

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



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con Orientación en
Biotecnología Marina**

**Las bioincrustaciones como vector de transferencia y
reservorio de vibrios patógenos**

Tesis

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

Presenta:

Valeria Jeanette Revilla Castellanos

Ensenada, Baja California, México
2012

Resumen de la tesis de Valeria Jeanette Revilla Castellanos, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California, México octubre 2012.

Las bioincrustaciones como vector de transferencia y reservorio de vibrios patógenos

Resumen aprobado por:

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida
Director de Tesis

Los vibrios son bacterias que habitan naturalmente en el mar; algunas especies son patógenas para el humano, causando gastroenteritis y septicemia. Tal es el caso de las especies *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* que han sido detectadas en el agua de lastre de barcos mercantes, así como en las bioincrustaciones sobre sus cascos, permitiéndoles una posible desimanación y debido al cambio en su distribución mundial ahora son consideradas especies emergentes. Las bioincrustaciones adheridas a tres barcos mercantes y sobre diversas estructuras portuarias en Ensenada, Baja California, fueron analizadas mediante RT-qPCR para la identificación y cuantificación de ADN perteneciente a estas especies patógenas. No se logró identificar la presencia de *V. vulnificus*, sin embargo, se logró detectar *V. cholerae ctxA-*, Cholix A+, no-O1/no-O139 en las bioincrustaciones de un muelle donde atracan barcos mercantes internacionales. También se identificó *V. parahaemolyticus trh+*, *tdh+*, y *orf8+*, en distintos muelles y sobre el casco de un barco mercante con procedencia japonesa. Los resultados sugieren que las bioincrustaciones tanto en las estructuras portuarias como sobre los cascos de barcos son un reservorio importante para vibrios patógenos, además de ser un vector inadvertido para su diseminación.

Palabras Clave: **Bioincrustaciones, reservorio, vector, *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*.**

Abstract of the thesis presented by Valeria Jeanette Revilla Castellanos as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in life science with orientation in marine biotechnology. Ensenada, Baja California, México October 2012.

Biofouling as a dissemination vector and reservoir for pathogenic vibrios

Abstract approved by:

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida
Director de Tesis

Vibrios are bacteria that naturally live in the ocean; some of the species that compose this group are human pathogens, causing gastroenteritis and septicemia. Such is the case of *V. cholerae*, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*, which have been detected in ships ballast water and on the biofouling covering their hulls; allowing their dissemination, and due to the change in their global distribution they are now considered emerging species. Biofouling on three commercial vessels and on different port structures in Ensenada, Baja California, were analyzed with RT-qPCR for identification and quantification of the DNA belonging to each pathogenic specie. *V. vulnificus* was not identified, however *V. cholerae ctxA-*, Cholix A+, no-O1/no-O139 was detected in the biofouling collected from the pier where commercial vessels dock. *V. parahaemolyticus trh+*, *tdh+* and *orf8+* was also found on different piers and on the hull of a ship with Japanese origin. These results suggest that biofouling on port structures and ships are an important reservoir for pathogenic vibrios, and an overlooked vector for their dissemination.

Keywords: Biofouling, reservoir, vector, *V. cholerae*, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*.

Dedicatoria

*A mis padres quienes siempre
han alentado mis porqués,
y a mi hermana con la que
he ido descubriendo los cómo.*

Agradecimientos

A mi familia con quienes aprendí que es tan importante, o más, el camino como la meta. Jamás recibí negatoria cuando de mis planes, sueños o ideales se trataba, a ellos debo quien soy y seré.

Al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida por creer en mi, brindándome su apoyo y respaldo tanto académico como personal, haciendo posible el desarrollo y la conclusión exitosa de este capítulo en mi vida.

Al Dr. Helmut Maske Rubach y al Dr. Alexi Fedorovich Licea Navarro, miembros del comité, que cuyas observaciones, sugerencias y contribuciones fortalecieron el trabajo de investigación a alcanzar su potencial.

A mis compañeros de laboratorio: Jairo Fuentes Pascacio, Abraham Guerrero Ruiz, Félix Olivares Quintero, Ricardo González y Ricardo Cruz López, quienes no sólo me brindaron su amistad, sino que fueron importantes mentores para mi formación académica. Así como el resto de las amistades y lazos creados durante mi estancia en Ensenada, haciéndola sentir verdaderamente como mi segundo hogar.

A la Administración Portuaria Integral de Ensenada (API), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), a la Secretaría de Marina (SEMAR), a Capitanía de Puerto, y a Ensenada International Terminal (EIT) por autorizar y otorgar los permisos requeridos para continuar con el trabajo de campo.

A Trabajos Submarinos Arce por sus servicios de buceo que facilitaron la toma de muestras.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por ser la institución receptora de mi Maestría en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 242862 otorgada para la realización y culminación del proyecto de investigación.

Tabla de contenido

<i>Resumen en español</i>	ii
<i>Resumen en inglés</i>	iii
<i>Dedicatorias</i>	iv
<i>Agradecimientos</i>	v
<i>Lista de figuras</i>	ix
<i>Lista de tablas</i>	xi
Capítulo I. Introducción	1
I.1. Generalidades	1
I.2. Transporte de organismos mediante agua de lastre y bioincrustaciones	1
I.3. El género <i>Vibrio</i> , su ecología y situación actual	4
I.5 Perspectiva	7
Capítulo II. Justificación	8
Capítulo III. Hipótesis	9
Capítulo IV. Objetivos	10
IV.1. Objetivo general	10
IV.2. Objetivos particulares	10
Capítulo V. Material y Método	11
V.1. Zona de la toma de muestras	11
V.2. Procesamiento de muestra	12
V.2.1. Bioincrustaciones sobre el casco de barcos mercantes	12
V.2.2. Bioincrustaciones en las estructuras portuarias	13
V.3. Extracción de ADN	13
V.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)	13
A) <i>V. cholerae</i>	14
B) <i>V. vulnificus</i>	15
C) <i>V. parahaemolyticus</i>	15
V.5. Cuantificación de ADN y regresión lineal	16
V.6. Cultivo de colonias para la colección	17
Capítulo VI. Resultados	18
VI.1. Introducción	18
VI.2. Regresión lineal	19

VI.3. Presencia de <i>Vibrio</i> spp.	22
VI.3.1. <i>V. cholerae</i>	23
VI.3.2. <i>V. vulnificus</i>	25
VI.3.3. <i>V. parahaemolyticus</i>	26
VI.4. Aislamiento de colonias	33
Capítulo VII. Discusión.....	35
Capítulo VIII. Conclusión.....	41
Capítulo IX. Recomendaciones.....	42
Referencias Bibliográficas.....	43
Anexo.....	A

Lista de figuras

Figura 1.	Serie histórica de contenedores tomada del Anuario Estadístico de la SCT 2011, donde el eje de las X representan los años y en el eje Y el número de barcos mercantes que llegan a puertos mexicanos, en millones.	3
Figura 2.	Sitios de la toma de muestras. Ensenada, Baja California, México.	11
Figura 3.	Áreas sobre la superficie exterior donde se tomaron las muestras en barcos mercantes operando en Ensenada, Baja California, México. Modificado de Hendersen (2011).	12
Figura 4.	Curvas de amplificación para las cuatro concentraciones de ADN con sus respectivas repeticiones. Siendo el eje de las X el número de ciclos (C_T) y el eje de las Y la señal de fluorescencia emitida (ΔR_n).	19
Figura 5.	La regresión lineal donde, la línea con rombos son los valores (x,y) de los datos presentados en la tabla III y línea negra representa la ecuación de la recta (2) que mejor se ajusta a la tendencia de los datos observados.	21
Figura 6.	Amplificación negativa para las tres especies en las muestras de Coral Marina y la boya.	22
Figura 7.	Curva de amplificación para el gen <i>ompW</i> , donde la curva 1 representa el control positivo CICESE 67 y la curva 2 la muestra positiva para <i>V. cholerae</i> procedente del muelle EIT #2a.	23
Figura 8.	Curva de amplificación para el gen Cholix A donde la curva 1 representa el control positivo CICESE 67 y la curva 2 la muestra positiva para la toxina en el muelle EIT #2a.	25
Figura 9.	Curvas de amplificación para el iniciador <i>t1h</i> , donde se observan las 8 muestras positivas y el control CICESE 595. (1) EIT #2a, (2) Barco #3 Fukuyama, Japón, (3) EIT #1, (4) EIT #2b, (5) Malecón, (6) Barco #2 Busan, Corea del Sur, (7) E.C. Village y (8) Barco #1 Yokohama, Japón.	26
Figura 10.	Porcentajes de la cantidad de ADN correspondiente a <i>V. parahaemolyticus</i> presente en la muestras ambientales: (1) Barco #1, (2) EIT #2a, (3) Barco #2, (4) EIT #2b, (5) Barco #3,	

	(6) EIT #1, (7) Malecón, (8) E.C. Village.	28
Figura 11.	Amplificación de las muestras positivas para <i>trh</i> , (1) CICESE 596, (2) EIT#1, (3) Barco #3.	28
Figura 12.	Amplificación de las muestras positivas para <i>tdh</i> , (1) control CICESE 596, (2) EIT#1, (3) Barco #3, (4) EIT #1, (5) Barco #1, (6) E.C. Village, (7) EIT #2b, (8) Barco #2, (9) Malecón.	29
Figura 13.	Porcentaje de <i>tdh</i> y <i>trh</i> presente con respecto a la cantidad total que dio positiva para <i>V. parahaemolyticus</i> en las ocho muestras ambientales (1) Barco #1, (2) EIT #2a, (3) Barco #2, (4) EIT#2b, (5) Barco #3, (6) EIT #1, (7) Malecón, (8) E.C. Village.	31
Figura 14.	RT-qPCR para <i>orf8</i> : (1) control CICESE 595, (2) Barco #3, (3) EIT #2a.	31
Figura 15.	Porcentaje de <i>orf8+</i> presente en las muestras son positivas para <i>V. parahaemolyticus</i> además de ser positiva para el gen de la hemolisina directa <i>tdh</i> . (1) Barco #3, (2) EIT #2a.	32
Figura 16.	Colonias violetas de <i>V. parahaemolyticus</i> asiladas de las muestras Barco #3 y EIT #2a.	33
Figura 17.	Curvas de amplificación para las 20 colonias aisladas de EIT#2a <i>V. parahaemolyticus tdh+</i> .	34
Figura 18.	Curvas de amplificación para la cepa pandémica #13 (1) <i>tdh+</i> , (2) <i>orf8+</i> , (3) <i>trh-</i> .	34

Lista de tablas

Tabla 1.	Cepas control utilizadas como controles positivos en las identificaciones de <i>Vibrio</i> spp.	17
Tabla 2.	Datos del RT-qPCR utilizando ADN de <i>V. parahaemolyticus</i> (CICESE 595) para la formulación de la curva estándar.	20
Tabla 3.	Conversión logarítmica de los valores de ADN ng/ μ l y C_T Media.	20
Tabla 4.	Cantidad de copias del genoma de <i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en 1ng de ADN.	22
Tabla 5.	Concentración de ADN positivo para <i>ompW</i> en base a su C_T multiplicado por el factor de dilución y e porcentaje que representa en la muestra total.	24
Tabla 6.	Concentración de ADN para Cholix A en base a su C_T . El porcentaje que representa de acuerdo con la concentración positiva para <i>V. cholerae</i> y las copias de su genoma que representa.	25
Tabla 7.	Concentración de ADN con respecto al valor C_T obtenido con el iniciador <i>tlh</i> para la identificación de <i>V. parahaemolyticus</i> y el número de copias del genoma que representa.	27
Tabla 8.	Muestras positivas para <i>trh</i> , el valor C_T del RT-qPCR y la concentración de ADN correspondiente a la regresión lineal.	29
Tabla 9.	Muestras positivas para <i>tdh</i> , el valor C_T indicando la concentración de ADN correspondiente a la regresión lineal.	30
Tabla 10.	Concentración de ADN para las muestras <i>orf8+</i> correspondiente a su valor C_T y multiplicado por el factor de dilución.	32

Capítulo I. Introducción

1.1. Generalidades

Hoy vivimos en un mundo donde patógenos antes localizados a una región, ahora presentan una distribución geográfica mucho más amplia y compartida. A estos patógenos se les definen como enfermedades infecciosas emergentes (EID), donde se identifican siete vías potenciales por el cual un patógeno puede emerger: (a) incremento en incidencia, (b) incremento en impacto, (c) incremento en su rango geográfico, (d) evolucionando en un nuevo patógeno, (e) al entrar a una población humana por primera vez, (f) cambiando de manera significativa su patología o cuadro clínico, o (g) porque han sido apenas descubiertos (Smith y Guégan, 2010). Las actividades humanas ahora son consideradas como el factor principal para la dispersión de especies marinas no-nativas alrededor del mundo, con una variedad de mecanismos antropogénicos que son reconocidos por haber acelerado de manera importante el proceso de invasión (Carlton 1985, 1989; Cranfield *et al.* 1998; Hewitt *et al.* 1999; Leppäkoski *et al.* 2002; Minchin *et al.* 2005). Estas actividades humanas se cree que han sido el componente principal del cambio en la distribución global de especies (Elton, 1958). En el contexto de especies invasoras, la razón de investigar la transferencia de microorganismos acuáticos, incluyendo virus, bacterias, protistas, y algas son su alta densidad en aguas naturales, su habilidad de entrar a estados latentes y su potencial tóxico o patogénico (Drake *et al.* 2007). En ambientes naturales, las especies invasoras pueden tener efectos devastadores para un ecosistema y en sus recursos económicos.

