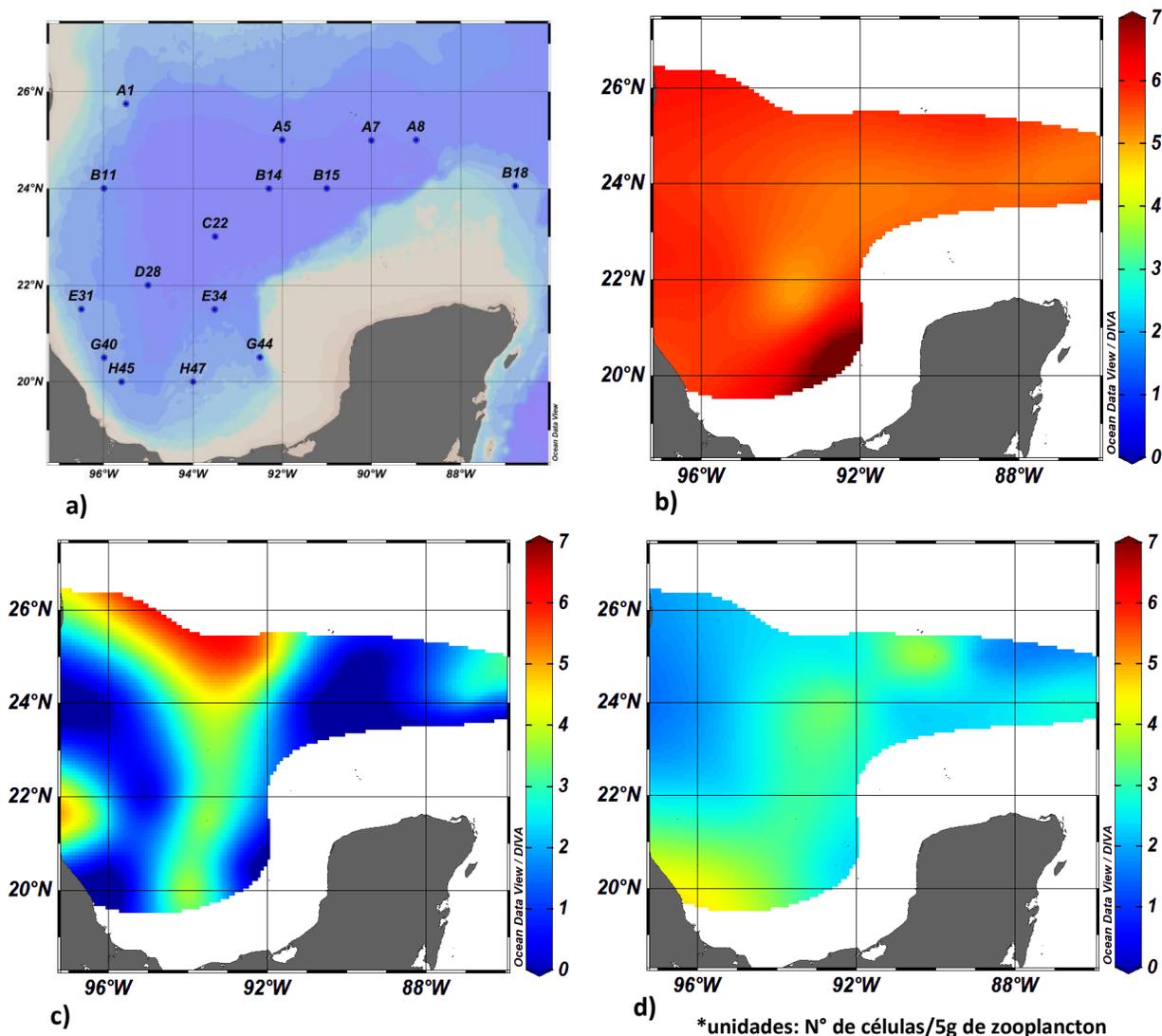


Figura 23. Distribución de vibrios en muestras de sedimento de XIX-04 y XIX-05 a) Estaciones b) *Vibrio* spp. c) *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺. d) *V. alginolyticus*.

3.4.5.3 *Vibrio cholerae* en zooplancton de XIXIMI-04

Debido al interés epidemiológico de la detección tanto de *V. cholerae* como de *V. cholerae* toxigénico (*cxtA*⁺), se elaboró la figura 24 a y b, en las que se destaca su presencia (Fig. 25a) y su abundancia relativa (Fig. 24b).

En la figura 24a se observa que la presencia de *V. cholerae* se encuentra focalizada en 2 zonas, la primera concentrándose al oeste del GM, entre los meridianos 96°-94° W, mientras que la segunda localizada en el canal de Yucatán en el meridiano 86° W, al exterior del GM. Adicionalmente, en esta figura se indica con círculos, las estaciones donde se detectó la presencia de la toxina *ctxA*.

En la figura 24b se muestra que la abundancia relativa de *V. cholerae ctxA*⁺ se agrupa en 3 conjuntos, mostrando una mayor densidad poblacional en las estaciones G40 y G43, cercanas a las descargas del Río Tuxpan, entre los meridianos 95 y 96° W.