1.2. Transporte de organismos mediante agua de lastre y bioincrustaciones

De las varias vías existentes para el transporte de especies no-nativas en los ambientes marinos, el tráfico de barcos mercantes ha sido identificado como importante (Hewitt *et al.* 1999; Gollasch, 2002). Específicamente los

microorganismos acuáticos son ordenes de magnitud mucho más abundantes que otros macroorganismos y dada su alta densidad, son transferidos e introducidos globalmente mediante barcos en mayor escala que otros organismo de tamaño más grande. Por lo que la amenaza de su dispersión global, parece más inmediata que la amenaza de una invasión por cualquier otro grupo de organismos (Drake *et al.* 2007).

Los mecanismos de liberación de organismos marinos no-nativos que han sido identificados son, el agua de lastre (Carlton, 1985; Olenin *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2007), las bioincrustaciones sobre los cascos de barcos (Lewis *et al.* 2003; Coutts y Taylor, 2004), y la toma de mar del sistema de enfriamiento en los barcos mercantes (Carlton *et al.* 1995; Coutts *et al.* 2003; Minchin y Gollasch, 2003; Coutts y Dodgshun, 2007). Por lo anterior, el riesgo accidental de la liberación de organismos invasores es multiplicado, especialmente en puertos (Carlton 1996; Floerl *et al.* 2005). En Ensenada, Baja California, México según la serie histórica de la Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT) en su Anuario Estadístico del 2011, el transporte de contenedores ha incrementado en un 70% desde el 2004 cuando el movimiento total fue de 32,202 hasta 132,727 en el 2011. Este incremento acelerado del tráfico marítimo no es exclusivo para el puerto de Ensenada, como se observa en la figura 1. La tendencia muestra que a lo largo de los años 2004 - 2011 en distintos puertos a lo largo de las costas Mexicanas ha habido un aumento en el tránsito de barcos de contenedores, principalmente con aquellos localizados en las costas del pacífico. Estos números son alarmantes si consideramos que existen concentraciones de alrededor de 10^6 a 10^{11} /L microorganismos (incluyendo virus), ocurriendo de manera natural en el agua de mar (Drake *et al.* 2007) que pueden ser transportados tanto dentro del barco, en los millones de litros de agua de lastre que incorporan, o la gran cantidad adherida a su casco formando parte de las bioincrustaciones (Strain, 2012).

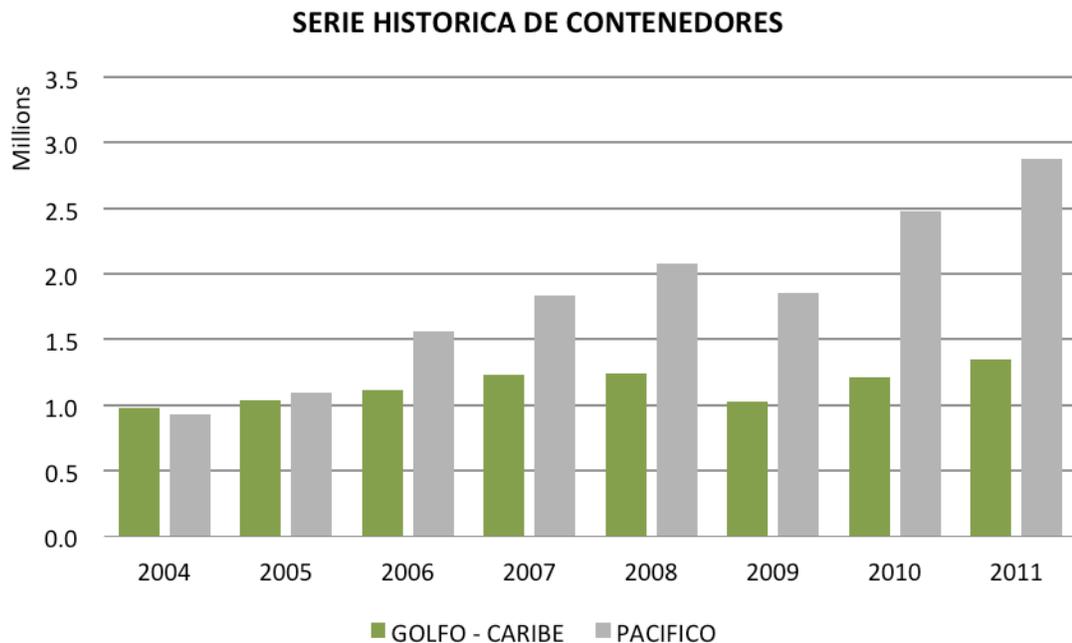


Figura 1. Serie histórica de contenedores tomada del Anuario Estadístico de la SCT 2011, donde el eje de las X representan los años y en el eje Y el número de barcos mercantes que llegan a puertos mexicanos, en millones.

El agua de lastre en barcos ha sido ampliamente considerada como un mecanismo (vector) de transferencia para especies marinas costeras y esta asociada a por lo menos un tercio de los cientos de casos documentados de invasiones marinas a nivel mundial (Hewitt y Campbell 2010). Con base en lo encontrado, la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos de Norte América (FDA) recomendó a la Guardia Costera advertir a los agentes de barcos y capitanes que el agua de lastre fuese intercambiada en mar abierto antes de que entraran los barcos a puertos Estadounidenses (McCarthy y Khambaty, 1994). En los últimos 12 años, el agua de lastre ha sido implicada como vector de transporte de plantas, animales y bacterias patógenos incluyendo cepas virulentas de *V. cholerae* (Ruiz *et al.* 2000).

No todos los organismos invasores se encuentran dentro de los barcos en el agua de lastre. La mayoría vive a plena vista, adherida a sus cascos. Estudios sugieren que tales incrustaciones de organismos representan una amenaza de invasión tan

importante, o aún más, que el agua de lastre, y hasta la fecha la regulación no ha tomado en cuenta esta variable, en parte porque no es clara la manera en la cual los barcos pudieran eliminar efectivamente esa carga adherida. Pero al sólo controlar la descarga del agua de lastre, se está resolviendo únicamente parte del problema (Strain, 2012).

Las bioincrustaciones comienzan con la adsorción de moléculas orgánicas sobre las superficies recién sumergidas, seguido por la acumulación de bacterias, diatomeas, y otros microorganismos unidos a una película extracelular de sustancias poliméricas (Zobell y Allen, 1935). Tales biofilms se desarrollan sobre las superficies en cuestión de horas de inmersión, incrementando en densidad y complejidad estructural con el tiempo (Donlan, 2002). Estas bioincrustaciones representan un mecanismo de invasión, en el cual las especies pueden moverse de un ambiente a otro, atravesando entornos agresivos para su crecimiento, rompiendo varias barreras físicas, químicas y biológicas (Apte *et al.* 2000). Las bioincrustaciones suelen tener una mayor abundancia de microorganismos que la columna de agua (Shikuma y Hadfield, 2010), ya sea que estén alrededor de partículas en suspensión (ZoBell y Anderson 1936), sobre la superficie de organismos (Carman y Dobbs 1997), o sobre la interfase de agua y sedimento (Novitsky y Karl 1986), los biofilms maduros pueden contener microorganismos notoriamente resistentes a desinfectantes químicos (Costerton *et al.* 1999) y les pueden proveer de protección contra la depredación.

1.3. El género *Vibrio*, su ecología y situación actual

Se han propuesto a los biofilms como un refugio ambiental de un gran número de bacterias patógenas, otorgándoles una ventaja adaptativa promoviendo su persistencia en el ambiente (Hall-Stoodley y Stoodley, 2005) y generando un refugio de protección al estrés químico y biológico (Decho, 2000). Resultados basados en estudios de laboratorio sugieren que los biofilms proveen un mecanismo poderoso para la sobrevivencia de vibrios en el ambiente (Munirul

et al. 2007). Una vez liberados, los microorganismos están preparados para ser especies invasoras. Son pequeñas, lo que facilita su dispersión pasiva, aparentemente tienen requerimientos de conservación más sencillos que los metazoos, basado en su ubiquidad en la biosfera incluyendo ambientes extremos (Deming, 1997). Se reproducen predominantemente por vías asexuales y crecen rápidamente, factores que contribuyen a su amplia distribución. Finalmente, sus ciclos de vida pueden incluir estados de latencia, haciéndolos capaces de sobrevivir periodos prolongados de condiciones no favorables (Colwell y Huq, 1994). Todo lo anterior resulta aplicable para el género *Vibrio*, bacterias de vida libre que habitan prácticamente alrededor del mundo. Pueden tolerar rangos variados de salinidad y presentan un estado de latencia en el cual se encuentran viables pero no cultivables (VBNC) (Bhunia, 2008).

El género *Vibrio* incluye más de 50 especies, de ellas al menos 12 son consideradas patógenas, y de ellas algunas han sido asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos (Thompson *et al.* 2005). Dentro de las más importantes y estudiadas se encuentran *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. Estas especies pueden encontrarse en vida libre y/o asociadas a superficies inertes o sobre organismos acuáticos como protozoos, moluscos, peces y crustáceos. Los vibrios se asocian a estos organismos para que puedan sobrevivir un mayor tiempo que como organismo de vida libre (Bhunia, 2008). El humano es también un reservorio para organismos patógenos pertenecientes a este género, en el cual producen enfermedades como septicemias o gastroenteritis.

V. cholerae prospera en hábitats marinos como un agregado flotante en la superficie del agua (Faruque *et al.* 2006), sobre superficies bióticas como los exoesqueletos de zooplancton (Tamplin *et al.* 1990; Huq *et al.* 1995), o sobre la superficie de algas marinas (Islam, 1994), y también sobre superficies abióticas incluyendo la superficie interna de los tanques de lastre en barcos mercantes

(Drake *et al.* 2007). Dada esta ecología es probable que *V. cholerae* este formando parte tanto del biofilm de las bioincrustaciones, así como estableciendo asociaciones con el resto de los invertebrados presentes en el mismo. Resultados de Shikuma y Hadfield (2010) sugieren que la presencia de *E. coli* y *V. cholerae* se ven favorecidas a manera de biofilms sobre superficies sumergidas como los cascos de barcos y suelen presentarse en mayor cantidad que en la columna de agua. Por lo que el transporte de microorganismos vía las bioincrustaciones de barcos puede ser un método viable para su diseminación entre puertos internacionales. Desde el 2000 la incidencia de cólera ha incrementado paulatinamente, llegando en el año 2011 a 317, 534 casos reportados a nivel mundial. El número de casos incrementó un 43% comparado con el 2009 y un 130% comparado al 2000 (WHO, 2011).

V. parahaemolyticus es una bacteria halófila que habita naturalmente en ambientes marinos y de agua dulce, fue identificada por primera vez como la causa de una enfermedad transmitida por alimentos en Japón en 1950 (Nair *et al.* 2007). Este agente común de gastroenteritis, sigue siendo la causa principal de enfermedades transmitidas por alimentos en Japón y a través de Asia (Lee *et al.* 2001; Wong *et al.* 2000). Las cepas de *V. parahaemolyticus* son clasificadas en base a sus patrones de antígeno somático (O) y capsular (K), el serotipo predominante es O3:K6, que se encuentra distribuido globalmente. Se piensa que el serotipo O3:K6 se originó en Japón y fue el responsable de un gran brote en Calcutta, India en 1996 (Nair *et al.* 2007). Las infecciones resultantes por el consumo de mariscos contaminados con *V. parahaemolyticus* se han incrementado en los últimos 10 años por lo que se le considera un patógeno emergente (Smith y Guégan, 2010), y ha sido identificado a nivel mundial como el causante principal de gastroenteritis transmitido por mariscos (Hurley *et al.* 2006). En años recientes los brotes infecciosos de *V. parahaemolyticus* han incrementado en los Estados Unidos de Norte América y se estima que las infecciones son responsables de 5000 casos al año (Yeung y Boor 2004).

Por último *V. vulnificus* es un patógeno que ocurre naturalmente en aguas tibias y es responsable de una variedad de enfermedades en ciertos individuos de alto-riesgo. La vía de infección puede ser mediante el consumo de mariscos crudos o a través de heridas expuestas y puede resultar en septicemia primaria, meningitis y neumonía (Whitman y Flick, 1995). *V. vulnificus* es una bacteria que debido a su tasa de mortalidad del 60% (Oliver, 1995), es considerado como un riesgo sanitario ya que de acuerdo con estimaciones tanto en los Centros de Control de Enfermedades en Estados Unidos (CDC) y la FDA, se presentan 50 casos al año de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con este patógeno que requieren hospitalización (Todd, 1989).