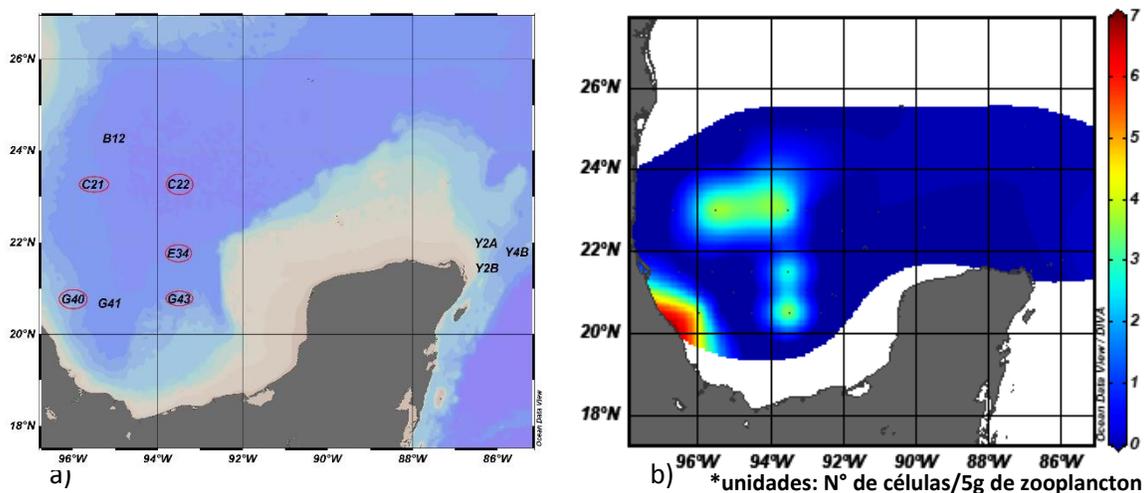


Figura.24. Estaciones donde se registró. En a) se muestra la presencia de *V. cholerae*, las estaciones donde se encontró *V. cholerae ctxA*⁺ se muestran marcadas con un círculo rojo. En b) se muestra la abundancia relativa de *V. cholerae ctxA*⁺ en muestras de zooplancton de XIX-04.

Capítulo 4. Discusión

En el presente trabajo se utilizaron tres variantes de la amplificación (PCR punto final, qPCR con SYBRgreen I y qPCR con sondas) con diferentes niveles de sensibilidad para poder detectar y cuantificar a distintos microorganismos de interés asociados tanto a zooplancton como a sedimento en el GM.

4.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Patcharapon y colaboradores (2017) estudiaron la relación simbiótica entre *Burkholderiales* y *Daphnia magna*, concluyeron que esta relación le permite al crustáceo *D. magna* tener una mayor resistencia a nonifenoles y pentaclorofenoles, sin embargo, el estudio se realizó con bacterias inmovilizadas sobre la superficie del crustáceo. El presente trabajo es el primer estudio que analiza muestras de zooplancton del GM para determinar si el zooplancton representa un nicho potencial para BDH.

A pesar de que existe una gran diversidad de BDH, en el presente estudio se analizó la presencia de los taxones *Marinobacter* spp. *Cycloclasticus* spp. y *Alcanivorax* spp debido a que en diversas publicaciones se ha concluido que estos grupos son los más comunes y abundantes en el GM durante un derrame de hidrocarburos.

Mediante las pruebas realizadas para detectar la presencia de BDH (*Marinobacter* spp. *Cycloclasticus* spp. y *Alcanivorax* spp.) asociadas al zooplancton en el GM se registró la ausencia de estos organismos tanto en las estaciones de XIX-04 como las de XIX-05. Debe resaltarse que, a pesar de que la técnica de PCR es una valiosa herramienta para la detección de microorganismos específicos, esta también presenta límites de detección, por lo que no debe descartarse la posibilidad de que las BDH se encuentren presentes en concentraciones tan bajas que no puedan ser detectados por este método de análisis.

Por otra parte, la toma de muestras se realizó durante un periodo donde no se había reportado algún derrame de petróleo en la zona, por lo que la ausencia de BDH pueda ser debido a la baja concentración de hidrocarburos (Liu *et al.*, 2016), desde los 200 m hasta superficie, donde en forma oblicua se colectaron las muestras.

Yang y colaboradores (2016) estudiaron las sucesiones poblacionales en la columna de agua cerca del pozo Macondo, de BDH antes, durante y después del derrame en la plataforma DWH. Entre los resultados que

obtuvieron, fue que las BDH se presentaban bajas concentraciones aumentando durante el derrame (incluyendo BDH del género *Cycloclasticus*) y volviendo a disminuir después de él. Debido a la presencia de *Oceanospirillales* antes del accidente, Yang y colaboradores (2016), sugieren la existencia de reservorios naturales de BDH. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el zooplancton no representa un reservorio natural de BDH, al menos cuando no se presentan derrames masivos de petróleo.