1.5 Perspectiva

Es importante recalcar que la invasión de especies mediada por barcos continuará aún y cuando el agua de lastre tenga un manejo apropiado, dado que los barcos cargan una gran cantidad de organismos adheridos a su casco (Gollasch *et al.* 2006). La abundancia de bacterias patógenas puede pasar desapercibida si sólo es muestreada la columna de agua, ya que las bioincrustaciones son reservorios importantes de microorganismos patógenos (Shikuma y Hadfield, 2010).

Así como se espera que la temperatura global de la superficie del océano incremente (Smith y Guégan, 2010), las enfermedades infecciosas pueden extender su distribución geográfica. No sólo se espera que el transporte de microorganismos en los puertos mundiales escale, sino que la liberación de patógenos potenciales incrementará también (Drake *et al.* 2007). Consecuentemente es importante una caracterización mejorada de los vectores potenciales responsables de su introducción para una evaluación del riesgo y para el desarrollo de normas preventivas (Mineur *et al.* 2007).

Capítulo II. Justificación

Los cascos de barcos han mostrado ser vectores importantes de transmisión de especies exóticas alrededor del mundo (Minchin *et al.* 2003; Gollasch, 2002; Apte *et al.* 2000; Minuer *et al.* 2007). Algunos de los eventos inexplicados e inesperados a nivel mundial como han sido los brotes de cólera en países como Perú y Haití pudieran estar asociados al transporte de patógenos sobre las bioincrustaciones en barcos. Mucho se ha intentado explicar mediante corrientes marinas, zooplancton, fitoplancton (Vezzulli *et al.* 2010; Colwell, 1996, 1994; Pruzzo *et al.* 2008), insectos (Halpern *et al.* 2008) y aves marinas (Frisch *et al.* 2007). Aunado a estas hipótesis, en el caso de vibrios patógenos, un aspecto importante e inadvertido es precisamente el efecto antropológico del transporte sobre los cascos de barcos en las bioincrustaciones. Por último el dilucidar y definir un nuevo vector de diseminación para algunas de las especies patógenas del género *Vibrio* puede abrir las puertas a la generación de modelos y patrones en el transporte de otras bacterias y/o virus.

Capítulo III. Hipótesis

Las bioincrustaciones marinas son un reservorio de vibrios patógenos y aquellas sobre los cascos de barcos representan un vector de diseminación inadvertido.

Capítulo IV. Objetivos

IV.1. Objetivo general

Detectar la presencia de vibrios patógenos en muestras procedentes de las bioincrustaciones sobre los cascos de barcos y en distintas estructuras portuarias en la Bahía Todos los Santos, Ensenada, Baja California, México.

IV.1.1. Objetivos particulares

- Identificar la presencia de las especies *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en el homogenizado procedente de las bioincrustaciones.
- En el caso de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* identificar los genes asociados a la virulencia, además determinar el serogrupo (O1/O139 u no-O1/O139) de las muestras positivas para *V. cholerae*.
- Aislar colonias de aquellas especies que resulten positivas para los distintos genes patógenos e incorporarlas a la colección de microorganismos de la División de Biología Experimental y Aplicada de CICESE.

Capítulo V. Material y Método

V.1. Zona de la toma de muestras

El muestreo para este estudio se realizó en distintos muelles localizados en la Bahía Todos los Santos, Ensenada, Baja California, México: Coral Marina, donde atracan barcos y yates locales; Malecón, donde se localizan los barcos y lanchas comerciales/turísticas; Ensenada International Terminal (EIT), muelles para la llegada de barcos mercantes internacionales, aquí se tomo muestra de los tres barcos con procedencia asiática; Ensenada Cruiseport Village (E. C. Village), para yates privados y cruceros; y sobre la boya FLUCAR localizada fuera de la Bahía en 31.671° latitud norte y 116.693° longitud oeste, por Punta Banda.

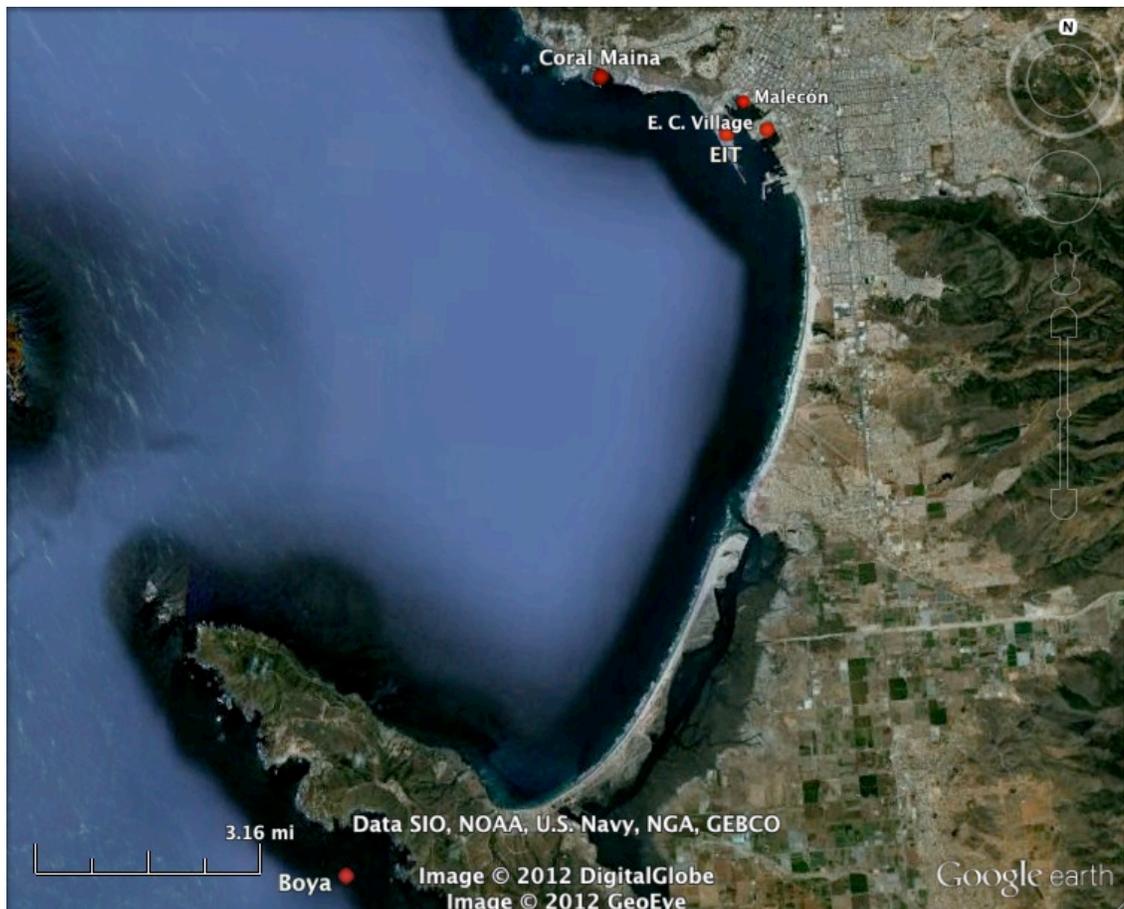


Figura 2. Sitios de la toma de muestras. Ensenada, Baja California, México.

V.2. Procesamiento de muestra

V.2.1. Bioincrustaciones sobre el casco de los barcos mercantes

Se tomaron muestras de manera aleatoria en distintas zonas sobre el casco de tres barcos mercantes con procedencia asiática. Dos de los barcos provenían de Japón, uno de Yokohama y el otro de Fukuyama; el tercero de Busan, Corea del Sur.



Figura 3 Áreas sobre la superficie exterior donde se tomaron las muestras en barcos mercantes operando en Ensenada, Baja California, México. Modificado de Hendersen (2011).

Las muestras se tomaron por buceo con una espátula, raspando las bioincrustaciones en bolsas con sello hermético. Inmediatamente después fueron llevadas al laboratorio. A estas muestras se les realizó dos metodologías: (a) se tomó directo de la muestra 1ml de bioincrustación con agua de mar y se diluyó en 9ml de agua peptonada alcalina (APA) con relación 1:10; (b) se filtró toda el agua de mar contenida en la bolsa donde se colocó la muestra con una membrana de nitrocellulosa de 0.22 μ m, esto eliminó el agua dejando sobre el filtro todas las partículas en suspensión, el cual fue colocado en 9ml de APA. Se incubaron las muestras con sus tres respectivas repeticiones a 35 °C por 12-18 horas.

V.2.2. Bioincrustaciones en las estructuras portuarias

Se tomaron muestras de las bioincrustaciones adheridas a los muelles anteriormente mencionados, y de la boya fuera de la bahía. De los muelles Coral Marina, Malecón y E.C. Village se realizó el muestreo una vez, a diferencia del muelle EIT donde se tomaba muestra cada que llegaba el barco diana. En dos ocasiones se tomó muestra del muelle EIT#2 (2a y 2b) y en una ocasión el EIT#1. Se colocaron las bioincrustaciones tomadas en bolsas con sello hermético. Después se realizó una homogenización con mortero y pistilo de 200 gr de muestra con 200 ml de PBS (solución amortiguadora de fosfato salino) para obtener una mezcla de dilución 1:1. Posteriormente se diluyó 1ml de la muestra con PBS en 9ml de APA para tener una relación 1:10 y se incubaron las muestras a 35 °C por 12-18 horas. Al igual que con las muestras anteriores, se realizaron tres repeticiones de cada muelle.

V.3. Extracción de ADN

Se realizó una extracción de ADN genómico a partir de 200 µl de APA previamente incubado con la muestra ambiental, utilizando la técnica de choque térmico de acuerdo a Fuentes (2012) modificada a partir de Hartung de Capriles *et al.* (2005) y Chacón *et al.* (2010), los detalles se presentan en el anexo. Se analizó la calidad y concentración del ADN utilizando el espectrofotómetro NanoVue™ de General Electric con una longitud de onda de 260nm para la cuantificación y con una de 280nm para la pureza. A todas las muestras se les diluyó con agua libre de nucleasas a una relación 1:20 para su procesamiento en el paso cuatro.

V.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

Se juntó en un solo tubo el ADN extraído de las tres repeticiones tomadas para cada sitio del muestreo, asegurándose así de obtener una muestra amplia y aleatoria del ADN de todos los organismos presentes en la bioincrustación. En

total se examinaron diez muestras (seis provenientes de muelles, una de la boya y tres de barcos mercantes). El ADN fue analizado con RT-qPCR en el equipo StepOnePlus™ Real-time PCR system de Applied Biosystems para identificar la presencia de las tres especies: *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* y sus respectivos genes patógenos. Los ensayos se realizaron en placas ópticas MicroAmp® de 96 pozos con un volumen final de 10 µl. Cada reacción contenía 5µl de SYBR® Green PCR master mix, 0.6µl de iniciadores forward (f) y reverse (r) a [20µM] y 4.4µl del templado de ADN y agua libre de DNAsas y RNAsas. Además de los programas específicos para cada especie se realizó una curva de disociación de 95 °C por 15", 60 °C 1'. y 95 °C con un incremento de 0.3 °C en cada ciclo.

A) *V. cholerae*

- Para la identificación de especie se utilizaron los iniciadores *ompW* 354f- TCC GTC CAT ATG TTG GTG CGG GT y *ompW* 496r- AGC CAA CGT TAG CAG CAA GTC CC (Bruno Gómez-Gil, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo –CIAD- Mazatlán, publicación en proceso). La reacción se llevó a cabo con las siguientes características: inicialmente a 95 °C por 5' para la desnaturalización de todo el ADN presente en la muestra, después los 40 ciclos de 95 °C por 30", 56 °C por 1' y 72 °C por 1'.
- La toxina *ctxA* fue identificada utilizando los iniciadores publicados en 1998 por Hoshino *et al.* (VCT1 f-ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC; VCT2 r-ATA CCA TCC ATA TAT TTG GGA G) y los de Nandi *et al.* en el 2000 (*ctxA*-f. CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG y *ctxA*-r. TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG) bajo las siguientes particulares: 95 °C por 5' durante el primer paso, después 40 ciclos de 95 °C por 30", 55 °C por 1' y 72 °C por 1'.

- Cholix A (CHXA f-TGG TGA AGA TTC TCC TGC AA; CHXA r- CTT GGA GAA ATG GAT GCG CTG) (Prudy *et al.* 2010) y se corrió con el mismo programa mencionado en el punto anterior para *ctxA*.
- Los serotipos se identificaron mediante los iniciadores de Hoshino *et al.* (1998) tanto para O1 (O1f2-1 GTT TCA CTG AAC AGA TGG G; O1r2-2 GGT CAT CTG TAA GTA CAA C), como O139 (O139-f2 AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG; O139-r2 GTC AAA CCC GAT CGT AAA GG) con las especificaciones de programa usados en *ctxA*.

B) *V. vulnificus*

- Para identificar la especie se utilizaron los iniciadores *vvhA* 280f- GCC GAC AAG CCT GGC ACG GG y *vvhA* 370r- TGT AAG TGC GGC GGT TTG CCC A (Gómez-Gil, publicación en proceso). La reacción que se llevó a cabo fue con las mismas características que *ompW* para *V. cholerae*.

C) *V. parahaemolyticus*

- La identificación a nivel especie se realizó con los iniciadores *tlh* 636f- CGC GCT AAC AGG GGT TGG TGA y *tlh* 831r- CTT CGC ACC TGC GTC CGT CA (Gómez-Gil, publicación en proceso). La reacción que se llevó a cabo, fue con las mismas características que *ompW*.
- La búsqueda del gen *trh* fue llevada a cabo con los iniciadores *trh*-f TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT y *trh*-r CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G (Bej *et al.* 1999), bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 5' como primer paso, después 40 ciclos de 95 °C por 30", 57.5 °C por 1' y 72 °C por 1'.
- El gen de la hemolisina directa, *tdh* fue identificada con iniciadores de Bej *et al.* (1999) f-*tdh*. GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC y

r-tdh. TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC. Utilizando las especificaciones anteriores en el programa de *trh*.

- Se identificó *orf8* con los iniciadores propuestos por Myers *et al.* (2003) f-O3MM824 AGG ACG CAG TTA CGC TTG ATG y r-O3MM1192 CTA ACG CAT TGT CCC TTT GTA G. Con las mismas condiciones que *trh* y *tdh*.

V.5. Cuantificación de ADN y regresión lineal

Con ADN proveniente de la cepa de colección CICESE 595, utilizada junto con otras cepas en el RT-qPCR para los controles positivos (Tabla I), se preparó una serie de diluciones comenzando con 10 ng/μl de ADN y continuando a 1:10, 1:100 y 1:1000. Mediante esto se generó una curva estándar logarítmica con muestras del ADN que iban de 10 a 0.01ng/μl y se formuló una regresión lineal siendo el eje de las X el número del ciclo (C_T) y en el eje de las Y la cantidad de ADN. Se realizaron tres repeticiones de cada dilución. El programa utilizado fue aquel con el que se identificó a nivel de especie (*tlh*, *ompW* y *vvhA*). Con una temperatura inicial de 95 °C por 5' y después 40 ciclos de 95 °C por 30", 56 °C por 1' y 72 °C por 1'.

El número de bacterias tentativas fue determinado al conocer el peso molecular del genoma de las tres especies: *V. cholerae* 4.03 Mb (Heidelberg *et al.* 2000), *V. vulnificus* 5.01 Mb (Park *et al.* 2011) y *V. parahaemolyticus* 5.17 Mb (Makino *et al.* 2003). Al sólo presentar una copia del gen blanco es posible una cuantificación absoluta con la siguiente fórmula (Staroscik, 2004; Hien *et al.* 2001; Shikuma y Hadfield, 2010), para calcular el número de copias del genoma de cada especie por ng de ADN, lo que corresponde al número teórico de bacterias por ng:

$$Copias (genoma) = \frac{(ADN_{ng}) * (6.022 \times 10^{23})}{(bp) * (1 \times 10^9 ng) * (650 Dalton)} \quad (1)$$

Donde se multiplica el número de Avogadro por la cantidad total del ADN en ng y se divide todo por la longitud en pares de bases (bp) el genoma de la bacteria, multiplicado por el peso de cada bp (650 Dalton) y por último multiplicado por el valor de 1ng.

Tabla I. Cepas control utilizadas como controles positivos en las identificaciones de *Vibrio* spp.

Código	Colección	Especie	Características
CICESE 67	Rita Colwell Collection (RCC) 115	<i>V. cholerae</i> O139	<i>ompW+</i> , <i>ctxA+</i> , <i>chxA+</i>
CICESE 81	CICESE I-19	<i>V. cholerae</i> O1, El Tor	<i>ompW+</i> , <i>ctxA-</i> , <i>chxA+</i>
CICESE 594	American Type Culture Collection (ATCC) 27562	<i>V. vulnificus</i>	<i>vvha+</i>
CICESE 595	Secretaría de Salud (SSA) 429	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>orf8+</i> , <i>tlh+</i> , <i>tdh+</i> , <i>trh-</i>
CICESE 596	CIAD, Mazatlan. Colección de Organismos Acuáticos de Interés (CAIM) 1772	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>orf8-</i> , <i>tlh+</i> , <i>tdh+</i> , <i>trh+</i>

V.6. Cultivo de colonias para la colección

Se tomó una asada de la película superior de cada tubo con las diluciones 1:10 de las muestras en APA, hacia el medio TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) y se incubaron a 35 °C de 12-18 horas. A partir del TCBS ® DIFCO se pasaron 10 colonias verdes y 10 colonias amarillas a CHROMagar ® para respaldar el aislamiento correcto de las especies, siendo violetas las colonias de *V. parahaemolyticus* y verdes/azules las colonias pertenecientes a *V. vulnificus* y *V. cholerae*. A ellas se les realizó una nueva extracción de ADN por choque térmico, no sólo para corroborar que el aislamiento fue correcto a nivel especie, sino para que aquellas colonias positivas de algún gen patógeno fueron integradas al cepario de microorganismos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) cuyo responsable es el Dr. M. Leonardo Lizárraga Partida Investigador de la División de Biología Experimental y Aplicada (DBEA).

Capítulo VI. Resultados

VI.1. Introducción

En este capítulo se describen los resultados de las diez muestras de bioincrustaciones tomadas en diferentes puntos de la Bahía de Todos Santos en Ensenada, Baja California. Se realizaron tres muestreos sobre los cascos de barcos mercantes: Barco #1 de Yokohama, Japón que presentó sólo una delgada capa de biofilm y algas verdes en su casco, el Barco #2 de Busan, Corea del Sur que presentó poca acumulación de bioincrustaciones aunque con mayor densidad de algas verdes que el primer barco y por último el Barco #3 de Fukuyama, Japón el cual exhibió mayor densidad de biofilm y además de algas verdes presentó también Cirrípedos sobre su casco. Seis muestras fueron tomadas de los muelles, que incluyen: Coral Marina, Malecón, E.C. Village, EIT #2a (a la llegada del Barco #1), EIT #2b (a la llegada del Barco #2) y EIT #1 (a la llegada del Barco #3) y por último una muestra fue tomada de la boya situada por Punta Banda en la parte exterior de la Bahía. Cada una se analizó por RT-qPCR para la identificación de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* así como sus genes patógenos, en caso de ser conocidos. Los resultados son presentados en ese orden.

Dentro de este capítulo se define también la ecuación de la recta utilizada para la cuantificación de la concentración de ADN y la cantidad de copias del genoma de las bacterias blanco, con la fórmula 1. Además, se detalla cuáles son las colonias patógenas aisladas que ahora forman parte de la colección de microorganismos de la DBEA en CICESE.

VI. 2. Regresión lineal

Con el fin de obtener una ecuación de la recta, que explique la tendencia del ADN ng/ μ l con respecto al número de ciclos (C_T) se realizó una corrida de RT-qPCR con ADN proveniente de la cepa control CICESE 595 usando el iniciador *tlh*. En la figura 4 se observan las curvas de amplificación para las cuatro concentraciones de ADN utilizadas, 10ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 0.1 ng/ μ l y 0.01ng/ μ l. Estas concentraciones fueron medidas con el espectrofotómetro NanoVue™ para garantizar precisión en la concentración. Se realizaron tres repeticiones de cada concentración para obtener un promedio final de C_T correspondiente a cada cantidad de ADN. Las primeras curvas en alcanzar la asíntota son aquellas con una mayor concentración de ADN y al ir disminuyendo el ADN de la muestra su valor C_T incrementa.

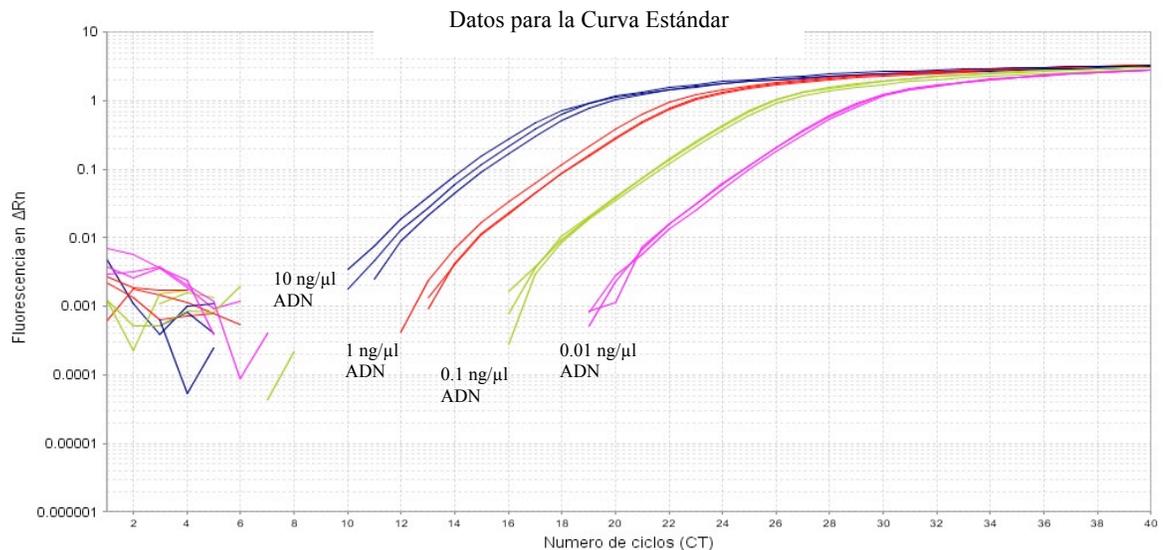


Figura 4. Curvas de amplificación para las cuatro concentraciones de ADN con sus respectivas repeticiones. Siendo el eje de las X el número de ciclos (C_T) y el eje de las Y la señal de fluorescencia emitida (ΔR_n).

Con la información del RT-qPCR anterior se obtuvieron los valores medios de C_T con su respectiva desviación estándar (σ) para cada concentración de ADN que

fue multiplicada por los 4.4µl de ADN utilizados en cada reacción inicial (Tabla II). Dado que los datos presentaron muy poca dispersión la σ se mantuvo por debajo de 0.5, esto nos demuestra que las tres repeticiones de la misma concentración de ADN tuvieron muy poca diferencia entre ellas y su valor de C_T fue casi idéntico. Utilizando la información anterior se realizó una transformación logarítmica, para asegurar que los valores utilizados en la regresión lineal tuvieran una distribución normal. La conversión de la concentración del ADN y del valor C_T se observan en la Tabla III.

Tabla II. Datos del RT-qPCR utilizando ADN de *V. parahaemolyticus* (CICESE 595) para la formulación de la curva estándar.

Iniciador	ADN ng/µl	C_T Media	$C_T \sigma$
<i>t/h</i> con reportero SYBR™	44	16.37120056	0.455062866
	4.4	19.76488495	0.29513061
	0.44	23.25073242	0.139262363
	0.044	26.59192085	0.143763736

Tabla III. Conversión logarítmica de los valores de ADN ng/µl y C_T Media.

Log ADN ng/µl	Log C_T Media
1.643452676	1.214080529
0.643452676	1.295894291
-0.356547324	1.366436638
-1.356547324	1.424749709

La ecuación de la recta con punto y pendiente fue utilizada para correlacionar la concentración de ADN con el valor de C_T y se obtuvo con los valores logarítmicos de la tabla III. Se trazó una línea que explicara la tendencia de los datos observados con mayor precisión:

$$Y = -14.155x + 18.902 \quad (2)$$

$$R^2 = 0.994$$

En donde $Y = mX + b$; m es la pendiente de la recta y b la ordenada al origen. En este caso el coeficiente de correlación (R^2) es muy cercano a uno, lo que indica que los resultados observados son casi idénticos a los datos esperados presentando un nivel de predicción alto. La figura 5 muestra la tendencia de los datos en su forma logarítmica, utilizando los valores presentados en la tabla III. Se observa que la ecuación de la recta (2) explica la tendencia esperada, muy similar a la observada, traslapándose casi por completo.