Las muestras de zooplancton utilizadas para el presente trabajo fueron maceradas sin realizar una separación del tracto digestivo y el resto del organismo, por lo que el DNA que se extrajo también incluye DNA de bacterias de la microbiota intestinal, la ausencia de BDH en las muestras también sugiere que no hay bacterias degradadoras de hidrocarburos al interior del zooplancton. Almeda y colaboradores (2016) demostraron que copépodos planctónicos (*Temora turninata*, *Acartia tonsa* y *Parvocalanus crassirostris*) pueden digerir gotas de aceite probablemente por la presencia de BDH, y expelerlas en comprimidos fecales, lo que a su vez contribuye con la dispersión vertical de hidrocarburos en el medio marino.

Otra de las explicaciones por la que el zooplancton no representa un nicho potencial para *Marinobacter* spp. *Cycloclasticus* spp. y *Alcanivorax* spp., puede deberse a que las especies de bacterias pertenecientes a estos géneros no presentan la enzima quitinasa, la cual permite a las bacterias degradar la quitina que compone el exoesqueleto de los copépodos.

4.2 Presencia de vibrios

Como se menciona en la metodología, no se utilizó el mismo protocolo de extracción de DNA genómico para las muestras de zooplancton de XIX-04 que para las de XIX-05, esta diferencia en el método de purificación de las muestras pudo haber sido la razón por la que no se detectó ninguna de las cepas de interés en las muestras de las estaciones de XIX-05. El método de extracción de DNA en fase sólida, utilizado en XIX-04, proporciona una mayor purificación que la obtenida mediante métodos tradicionales como fenol-cloroformo, CTAB (Bromuro de cetil-trimetil-amonio), EtBr-CsCl, entre otros (Tan y Yiap, 2009).

Tanto la cepa toxigénica como la no toxigenica son positivas para *tlh*, pero sólo la cepa toxigénica (*V. parahaemolyticus tdh⁺*) es positiva para los primers *tdh*. En el caso particular de *V. parahaemolyticus*, la detección de la hemolisina TDH con sondas Taqman se registró en un mayor número de muestras, en comparación con la cepa no toxigénica, detectada con las sondas Taqman para *tlh*. Esta diferencia, indica

una cuantificación poco eficaz de *V. parahaemolyticus* no toxigénico mediante el uso del par de primers F-tl y R-tl y la sonda correspondiente, propuestos por Ward y Bej para amplificar el fragmento de la hemolisina termo lábil (TLH).

Con una eficiencia calculada del 55.15% en la reacción de qPCR para *V. parahaemolyticus* no toxigénico, mayor a la reportada por Ward y Bej (2006) de 41.22%, se sustenta que el resultado obtenido presenta un amplio rango de error, además la previa optimización en las condiciones de PCR apoyan la conclusión de que la baja eficiencia es consecuencia de un amplicón con una longitud mayor a la óptima para la cuantificación del número de células por qPCR. Del mismo modo, la eficiencia calculada para la reacción de PCR de *V. parahaemolyticus* toxigénico de 70.80%, mayor a la reportada por Ward y Bej (2006) de 41.92%, sugiere que la estimación del número de copias debe interpretarse con cautela.

Pese a los rangos de eficiencia estimados, los resultados de carácter cualitativo (ausencia/presencia) indican la presencia de la especie *V. parahaemolyticus* y su variante toxigénica en muestras de zooplancton colectado en el GM. Por otra parte, se puede distinguir que *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺ está presente en la mayoría de las estaciones analizadas, lo que muestra una amplia distribución de este organismo, que es el causante de la mayoría de los casos por enfermedades no coléricas (Baker-Austin *et al.*, 2018). Por otro lado, *V. alginolyticus* fue la especie más frecuentemente detectada en las diferentes estaciones, además del más abundante. Cabe señalar que, el presente trabajo es el primero en estudiar la presencia y de vibrios en muestras de zooplancton colectadas en aguas oceánicas, sin embargo, en un estudio realizado por Banerjee y colaboradores (2018), donde se estudió la abundancia relativa de vibrios (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. fluvialis* y *Vibrio* spp.) en distintas muestras de bivalvos en las costas de Columbia Británica encontraron una mayor abundancia de *V. alginolyticus* seguida por *Vibrio* spp.

Analizando la abundancia relativa de las diferentes especies de vibrios (*Vibrio* spp.) y la de las diferentes especies estudiadas, (figura 20b), se podría concluir que la presencia de vibrios no patógenos asociados al zooplancton, supera en la mayoría de las muestras, a los vibrios patógenos estudiados.

4.3 Distribución de vibrios en el GM

Al comparar los datos cuantitativos y cualitativos de cada grupo de vibrios con un mapa geográfico de las estaciones, se distingue un patrón en la dispersión y abundancia. Como se observa en la figura 25, la distribución de *Vibrio* spp. asociado a zooplancton en las estaciones de XIX-04 convergen con los patrones de circulación oceánica estacional propuestos por Zavala-Hidalgo (*et al.*, 2002) para el GM. Estos son: **A)** Corriente de rizo (CR), **B)** Giro anticiclónico occidental (GAO) y **C)** Giro ciclónico de la Bahía de Campeche (GCBC). En estos patrones de circulación oceánica estacionales se distingue una mayor abundancia de vibrios al inicio de la CL por su paso a través del canal de Yucatán, con una disminución en los giros. La distribución de la abundancia relativa en estos giros sugiere una interacción entre ellos, en donde las fuentes de vibrios pudieran ser los efluentes de los ríos localizados entre Tuxpan y Coatzacoalcos.