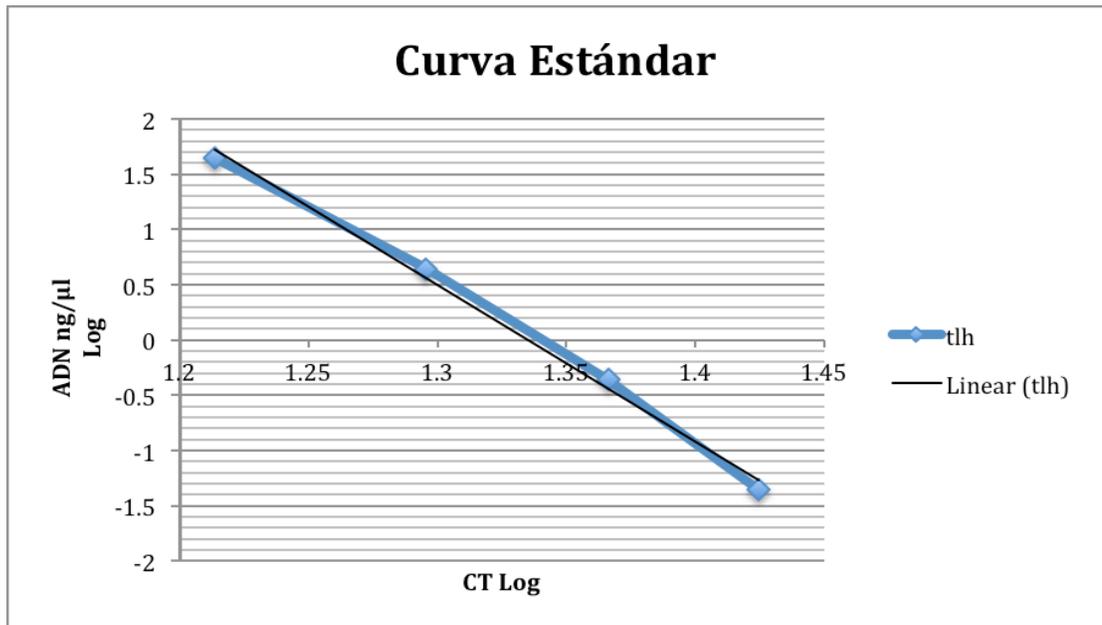


Figura 5. La regresión lineal donde, la línea con rombos son los valores (x,y) de los datos presentados en la tabla III y línea negra representa la ecuación de la recta (2) que mejor se ajusta a la tendencia de los datos observados.

Utilizando la fórmula (1) es posible determinar cuantas copias del genoma de cada especie, están presentes en un ng de ADN y con ello cuantificar el número de bacterias tentativas en cada muestra positiva. Recordando que el genoma de *V. cholerae* es de 4.03 Mb, *V. vulnificus* 5.01 Mb y *V. parahaemolyticus* 5.17 Mb, se obtienen los siguientes valores presentado en la tabla IV.

Tabla IV. Cantidad de copias del genoma de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en 1ng de ADN.

ADN	Especie	Número de copias
1ng	<i>V. cholerae</i>	2.3×10^5
	<i>V. vulnificus</i>	1.85×10^5
	<i>V. parahaemolyticus</i>	1.79×10^5

VI.3. Presencia de *Vibrio* spp.

Las muestras fueron analizadas para identificar la presencia de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* utilizando RT-qPCR. Además de la presencia se logró cuantificar la concentración de ADN perteneciente a los distintos *Vibrio* spp. encontrados por muestra (ecuación 2) y la cantidad teórica de bacterias con la fórmula (1). Los resultados se presentan a continuación divididos por especie. Cabe señalar que para las muestras del muelle Coral Marina y la boya localizada fuera de la bahía, no se logró detectar ninguna de las tres especies propuestas de *Vibrio* spp. (figura 6). Observamos que para ninguno de los iniciadores: *tlh*, *vvhA* y *ompW*, las curvas de amplificación rebasan el umbral de fluorescencia emitida en el eje Y.

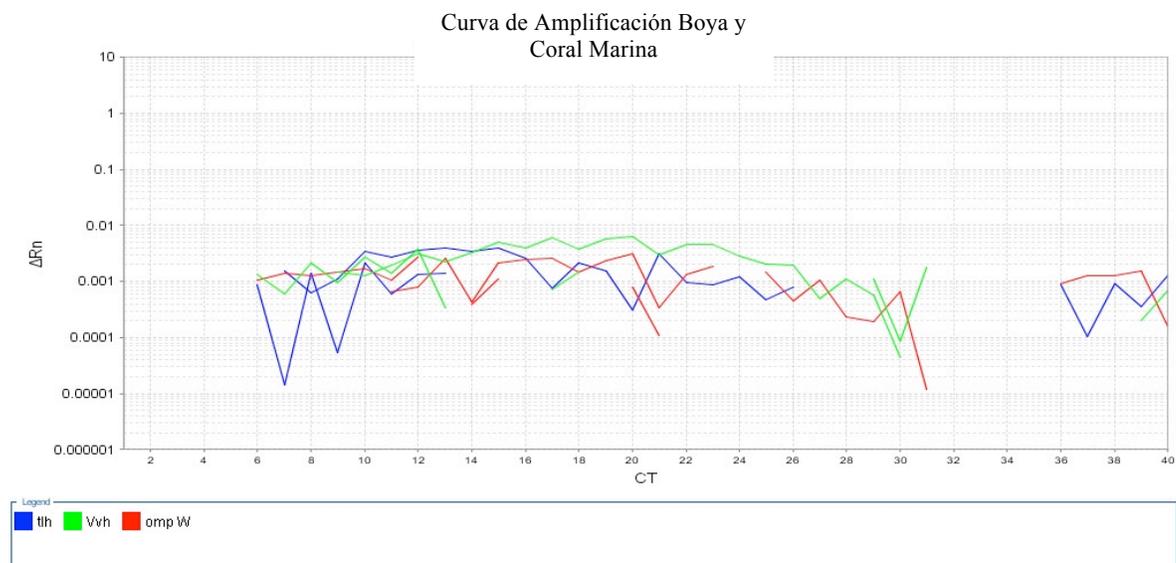


Figura 6. Amplificación negativa para las tres especies en las muestras de Coral Marina y la boya.

VI.3.1. *V. cholerae*

La búsqueda de *V. cholerae* se realizó teniendo como blanco al gen *ompW*. Se procesaron las seis muestras de los muelles (Coral Marina, E.C. Village, Malecón y las tres muestras de EIT #1 y #2a/b), una muestra de la boya y por último las tres muestras de cada barco con procedencia asiática. De todas las muestras analizadas solamente una fue positiva para *V. cholerae*, la muestra tomada del muelle EIT #2a el día que llegó el barco #1 de Yokohama, Japón (figura 7). Los resultados negativos fueron eliminados de la figura para tener mayor claridad en las curvas que resultaron positivas. Como se puede distinguir el control CICESE 67 contiene una concentración de ADN mayor a la muestra ambiental ya que presenta una C_T menor, rebasando el umbral de fluorescencia emitida (eje Y), casi 14 ciclos antes que la muestra ambiental EIT#2a.

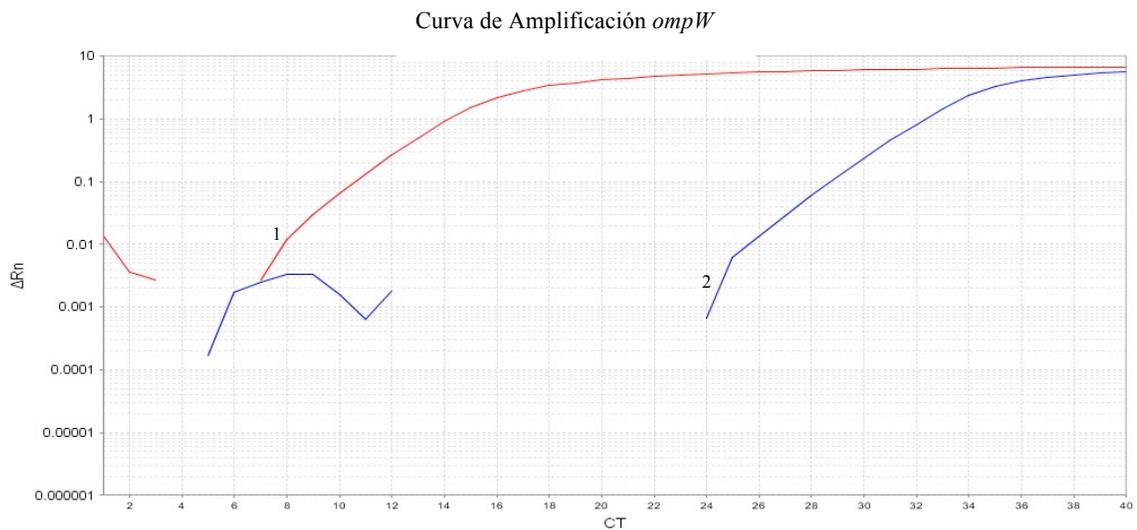


Figura 7. Curva de amplificación para el gen *ompW*, donde la curva 1 representa el control positivo CICESE 67 y la curva 2 la muestra positiva para *V. cholerae* procedente del muelle EIT #2a.

Para conocer la concentración de ADN perteneciente a *V. cholerae* del total de la muestra EIT#2a, se cuantificó en base a la ecuación de la recta (2), sustituyendo el valor logarítmico de su C_T en X para así obtener la concentración de ADN en Y. A ese valor se le multiplico su factor de dilución 1:20 (tabla V).

La concentración total de ADN presente en la muestra EIT#2a (a la llegada del barco #1) fue medida con el espectrofotómetro NanoVue™ el cual dio una lectura de 12.4 ng/μl. Esto significa que 0.09 ng/μl del ADN total corresponde a *V. cholerae*, casi el 1% del ADN de todos los organismos en el homogenizado pertenece a *V. cholerae*. Sin embargo no fue suficiente como para aislar colonias en TCBS®.

Al conocer la cantidad de ADN en ng, perteneciente a *V. cholerae* en la muestra total, es posible determinar con la ecuación (1) a cuantas bacterias tentativas equivale sustituyendo el valor del ADN, que en este caso es de 0.09. Dado que hay 2.3×10^5 copias del genoma en 1 ng y el gen *ompW* es de copia única, la muestra contiene 2.7×10^4 genomas/μl de *V. cholerae* (tabla V). Que en este caso corresponde a 0.7% de la muestra total de ADN.

Tabla V. Concentración de ADN positivo para *ompW* en base a su C_T multiplicado por el factor de dilución y e porcentaje que representa en la muestra total.

Muestra	C_T	ADN ng/μl	Copias genoma	% <i>V. cholerae</i>
EIT #2a	28.55	0.09	2.7×10^4	0.7

Con la muestra positiva para *V. cholerae* (EIT#2a) se continuó el análisis ahora para la búsqueda del gen patógeno *ctxA* tanto con los iniciadores de Hoshino *et al.* (1998) y Nandi *et al.* (2000), así mismo para la toxina Cholix A (Prudy *et al.* 2010). La muestra resultó negativa para *ctxA* pero positiva para Cholix A, en la figura 8 se puede observar la expresión positiva de Cholix A en comparación con la expresión de la cepa control CICESE 67, al igual que con el gen *ompW* el control expresa con un menor número de ciclos, sin embargo, resulta positiva para la toxina con un C_T perfectamente congruente con la cantidad total de *V. cholerae* detectado, resultando en un C_T mayor lo que implica menor concentración. Además se realizó el RT-qPCR para determinar si se pertenecía al serogrupo O1 ú O139. Dado que dio negativo para ambos serogrupos, la cepa o cepas de *V. choleare* encontradas son no-O1/no-O139.

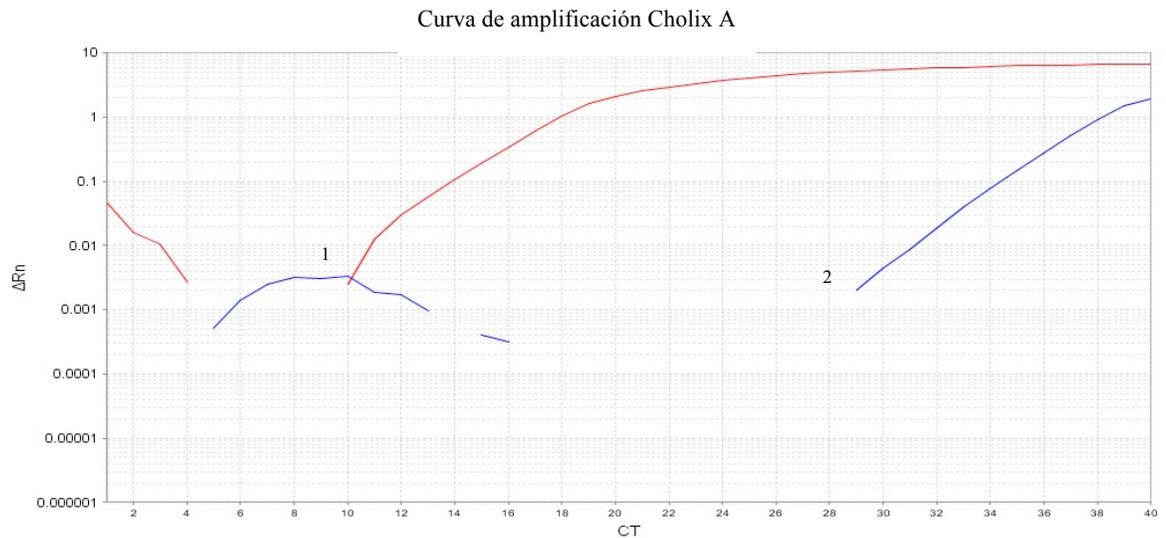


Figura 8. Curva de amplificación para el gen Cholix A donde la curva 1 representa el control positivo CICESE 67 y la curva 2 la muestra positiva para la toxina en el muelle EIT #2a.

De la misma manera en la que se cuantificó la concentración de ADN perteneciente a *V. cholerae* con base a la ecuación (2), se realizó ahora para el iniciador Cholix A, sustituyendo en X su valor C_T logarítmico y después multiplicando el resultado en Y por el factor de dilución (tabla VI). Observamos que es aproximadamente un orden de magnitud menor a la concentración total de *V. cholerae* lo que representa en porcentaje 7.7% de toda la concentración de ADN positiva para *ompW*.

Tabla VI. Concentración de ADN para Cholix A en base a su C_T . El porcentaje que representa de acuerdo con la concentración positiva para *V. cholerae* y las copias de su genoma que representa.

Muestra	C_T	ADN ng/ μ l	% Cholix A
EIT #2a	34.10	0.007	7.7

VI.3.2. *V. vulnificus*

Las seis muestras de los muelles (Coral Marina, E.C. Village, Malecón y las tres muestras de EIT 1 y 2), de la boya y las tres muestras de cada barco asiático fueron al igual que para *V. cholerae*, analizadas con el fin de identificar la

presencia de *V. vulnificus* utilizando los iniciadores *vvhA* (Gómez-Gil, publicación en proceso). Sin embargo, ninguna de ellas dio resultados positivos.

VI.3.3. *V. parahaemolyticus*

Las diez muestras de bioincrustaciones entre los muelles, barcos y la boya, se sometieron a un nuevo RT-qPCR para identificar ahora a *V. parahaemolyticus*. En esta ocasión todas las muestras resultaron positivas excepto aquellas procedentes del muelle Coral Marina y la boya localizada fuera de la bahía. El gen *tlh* fue detectado en ocho de las muestras procesadas. *V. parahaemolyticus* fue la bacteria con mayor presencia de las tres especies, siendo positiva en 80% de las bioincrustaciones analizadas. Podemos observar que se presentan con diferentes valores C_T , lo que indica diferencia en las concentraciones de ADN *tlh+*, a lo largo de la zona de muestreo. Solamente la muestra E. C. Village y el Barco #2 con procedencia de Busan, Corea del Sur presentan casi el mismo C_T , razón por la cual sus curvas de amplificación están traslapadas. Entre la muestra con menor C_T (EIT #2a) y la de mayor C_T (Barco #1 de Yokohama, Japón) existe una diferencia de once ciclos (figura 9).

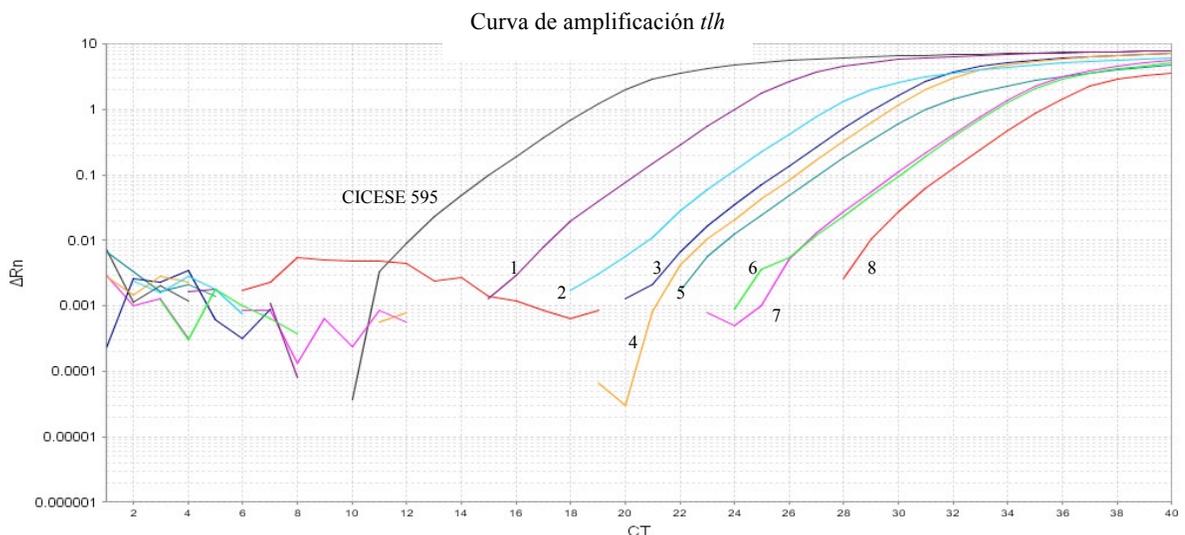


Figura 9. Curvas de amplificación para el iniciador *tlh*, donde se observan las 8 muestras positivas y el control CICESE 595. (1) EIT #2a, (2) Barco #3 Fukuyama, Japón, (3) EIT #1, (4) EIT #2b, (5) Malecón, (6) Barco #2 Busan, Corea del Sur, (7) E.C. Village y (8) Barco #1 Yokohama, Japón.

Así como con todas las muestras anteriores la concentración de ADN para *V. parahaemolyticus* fue calculada con la ecuación (2) sustituyendo el valor C_T en X y multiplicando el valor resultante en Y por el factor de dilución, entre la cantidad de ADN utilizado en le RT-qPCR(4.4 μ l). La concentración de ADN ng/ μ l, que resultó positiva para *V. parahaemolyticus* en cada una de las muestras, se calculó el número de copias de su genoma que representa utilizando la ecuación (1), datos que se reflejan en la tabla VII. La cantidad de bacterias teoricas varía desde 1430/ μ l sobre el casco del Barco #1 hasta 430,000/ μ l en la muestra del muelle EIT #2a. La tabla se organizó de tal manera que los barcos asiáticos estuvieran arriba del muelle que se muestreo a su llegada, y por último los dos muelles donde no se analizaron los barcos que ahí atracan.

Tabla VII. Concentración de ADN con respecto al valor C_T obtenido con el iniciador *tlh* para la identificación de *V. parahaemolyticus* y el número de copias del genoma que representa.

Muestra	C_T	ADN ng/ μ l	Copias del Genoma
Barco #1 Yokohama, Japón	33.84	0.008	1.43x10 ³
EIT #2a	22.61	2.4	4.3x10 ⁵
Barco #2 Busan, Corea del Sur	32.20	0.016	2.87x10 ³
EIT #2b	28.42	0.09	1.61x10 ⁴
Barco #3 Fukuyama, Japón	25.98	0.34	6.09x10 ⁴
EIT #1	27.73	0.13	2.33x10 ⁴
Malecón	29.31	0.06	1.08x10 ⁴
E.C. Village	32.04	0.017	3.05x10 ³

La concentración inicial de ADN de todas las muestras fue tomada con el espectrofotómetro NanoVue™. Se realizó una comparación porcentual con la cantidad total de ADN en relación a la concentración positiva de *V. parahaemolyticus* y se observa que solamente dos muestras rebasan el umbral del 1%, la muestra (2) del muelle EIT#2a y la (5) del Barco #3. En los dos casos aunque es mucho más notorio el de la muestra (2) con más de 19% positiva para

tlh (figura 10); se lograron asilar colonias, situación que no se había logrado con ninguna otra muestra incluyendo la que fue positiva para *V. cholerae* que al igual que el resto de las muestras positivas para *V. parahaemolyticus* no superó el 1% de la concentración total de la muestra.

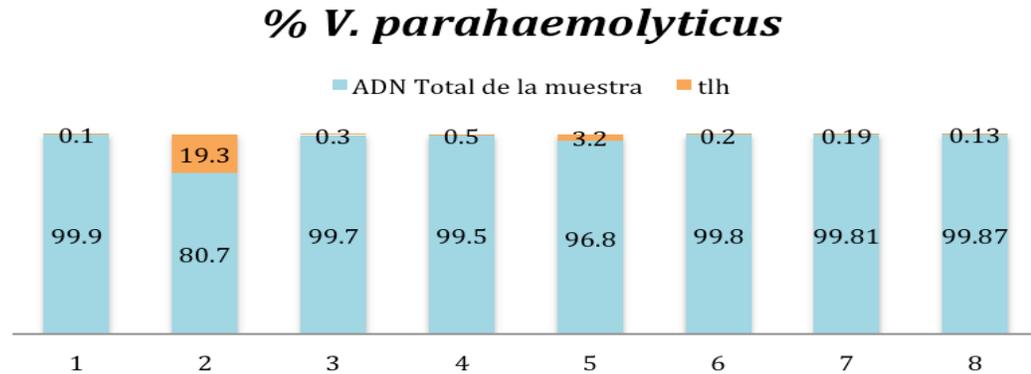


Figura 10. Porcentajes de la cantidad de ADN correspondiente a *V. parahaemolyticus* presente en la muestras ambientales: (1) Barco #1, (2) EIT #2a, (3) Barco #2, (4) EIT #2b, (5) Barco #3, (6) EIT #1, (7) Malecón, (8) E.C. Village.

Las ocho muestras positivas para *tlh* fueron nuevamente analizadas ahora para los genes codificantes de las hemolisinas causantes de la virulencia en *V. parahaemolyticus* *trh* y *tdh*. En el primer caso para el gen *trh*, sólo dos de las muestras resultaron positivas, la muestra del Barco #3 y el muelle EIT#1 donde atracó este barco y que fueron muestreados el mismo día (figura 11).

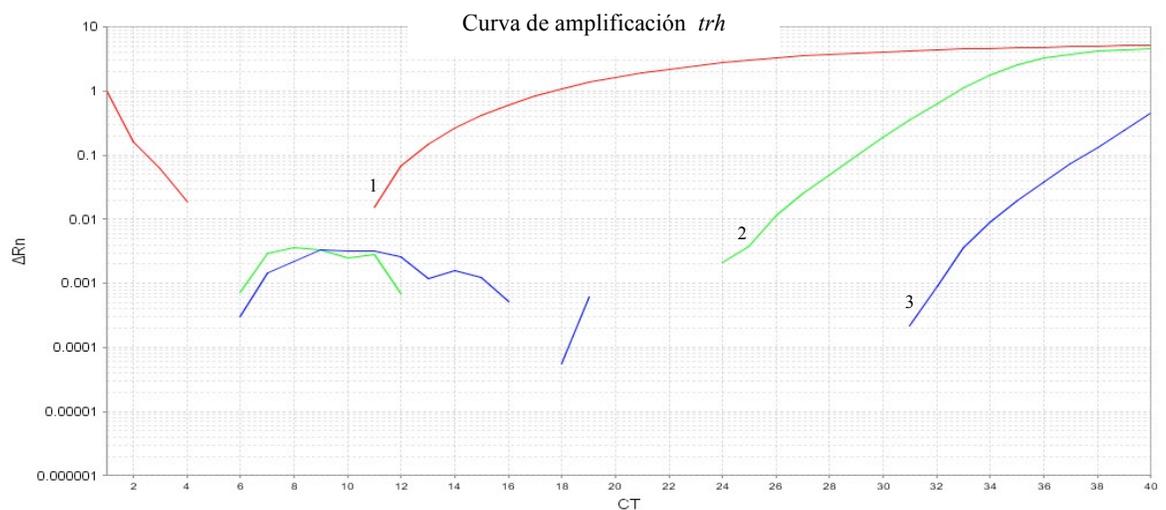


Figura 11. Amplificación de las muestras positivas para *trh*, (1) CICESE 596, (2) EIT#1, (3) Barco #3.

Las muestras positivas para *trh*, aunque tomadas el mismo día, presentan curvas de amplificación distintas (figura 10), la muestra del muelle presenta un valor de C_T menor y por lo tanto mayor concentración de ADN *trh+* que el barco. Resultados que podemos analizar en la tabla VIII, al aplicar la ecuación de la recta (2) y obtener la concentración de ADN en ng que transformada en número de copias del genoma de *V. parahaemolyticus*, con la ecuación (1) nos indica una diferencia de una orden de magnitud entre una muestra y otra.

Tabla VIII. Muestras positivas para *trh*, el valor C_T del RT-qPCR y la concentración de ADN correspondiente a la regresión lineal.

Muestra	C_T	ADN ng/ μ l	Copias del Genoma
Barco #3 Fukuyama, Japón	37.10	0.002	3.58×10^2
EIT #1	28.59	0.08	1.43×10^4

Tanto las muestras anteriores positivas para *trh*, junto con las otras seis que resultaron positivas para *V. parahaemolyticus*, también lo fueron para el gen de la hemolisina directa *tdh* (figura 12), siendo las tres primeras muestras ambientales en alcanzar la asíntota, las mismas que lo hicieron para el gen *tth*: la muestra EIT #2a, el Barco #3 y el muelle EIT#1.