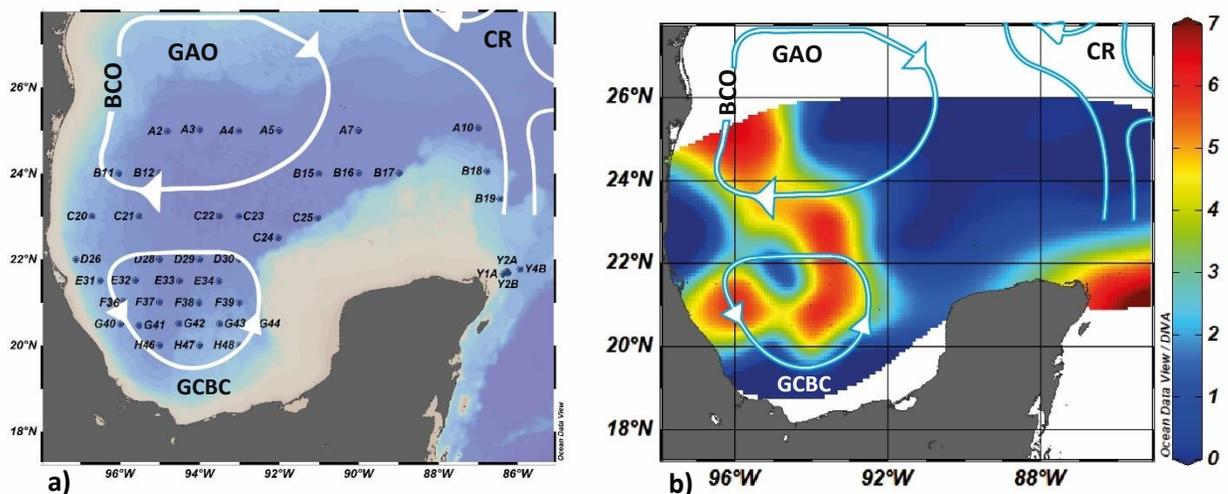


Figura 25 *Vibrio* spp. asociado a zooplancton en XIXIMI-04 y patrones de circulación oceánica. a) Estaciones de XIXIMI-04. b) Abundancia y distribución de *Vibrio* spp. asociado a zooplancton en XIXIMI-04. Se observan los patrones de circulación oceánica estacionales propuestos por Zavala-Hidalgo (*et al.*, 2002) para el GM y la relación de la población de *Vibrio* spp. Se distingue una mayor abundancia de Vibrios en la trayectoria de la CR por su paso a través del canal de Yucatán, en menor magnitud se aprecia la abundancia de estos microorganismos en la zona embebida entre BCO y GAO. Finalmente, se observa un punto de inflexión entre GCBC y BCO donde la abundancia de microorganismos en este nodo asemeja a la de BCO, pero en menor medida lo que sugiere un flujo de los organismos entre ambos giros. **GAO:** Giro Anticiclónico Occidental, **BCO:** Borde de la Corriente Occidental, **CR:** Corriente de Rizo, **GCBC:** Giro Ciclónico Bahía de Campeche. (Modificado por Anali Bravo Baás de Zavala-Hidalgo *et al.*, 2002).

La zona donde se localiza la estación G40, la cual presentó una alta abundancia de *V. cholerae* toxigénico (*ctxA*⁺) se ubica frente a las costas del estado de Veracruz, en donde históricamente, de acuerdo con Jiménez (2015) se presentó la primera epidemia de cólera en llegar a México ingresó por Tampico y Campeche en 1833. De acuerdo con los resultados del presente estudio, se encontró la presencia de *V. cholerae* *ctxA*⁺ en estaciones cercanas a los estados de Veracruz y Campeche, en donde se presenta el giro

GCBC. De acuerdo con un estudio realizado por Lizarraga-Partida y colaboradores (2009) con muestras de zooplancton tomadas en diferentes zonas portuarias, se detectó la presencia de *V. cholerae* O1 en Veracruz para el año 1999. Diversos autores han demostrado la presencia de *V. cholerae* asociada al zooplancton en aguas estuarinas o costeras (Colwell et al., 1981; Lizarraga-Partida et al., 2009; Magny et al., 2011), sin embargo, en el presente trabajo se encontraron, por primera vez, asociados a zooplancton colectado en aguas oceánicas del GM.

Es también interesante destacar la detección de *V. cholerae* no toxigénico en las estaciones Y2A, Y2B y Y4B (Fig. 25) correspondientes al canal de Yucatán. Encontrar *V. cholerae* toxigénico y no toxigénico en muestras alejadas de la costa sugieren que el zooplancton puede llegar a fungir como un vector para estos organismos como lo han sugerido algunos autores (Colwell et al., 1981; Magny et al., 2011). Es posible que la corriente proveniente del Mar Caribe pueda transportar al zooplancton o a *V. cholerae* no toxigénico detectado en el presente estudio en las estaciones localizadas en el canal de Yucatán. Los puertos de Yucatán han sido señalados igualmente como los primeros en registrar casos de cólera en 1833 (Márquez-Morfin, 1994). La presencia de *V. cholerae* no toxigénico encontrado en las estaciones “Y” contrasta con los registros del factor de patogenicidad *ctxA* registrado en muestras colectadas en los giros, lo que nos indica que estas poblaciones de *V. cholerae* pertenecen a diferentes serogrupos.

Capítulo 5. Conclusiones

Los géneros *Alcanivorax* spp., *Cycloclasticus* spp. y *Marinobacter* spp. representativos de BDH no fueron detectados por PCR punto final ni por qPCR, en muestras de zooplancton colectadas en el GM, por lo que se sugiere que el zooplancton no constituye un nicho idóneo para estos géneros.

El presente trabajo constituye la primera evidencia de que vibrios patógenos para el ser humano pueden encontrarse asociados al zooplancton en aguas oceánicas del Golfo de México y no sólo en zonas costeras, lo que representa otro posible medio de transmisión para estos organismos patógenos, además del agua de balastres y las bioincrustaciones en los cascos de los barcos.

Durante la campaña oceanográfica XIX-04, realizada del 27 de agosto al 16 de septiembre del 2015 es decir, durante la época de Nortes, hubo una mayor abundancia de *Vibrio* spp y *V. alginolyticus* y se detectó la presencia de los vibrios toxigénicos *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺ y *V. cholerae* *ctxA*⁺ asociados a muestras de zooplancton.

En muestras de sedimento colectadas durante las campañas oceanográficas XIX-04 y 05 se detectó la presencia de *Vibrio* spp. y en menor proporción la presencia de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* *tdh*⁺.

Literatura citada

- Ahmed, A. Rafiqzaman, S. M. Hossain, M. T. Lee, M. Kong, I. (2016). Species-specific detection of *Vibrio alginolyticus* in shellfish and shrimp by real-time PCR using the *groEL* gene. *Aquacult.* 24:157-70.
- Almeda, R. Connelly, T.L. Buskey, E.J. (2016). How much crude oil can zooplankton ingest? Estimating the quantity of dispersed crude oil defecated by planktonic copepods. *Environmental pollution* 208:645-654.
- Baker-Austin, C. Oliver, J.D. Alam, M. Ali, A. Waldor, M.K. Qadri, F. Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. Infections. *Nature reviews.* 4:8.
- Banerjee, S. Rutley, R. Bussey, J. (2018). Diversity and dynamics of the Canadian Coastal *Vibrio* community: An emerging trend detected in the temperate regions. *Journal of bacteriology.* 200(15).
- Barua D. (1992) History of Cholera. In: Barua D., Greenough W.B. (eds) Cholera. Current Topics in Infectious Disease. Springer, Boston, MA.
- Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C., Jones, D.D. and Kaysner, C.A. (1999) Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Method* 36: 215-225.
- Bergey DH. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Brenner D, Krieg N, Staley J, editors. 2nd ed. New York: Springer; 2005. Vol. 2, part B; pg. 494-546.
- Bickel, S., Tang, K. (2014). Carbon substrate usage by zooplankton-associated bacteria, phytoplankton-associated bacteria, and free-living bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Marine Biology*, 161(10): 2233-2242.
- Bisharat N. Agmon V. Finkelstein R. Raz R. Ben Dror G. Lerner L. Soboh S. Colodner R. Cameron DN. Wykstra DL. Swerdlow DL. Farmer JJ. (1999). Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel *Vibrio* Study Group. *Lancet* 354, 1421–1424.
- Bonin, P. Vieira, C. Grimaud, R. Milton, C. Cuny, P. Lima, O. Guasco, S. Brussaard, C. Michotey, V. (2014). Substrates specialization in lipid compounds and hydrocarbons of *Marinobacter* genus. *Environmental science pollution research.* DOI 10.1007/s11356-014-4009-y
- Ceccarelli, D. Colwell, R. R. (2014). *Vibrio* ecology, pathogenesis and evolution. *Vibrio ecology, pathogenesis and evolution: Frontiers in microbiology.* 5:5-6.
- Colwell, R.R., Seidler, R.J., Kaper, J., Joseph, S.W., Garges, S., Lockman, H. (1981). Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 555–558.
- Comisión Nacional de Hidrocarburos. (2017). Comunicado de prensa 021. Publicado el 12 de julio de 2017 y Recuperado de <https://www.gob.mx/cnh/prensa/comunicado-de-prensa-021-emitido-por-cnh?idiom=es> el 28 de julio de 2017.
- Corell, J. Rodríguez-Ezpeleta, N. (2014). Tuning of protocols and marker selection to evaluate the diversity of zooplankton using metabarcoding. *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia.* 21(2):19-39.
- DOF. Diario Oficial de la Federación. Ley de petróleos mexicanos. (2014). Recuperado el 11 de agosto de 2014 de: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5366668&fecha=31/10/2014