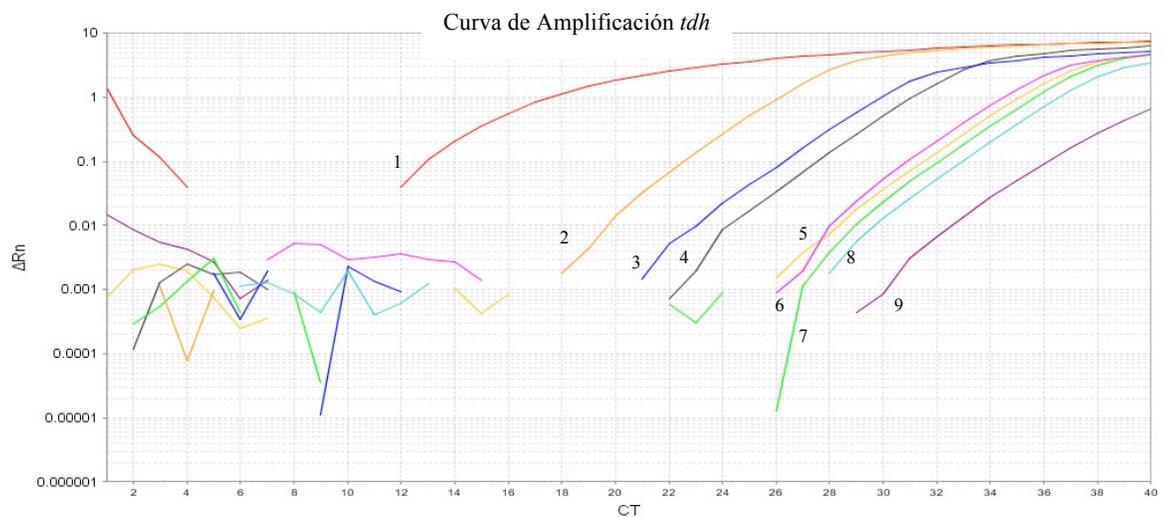


Figura 12. Amplificación de las muestras positivas para *tdh*, (1) control CICESE 596, (2) EIT#2a, (3) Barco #3, (4) EIT #1, (5) Barco #1, (6) E.C. Village, (7) EIT #2b, (8) Barco #2, (9) Malecón.

En la tabla IX se puede observar la concentración de ADN que corresponde a *tdh* con respecto al valor C_T de cada muestra. Al igual que para *trh* las muestras se colocaron en el orden de llegada de los barcos a su muelle correspondiente y las últimas dos muestras correspondiente a las localidades donde no fueron analizados barcos, cada una con su número de copias de genoma a partir de la ecuación (1).

Tabla IX. Muestras positivas para *tdh*, el valor C_T indicando la concentración de ADN correspondiente a la regresión lineal.

Muestra	C_T	ADN ng/μl	Copias del Genoma
Barco #1 Yokohama, Japón	33.49	0.008	1.43×10^3
EIT #2a	25.15	0.5	8.96×10^4
Barco #2 Busan, Corea del Sur	35.58	0.004	7.17×10^2
EIT #2b	34.69	0.005	8.96×10^2
Barco #3 Fukuyama, Japón	28.90	0.07	1.25×10^4
EIT #1	30.12	0.04	7.17×10^3
Malecón	39.57	0.0008	1.43×10^2
E.C. Village	34.12	0.007	1.25×10^3

La concentración de ADN para *tdh* junto con aquellas positivas para *trh* fueron comparadas con el porcentaje de *V. parahaemolyticus* positivo total encontrado en las muestras ambientales como se observa muestra en barras porcentuales (figura 13). Solamente dos muestras además de ser positivas para *V. parahaemolyticus tdh+* también lo son para *trh*, la del Barco #3 y el muelle donde atracó EIT #1. Se observa que la primera muestra correspondiente al Barco #1 de Yokohama, Japón presenta un 100% de *V. parahaemolyticus tdh+*, sin embargo, la cantidad inicial de la especie que no alcanzó más del 1% de la muestra lo que corresponde a 1.43×10^3 copias del genoma total y no se logró aislar colonias proveniente de este barco.

% *tdh* y *trh*

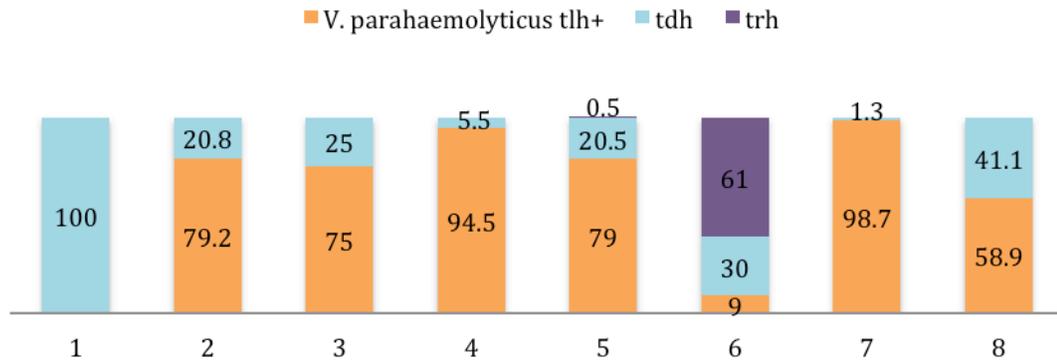


Figura 13. Porcentaje de *tdh* y *trh* presente con respecto a la cantidad total que dio positiva para *V. parahaemolyticus* en las ocho muestras ambientales (1) Barco #1, (2) EIT #2a, (3) Barco #2, (4) EIT#2b, (5) Barco #3, (6) EIT #1, (7) Malecón, (8) E.C. Village.

Por ultimo se realizó la prueba para identificar si de las ocho muestras *t/h+* alguna presentaba variante del clon pandémico O3:K6 al amplificar el fragmento correspondiente al gen *orf8*. Solamente dos fueron positivas la del Barco #3 y la del muelle EIT #2a (figura 14); muestras que fueron tomadas sobre el barco con procedencia de Fukuyama, Japón y sobre el muelle a la llegada del Barco #1 de Yokohama, Japón.



Figura 14. RT-qPCR para *orf8*: (1) control CICESE 595, (2) Barco #3, (3) EIT #2a.

Para calcular la concentración de ADN positivo para *orf8* al igual que con las muestras anteriores se sustituyeron los valores C_T en la ecuación de la recta (2). Los valores de ADN se utilizaron para conocer el número de copias del genoma al cual corresponde y se obtuvieron los siguientes valores de la tabla X. Del Barco #3 que presentó una mayor cantidad de bacterias tentativas *orf8+*, fue posible el asilamiento de una colonia pero no así de la muestra del muelle EIT #2a.

Tabla X. Concentración de ADN para las muestras *orf8+* correspondiente a su valor C_T y multiplicado por el factor de dilución.

Muestra	C_T	ADN ng/ μ l	Copias genoma
Barco #3 Fukuyama, Japón	30.61	0.03	5.38×10^3
EIT #2a	36.01	0.003	5.38×10^2

Para que una cepa de *V. parahaemolyticus* sea *orf8+* es necesario que también sea *tdh+* por lo tanto sacando, el porcentaje de clones pandémicos presentes en las dos muestras *tlh+* y *tdh+* se obtiene la siguiente gráfica en la figura 15, donde la concentración de ADN *orf8+* tiene 50% de incidencia en la muestra del Barco #3 y solo el 0.5 en la muestra de EIT #2a.

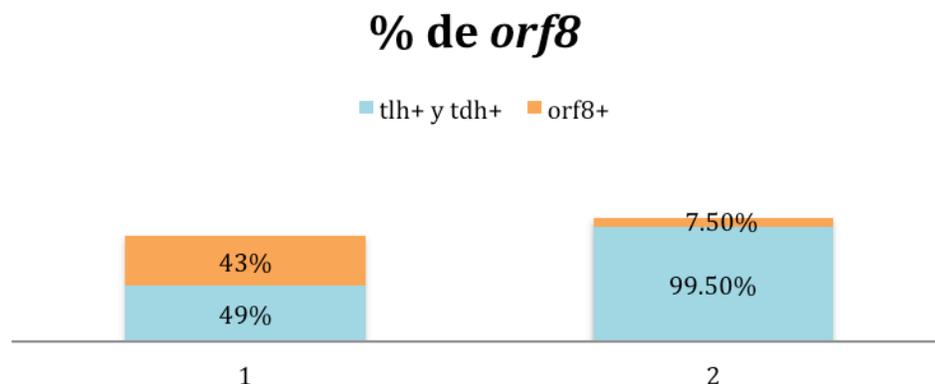


Figura 15. Porcentaje de *orf8+* presente en las muestras son positivas para *V. parahaemolyticus* además de ser positiva para el gen de la hemolisina directa *tdh*. (1) Barco #3, (2) EIT #2a.

Concluidas las pruebas para la identificación de *Vibrio* spp. al encontrar solamente dos de las especies propuestas en la investigación *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, aquellas muestras de las cuales fue posible aislar colonias continuaron en el análisis.

VI.4. Aislamiento de Colonias

El paso final para la obtención de resultados a partir de las diez muestras, fue el tratar de aislar las cepas de *Vibrio* spp. patógenas identificadas con el RT-qPCR. A todos los tubos con la dilución 1:10 de bioincrustación con medio APA se les tomó una asada de la parte superior y se pasó en medio TCBS® para separar las colonias verdes (*V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) de las amarillas (*V. cholerae*). Si bien se logró obtener diez colonias verdes y 10 amarillas de cada muestra al momento de verificar el aislamiento a nivel especie en CHROMagar®, solamente se había logrado aislar colonias de *V. parahaemolyticus* (figura 16) provenientes del barco #3 y EIT #2a, si recordamos en la figura 10, estas muestras son las únicas que sobre pasaron el 1% de la concentración total de ADN positivas para *tlh*.

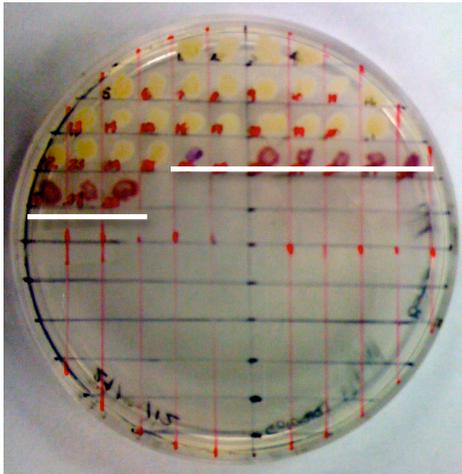


Figura 16. Colonias violetas de *V. parahaemolyticus* aisladas de las muestras Barco #3 y EIT #2a.

De la muestra EIT #2a se logró aislar 20 colonias *tlh*+, *tdh*+ y *trh*- (figura 17) y de la muestra Barco #3 se lograron aislar seis colonias *tlh*+, *tdh*+, *trh*- y una colonia que fue también *orf8*+ (figura 18).

En la figura 17 se eliminaron los resultados negativos de *trh* y solo se muestran las 20 colonias positivas para *tdh*.

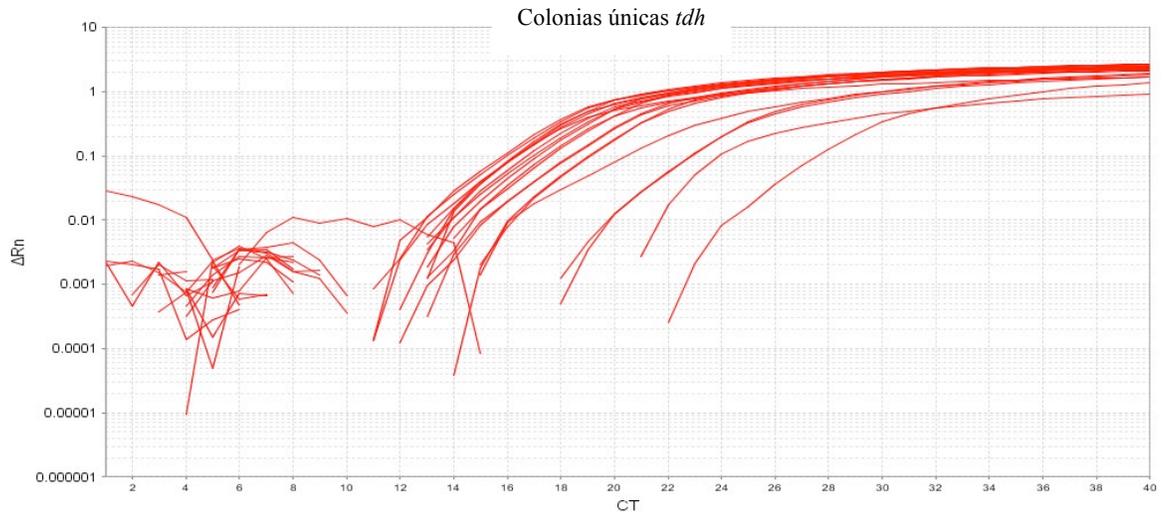


Figura 17. Curvas de amplificación para las 20 colonias aisladas de EIT#2a *V. parahaemolyticus tdh+*.