- De la Maza, R., Bernárdez, A. (2004). Perspectivas de la conservación en el Golfo de México. En: Caso Chávez, M., Pisanty, I., Ezcurra, E. (Eds.), Diagnóstico ambiental del golfo de México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto nacional de ecología, México D.F. pp. 637-656.
- DeLeo, D. Ruiz-Ramos, D.V. Baums, I.V. Cordes, E.E. (2016). Response of Deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies In Oceanography*, 129, 137-147.
- Dombrowski, N., Donaho, J.A., Gutierrez, T. Seitz, K.W. Teske, A., Baker, B.J. (2016). Reconstructing metabolic pathways of hydro degrading bacteria from the deepwater horizon oil spill. *Nature: microbiology*. 16057.
- Eni (2017). A new offshore well in Mexico boosts Eni's resources in the Amoca field triggering a fast track development. Recuperado de https://www.eni.com/en_IT/media/2017/07/a-new-offshore-well-in-mexico-boosts-enis-resources-in-the-amoca-field-triggering-a-fast-track-development. El 27 de agosto de 2018.
- FDA. (2004). Bacteriological analytical manual. Chapter 9, Vibrio. Recuperado el 27 abril de 2017, de: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>
- Fields, P. Popovic, T. Wachsmuth, K. Olsvik, O. (1992). Use of polymerase chain reaction of toxigenic Vibrio cholera O1 strains from the Latin America cholera epidemic. *Journal of Clinical Microbiology*. 30:2118-2121.
- Fouz, B., Roig, F. J. & Amaro, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of a new fish-virulent Vibrio vulnificus serovar that lacks potential to infect humans. *Microbiology*. 153, 1926–1934.
- Froelich B.A., Noble R.T. (2016). Vibrio bacteria in raw oysters: managing risks to human health. *Philosophical Transactions B*. 371:20150209.
- García, C. (2017). Fuera de concurso el mayor campo de ronda 2.4. Recuperado de <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Fuera-de-concurso-el-mayor-campo-de-Ronda-2.4-20170929-0142.html> el 19 de septiembre de 2018.
- Gaskil, M. (2011). Oil spill underreported in Gulf of Mexico. *Nature news*. 2011.250.
- Geiselbrecht, A.D., Hedlund, B.P., Tichi, M.A., Staley, J.T. (1998). Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading cycloclasticus Strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degrading ability with that of Puget sound *Cycloclasticus* Strains. *Applied and environmental microbiology*. 64(12): 4703-4710.
- Gomez-Gil, B. Thompson, C.C. Matsumura, Y. Sawabe, T. Iida, T. Christen, R. Thompson, F. Sawabe, T. (2014). The family Vibrionaceae. En: DeLong, E. (Eds.), *The prokaryotes: Gammaproteobacteria*. 4a Ed. Springer. pp. 659-749.
- Gutierrez, T. Biddle, J. Teske, A. Aitken, M. (2015). Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of hydrocarbon-degrading bacteria in Guaymas Basin sediments. *Frontiers in microbiology*. 6:695.
- Hara, A. Baik, S. Syutsubo, K. Misawa, N. Smiths, T.H.M. Van Beilen, J.B. Harayama, S. (2004). Cloning and functional analysis of alkB genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Environmental Microbiology*. 6(3); 191-197.
- Hedlund, B.P. Staley, J.T. (2001). *Vibrio cycloclasticus* sp. Nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 51:61-66.

- Heidelberg, J.F. Heidelberg, K.B. Colwell, R.R. (2002). Bacteria of the γ -Subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in the Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology*. 68 (11):5498-5507.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., & Wagner, M. (2001). Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3122–3126.
- Hoshino, K., et al, (1998). Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of oxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Inmunology and Medical Microbiology* 20:201-207.
- Howey, Terry Wayne (1976). *Zooplankton of the Gulf of Mexico: Distribution of Displacement Volume, Occurrence of Systematic Groups, Abundance and Diversity Among Copepods*. LSU Historical Dissertations and Teses. 2968.
- Hurley, C. Quirke, A. Reen, J. Boyd, F. (2006). Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics*. 7:104.
- Jiménez, M.R (2015). Problemática sanitaria y conflictos políticos en una ciudad del centro de Veracruz: la epidemia de cólera morbus de 1833 en Xalapa. *Secuencia*. 91:69-101.
- Johnson, C.N. Flowers, A.R. Noriega, N. F. Zimmerman, A. M. Bowers, J. C. DePaola, A. Grimes, D. J. (2010). Relationship between environmental factors and pathogenic vibrios in the Northern Gulf of Mexico. *Applied Environmental microbiology*. 76(21):7076-7084.
- Joye, S., Bracco, A., Özgökmen, T., Chanton, J., Grosell, M., MacDonald, I. et al. (2016). The Gulf of Mexico ecosystem, six years after the Macondo oil well blowout. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies In Oceanography*. 129, 4-19.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K. Fukatsu, T. (2014). Symbionte-mediated insecticide resistance. *PNAS* 109 (22):8618-8622.
- Kimes, N., Callaghan, A., Aktas, D., Smith, W., Sunner, J., & Golding, B. et al. (2013). Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Frontiers In Microbiology*, 4.
- Kostka, J.E. Prakash, O. Overholt, W.A. Green, S.J. Freyer, G. Canion, A. Delgado, J. Norton, N. Hazen, T.C. Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in the gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied environmental microbiology*. 77(22):7962-7974.
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, London.
- Lalli, C. Parsosn, T. (2006). *Biological Oceanography: An introduction*. (2nd ed.) Elsevier. Canada.
- Lara Lara, J.R., Lizárraga, J.A., Calderón, L.E., Camacho, V. F., De La Lanza-Espino, G., Giansone, E. A., Espejel, M. I., Guzmán, M., Ladah, L. B., López, M., Meling, A.E., Moreno, P., Reyes, H., Ríos, E., Zertuche, J. A. 2008. Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales. En: Soberón, J., Halffter, G., Llorente-Bousquets (Eds.), *Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México D.F. pp. 109-134.
- Lee, H. J. Kim, J. A. Lee, M. A. Park, S. J. Lee, K. H. (2013). Regulation of haemolysin (VvhA) production by ferric uptake regulation (Fur) in *Vibrio vulnificus*: repression of vvhA transcription by Fur and proteolysis of VvhA by Fur repressive exoproteases. *Molecular Microbiology*. 88(4): 813-826.

- Liu, Z. Liu, J. Gardner, W.S. Shank, G.C. Ostrom, N.E. (2016). The impact of DeepWater Horizon oil spill on petroleum hydrocarbons in surface waters of the northern Gulf of Mexico. *Deep-Sea Research II*. 129:292-300.
- Lizarraga-Partida M.L. (1996) Microbiología del petróleo en el sur del Golfo de México. En Botello AV, Rojas-Galaviz JL, Benítez JA, Zárate Lomelí D (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX. Serie Científica N°5. Universidad Autónoma de Campeche. México. pp. 265-277.
- Lizarraga-Partida, M.L. Mendez-Gomez, E. Rivas-Montaño, A, M. Vargas-Hernandez, E. Portillo-Lopez, A. Gonzalez-Ramirez, A. R. Huq, A. Colwell, R. R. (2009). Association of *Vibrio cholerae* with plankton in coastal areas of Mexico. *Environmental Microbiology*. 11(1):201-208.
- Lugo-Fernández, A., Green, R. (2011). Mapping the intricacies of the Gulf of Mexico's circulation. *EOS* 92, 21–22.
- Lyon, W, J.(2001). TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1 and Non-O139 in pure cultures, Raw oysters and synthetic seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10):4685-4693.
- MacDonald, I.R., Garcia Pineda, O.M., Beet, A., Daneshgar Asl, S., Feng, L., French McCay, D.P., Graettinger, G., Holmes, J., Hu, C., Leifer, I., Mueller-Karger, F., Solow, A.R., Swayze, G., (2015). Natural and unnatural oil slicks in the Gulf of Mexico. *J. Geophys. Res. Oceans*.
- Magny G,C. Hasan, N.A. Roche, B. (2014). How community ecology can improve our understanding of cholera dynamics. *Aquatic microbiology: frontiers in microbiology*.
- Magny, G,C. Mozumder, P. k. Grim, C.J. Hasan, N.A. Naser, M.N. Alam, M. Sack, R.B. Huq, A. Colwell.R.R. (2011). Role of zooplankton diversity in *Vibrio cholerae* population dynamics and the incidence of cholera in the Bangladesh Sundarbans. *Applied Environmental Ecology* 77(17):6125-6132.
- Márquez-Morfin,L. (1994). La desigualdad ante la muerte en la ciudad de México: el tifo y el cólera, 1813 y 1833. Siglo XIX Eds. México.
- Martins ML, Mouriño JLP, Fezer GF, Buglione Neto CC, Garcia P, Silva BC, Jatobá A, Vieira FN. (2010). Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*.70(1): 205-209.
- Mendelssohn, I., Byrnes, M., Kneib, R., Vittor, B. (2017). Coastal habitats of the Gulf of Mexico. En: C. H. Ward (Ed.). *Habitats and biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon oil spill, Volume 2: Fish resources, fisheries, sea turtles, avian resources, marine mammals, diseases and mortalities*. Springer Open, New York. pp 359-365.
- Moreno-Cassasola, P. 2016. La zona costera y sus ecosistemas. En: Moreno Cassasola, P (Ed), *Servicios ecosistémicos de las selvas y bosques costeros de Veracruz*. INECOL-ITTO-CONAFOR-INECC. Pp.19-36.
- Nandi, B., R. K. Nandy, *et al.* (2000). Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. *J Clin Microbiol* 38(11): 4145-51.
- Newton A., Kendall, M., Vugia, D. J., Henao, O. L. & Mahon, B. E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: Review of surveillance data from 2 systems. *Clin. Infect. Dis.* 54, 391–395.

- NOAA. (2016). Deepwater Horizon Oil Spill. Recuperada el 28 de julio de 2017 de <http://response.restoration.noaa.gov/deepwaterhorizon>
- Panicker G, Call DR, Krug MJ, Bej AK. (2004). Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 70: 7436–7444.
- Panicker, G. Bej, A. K. (2005). Real-Time PCR Detection of *Vibrio vulnificus* in Oyster: comparison of oligonucleotide Primers and Probes Targeting *vhA*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10):5702-5709.
- Patcharaporn, M., Peerakietkhajorn. Matsuura, T., Kato, Y., Watanabe, H. (2017) Effects of symbiotic bacteria on chemical sensitivity of *Daphnia magna*, *Marine Environmental Research*.
- Patton, J.S. Rigler, M. Boehm, P. Fiest, D. (1981) Ixtoc 1 oil spill: flacking of surface mousse in the Gulf of Mexico. *Nature* 290: 235-238
- Rauch, M. Graef, H. Rozenzhak, S.M. Jones, S. Bleckman, C. Kruger, R. Naik, R. Stone, M. (2006). Characterization of microbial contamination in United States air force aviation fuel tanks. *Journal of Industrial Microbiological Research*. 33:29-36.
- Rivas, D. Badan, A. Ochoa, J. (2005). The ventilation of the deep Gulf of Mexico. *Journal of physical oceanography*. 35:1763-1781.
- Robert-Pilot, A. Copin, S. Himber, C. Gay, M. Quilici, M. (2014). Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in sea products consumed in France using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 189:75-81
- Robles, L. A. García, R. M. Torres-López, J. (1999). Toxinas de *Vibrio cholerae*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 46 (4):255-259.
- Sabirova, J.S. Ferrer, M. Regenhardt, D. Timmis, K.N. Golyshin, P.N. (2006). Proteomic insights into Metabolic Adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by Alkane Utilization. *Journal of bacteriology*. 188 (11):3763.
- Sawabe, T. Ogura, Y. Matsumura, Y. Feng, G. Amin, A.R. Mino, S. Nakagawa, S. Sawabe, T. Kumar, R. et al. (2014). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. *Nov. Vibrio ecology, pathogenesis and evolution: frontiers in microbiology*. 5:7-20.
- Schlitzer, R., Ocean Data View, Recuperado en abril de 2018 de: <https://odv.awi>.
- Shikuma, N., & Hadfield, M. (2010). Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio*. *Biofouling* 26: 39–46.
- Smith, P. E. Richardson, S. (1977). *FAO Fish. Technical. Paper.*, (175):100p. Standar Techniques for pelagic fish egg and larval surveys.
- Soto, L.A. Botello, A.V. Licea-Duran, S. Lizárraga, M.L. Yáñez-Arancibia, A. (2014). The environmental legacy of the Ixtoc-I oil spill in the Campeche Sound, southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in marine science*. Vol 1: 1-9.
- Staroscik, A. (2004). Calculator for determining the number of copies of a template. University of Rhode Island. Recuperado el 3 de abril de 2018 de <https://web.uri.edu/gsc/dsdna-calculator/>
- Tan, S. C., Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009.

- Teramoto, M. Yeong, S. O. Ohnishi, K. (2013). Specialized hydrocarbonoclastic bacteria prevailing in seawater around a port in the strait of Malacca. *PLoS ONE* 8(6).
- Thompson, F., Gevers, D., Thompson, C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C., & Swings, J. (2005). Phylogeny and Molecular Identification of *Vibrios* on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5107-5115.
- Thompson, J. R. Randa, M. A. Marcelino, R. A. Tomita-Michelle, A. Lim, E. Poltz, M. F. (2004). Diversity and dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (7):4103-4110.
- Troupin, C. Barth, A. Sirjacobs, D. Ouberdous, M. Brankart, J-M. Brasseur, P. Rixen, M. Alvera-Azcárate, A. Belounis, M. Capet, A. Lenartz, F. Toussaint, M-E. Beckers, J-M. (2012). Generation of analysis and consistent error fields using the Data interpolating variational analysis (DIVA). *Ocean modeling*. 52: 90-101.
- Ward, L. N. Bej, A. K. (2006). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed Real-Time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Applied Environmental Microbiology*. 72(3):2031-2042.
- Whitman, R. Flick, G. (1995). Microbial contamination of shellfish: Prevalence, risk to human health and control strategies. *Annual Review of Public Health*. 16:123-140.
- Würsig, B. (2017). Marine mammals of the Gulf of Mexico. En: C. H. Ward (Ed.). *Habitats and biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon oil spill, Volume 2: Fish resources, fisheries, sea turtles, avian resources, marine mammals, diseases and mortalities*. Springer Open, New York. pp.1489-1588.
- Yañez-Arancibia, A., Day, J. (2004). The Gulf of Mexico: towards an integration of coastal management with large marine ecosystem management. *Ocean & Coastal Management*, 47, 537-563.
- Yang, T. Nigro, L.M. Guitierrez, T. D'Ambrosio, L. Joye, S. B. Highsmith, R. Teske, A. (2016). Pulsed blooms and persistent oil-degrading bacterial populations in the water column during and after the DeepWater Horizon blowout. *Deep- Sea Research II*. 129:282-291.
- Zavala-Hidalgo, J. Parés-sierra, A. Ochoa, J. (2002). Seasonal variability of the temperature and heat fluxes in the Gulf of Mexico. *Atmósfera*. 15:81-104.
- Zen-Yoji, H. Sakai, S. Kudo, Y. Benoki, M. Nagasaki, M. (1965). Epidemiology, enteropathogenicity and classification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Infectious Diseases*. 115(5):436-444.