La única colonia positiva para el gen *orf8* codificante del clon pandémico O3:K6 tomada del Barco #3 se muestra en la figura 18. Se observan las curvas de amplificación positivas para *tdh* y *orf8* así como la negativa para *trh*; características típicas de este clon.



Figura 18. Curvas de amplificación para la cepa pandémica #13 (1) *tdh+*, (2) *orf8+*, (3) *trh-*.

Capítulo VII. Discusión

De acuerdo a lo estipulado en la metodología, se tomaron muestras de bioincrustaciones sobre tres barcos con procedencia asiática, los muelles donde estos barcos atracaron, otros dos muelles donde no llegan barcos mercantes pero localizados dentro de la rada portuaria, un tercer muelle (Coral Marina) localizado a 3.5 km fuera de la rada pero dentro de la bahía Todos los Santos, y por último una boya localizada fuera de la bahía con el objetivo de ser el control negativo, lo más lejos posible de la influencia de barcos mercantes (figura 2). Tanto la muestra de la boya como la de Coral Marina mostraron resultados negativos para *V. cholerae*, *V. vulnificus*, y *V. parahaemolyticus* (figura 6). Caso contrario de las muestras tomadas en lugares cercanos o asociados a los barcos mercantes, donde no sólo se detectó su presencia, sino que se encontraron sus variantes virulentas.

En el caso de *V. vulnificus*, todas las muestras fueron negativas al tratar de identificarlo en el homogenizado. Existen dos factores importantes que afectan su presencia, la temperatura y la salinidad. Se considera que la temperatura fue el factor principal limitando su aparición en las costas de Ensenada. Si bien esta bacteria crece a temperaturas tan bajas como 13°C, sus números permanecen mínimos en temperaturas menores a 20°C y su concentración más alta ocurre en aguas de 20°C a 30°C. (Cook, 1994; Motes *et al.* 1998).

Según la Administración Atmosférica y Oceánica Nacional de los Estados Unidos de Norte América (NOAA, 2009), las costas de Ensenada tienen un promedio anual, de temperatura oceánica superficial entre 15-18°C, mientras tanto en Japón se presenta un promedio anual de entre 16-26°C. Las temperaturas más cálidas están localizadas al sur-oeste del país, justo donde ha existido mayor número de casos reportados de intoxicación por *V. vulnificus* (Inoue *et al.* 2008). Los barcos muestreados de Japón provenían de localidades más al norte (Yokohama y Fukuyama) donde la temperatura superficial es de 20°C y en Corea del Sur, sitio

de origen del tercer barco donde la temperatura es aún menor, con un promedio anual de 17°C. Por este motivo es probable que las bioincrustaciones de estos barcos mercantes estuvieran libres de *V. vulnificus* o con números muy bajos y por lo tanto indetectable a la hora del análisis.

V. cholerae se detectó en una muestra, de las diez analizadas. Es una bacteria que soporta rangos muy amplios de temperatura (15-45°C), pH (6-10) y salinidades cercanas a cero (Kaper *et al.* 1995). Es capaz de persistir en el ambiente acuático por largos periodos de tiempo utilizando distintas estrategias, como adherirse a sustratos bióticos y abióticos, o entrar en estado VBNC (Hood y Winter, 1997; Colwell y Huq, 1994). Debido a todas estas características y reportes previos como el de Ruiz *et al.* (2000) y el de Shikuma y Hadfield (2010), donde detectaron *V. cholerae* tanto en agua de lastre como en bioincrustaciones de barcos, se esperaba encontrar esta bacteria en la mayoría de las muestras analizadas. Sin embargo, no fue el caso, la única muestra que resultó positiva con *ompW* para *V. cholerae*, fue tomada el día que atracó el Barco #1 de Yokohama, Japón en las bioincrustaciones del muelle EIT#2a (figura 7). No presentaba la toxina ctx pero sí se detectó a la toxina Cholix A (figura 8). También resultó negativa para los dos serogrupos pandémicos O1 y O139. McCarthy y Khambaty (1994), reportaron la presencia de *V. cholerae* O1, Inaba, El Tor en el agua de lastre de barcos mercantes, por lo que su dispersión, tanto en agua de lastre como sobre las bioincrustaciones sea probable.

En estudios previos efectuados en CICESE (Portillo-López y Lizárraga-Partida, 1997) se pudo identificar la presencia *Vibrio cholerae* no O1 en agua superficial, sedimento y en muestras de plancton, pero no en los moluscos bivalvos analizados. Estos resultados indican que *V. cholerae* patógeno, pudiera implantarse en la bahía, ya que no hay factores fisicoquímicos que la limiten. Sin embargo, debido a que existen varias bacterias marinas capaces de impedir el crecimiento de *V. cholerae*, mediante competencia (Long *et al.* 2005), es probable que no le sea posible proliferar por lo que su concentración fue de 27 mil copias

de su genoma por μl de muestra procesada. Resultado similar a lo encontrado por Shikuma y Hadfield (2010), donde se encontró más de 3 mil copias de su genoma formando biofilms y sólo 156 en la columna de agua.

V. parahaemolyticus (Vp) se detectó en ocho de las diez muestras analizadas (figura 9). Las únicas muestras que resultaron negativas son las dos ubicadas fuera de la rada como se expuso anteriormente, el muelle Coral Marina y la boya (figura 6). En años recientes los brotes originados por Vp han incrementado en varios países asiáticos, específicamente en Japón, donde de 1996 al 2001 aumentaron los casos en un 75% en enfermedades relacionadas con el clon pandémico O3:K6 (Yamazaki *et al.* 2003). Según el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, de Japón del 1999 al 2005 hubo 25, 211 casos reportados (MHLW, 2009). Las muestras que presentaron una concentración mayor de ADN de esta bacteria, provenían tanto del muelle donde atracaron los barcos japoneses (EIT #2a), como sobre el biofilm del casco mismo (Barco #3). Según su concentración de ADN ng/ μl , el número de copias de genoma corresponde en teoría a menos de medio millón de bacterias por μl en la muestra procesada del muelle EIT #2a, y en el caso del Barco #3, que provenía de Fukuyama, Japón, con aproximadamente 60 mil copias de su genoma (tabla VII). Drake *et al.* (2007) ha demostrado que aproximadamente 3.9×10^{18} células bacterianas son descargadas anualmente a través del agua de lastre en Chesapeake Bay debido al biofilm en los tanques, que comparado con nuestros resultados aproximadamente un tercio de ese número se encontró de *V. parahaemolyticus* en el muelle EIT #2a.

Considerando estudios previos en humanos voluntarios Sanyal y Sen (1974), reportaron que se requiere 2×10^5 - 3×10^7 CFU *tdh+* para generar gastroenteritis. En nuestra investigación la mayor cantidad de copias de genoma *tdh+*, fue en la muestra procesada del muelle EIT #2a utilizado en el RT-qPCR, alcanzando 8.96×10^4 , en cambio el Barco #1 de Yokohama, Japón, no se presentó en grandes cantidades con sólo 1430 copias de su genoma por μl (tabla VII), probablemente

debido a que su casco se encontraba casi sin bioincrustaciones. Se nos informó al momento del muestreo, que había sido limpiado y pintado hacia tan sólo cuatro meses antes de llegar a Ensenada. Sin embargo, el día que atracó se encontró una alta concentración de Vp en las bioincrustaciones en el muelle (EIT #2a). Es probable que al momento de atracar el barco, el casco rozó contra el muelle, ocasionando la transferencia de Vp *tdh+* hacia los organismos localizados en las bioincrustaciones del muelle. En el resto de las muestras si bien se identificó la presencia de *V. parahaemolyticus*, la concentración era menor y no se lograron aislar colonias. Nuestros resultados indican que se requiere alrededor de un 3.2% de concentración de la bacteria con respecto al total de ADN para poder aislar las colonias en las muestras ambientales. En las muestras donde si se logró aislar colonias, fueron aquellas donde se presentó una mayor concentración de ADN de Vp. La muestra EIT#2a, presentó un porcentaje para *V. parahaemolyticus* de casi 20% con respecto al total de ADN en la muestra y se logró aislar 20 colonias *tdh+*. En la muestra del Barco #3 con un porcentaje del 3.2%, se lograron aislar seis colonias *tdh+*, de las cuales una también fue *orf8+*. En el resto de las muestras si bien se identificó la presencia de Vp, la concentración de ADN fue menor, ni siquiera rebasando el 1% del total, y no se lograron aislar colonias.

También se observó que entre más alejado de la zona con incidencia de barcos asiáticos, menor fue la concentración de Vp (figura 9), otra fuerte indicación del origen de su detección. Es importante señalar que el riesgo para el establecimiento de especies exóticas a cualquier lado del mismo océano, dentro del mismo hemisferio es bastante común, ya que organismos que se mueven dentro del mismo hemisferio, probablemente no sufran de un estrés fisiológico importante comprado con el movimiento entre hemisferios (Minchin y Gollasch, 2003). Lo que resulta cierto al momento de hablar de Vp, bacteria común en las costas Japonesas que se creía ausente en las costas de Baja California, Lo anterior se refuerza con un estudio sistemático efectuado en CICESE (M. en C. Abraham Guerrero, comunicación personal), en donde después de muestrear

durante 2 años (2010-2012) ostiones cultivados en el sur de la Bahía de Todos los Santos, nunca se detectó la presencia de Vp patogénico.

En términos generales, *V. parahaemolyticus* tuvo mayor presencia en muestras donde estaban involucrados barcos japoneses, en Corea del Sur también se han reportado casos de intoxicación a causa de Vp (Nait *et al.* 2007), sin embargo en esta investigación sólo se logró identificarlo a una concentración muy baja y casi inexistente. Si se analiza la presencia de las hemolisinas, tanto la directa (tdh) como la relacionada (trh) en las muestras, resulta evidente que aquellas provenientes de los barcos japoneses, o los muelles donde y cuando estos barcos atracaron, tienen el mayor porcentaje de incidencia para ambos factores de virulencia que cualquier otra muestra. Es de especial interés la muestra del Barco #1, que a pesar de no haber aislado colonias, porcentualmente todas presentaron el gen *tdh* (figura 13). Según estudios previos, la proporción de cepas virulentas, específicamente en el caso de *V. parahaemolyticus*, son muy bajas en el ambiente costero natural (DePaola *et al.* 1990; Hara-Kudo *et al.* 2003). Resultado que no se cumplió en varias muestras donde la proporción alcanzó hasta un 100% y en otros más de 60% de *trh* en proporción a *tdh* (figura 13). De acuerdo con Gollasch (2002), aproximadamente 38% de especies no-nativas fueron encontradas en el agua de lastre, 57% en las muestras de sedimento y 96% en el casco. Si bien, estos resultados son para macroorganismos, indica que sobre el casco de los barcos hay una gran variedad de biota exótica que proveen un hábitat y refugio a diversos microorganismos, en este caso particular un posible reservorio para variantes patógenas.

En el caso del clon *orf8+* se identificó en muestras que tuvieron contacto con regiones japonesas, lugar donde hasta el momento sigue siendo un problema de salud transmitida por alimentos contaminados (Yamazaki *et al.* 2003). En México ya han sido reportados casos de intoxicación por *V. parahaemolyticus* O3:K6 en Mazatlán, Sinaloa (Cabanillas-Beltrán *et al.* 2006). Dato importante de analizar

con mayor profundidad, ya que en la figura 13 (porcentajes de *tdh* y *trh*), se observa que la barra número ocho que contiene los resultados de la muestra de E.C. Village lugar donde llegan barcos tipo crucero que viajan a lo largo del pacífico sur, en ocasiones llegando a puertos tales como el de Mazatlán y Puerto Vallarta, también presenta un porcentaje alto de *V. parahaemolyticus tdh+* en comparación a Vp no patogénico.

Todos los resultados presentados, desde la identificación de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* a nivel especie, hasta el aislamiento de colonias patógenas como la *orf8+*, causante de pandemias, apuntan a que las bioincrustaciones sobre los muelles de atraque y las de los barcos mercantes son un reservorio y un vector de transmisión de vibrios patógenos. Ya que nuestros resultados muestran una mayor concentración de cepas virulentas en relación a las muestras tomadas en los barcos asiáticos y cruceros turísticos, provenientes de áreas que presentan o han presentado brotes epidémicos de Vp. También se constató que las bioincrustaciones son un vector de transferencia para estos vibrios, rompiendo barreras como temperatura, corrientes y depredación, haciéndolas llegar a sitios donde nunca antes se habían documentado.

Capítulo VIII. Conclusión

De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, se constató que las bioincrustaciones marinas son un reservorio de vibrios patógenos y que aquellas sobre los cascos de barcos representan un vector de diseminación inadvertido. La bacteria *V. vulnificus* no se identificó en los homogenizados de las muestras, sin embargo se detectó *V. cholerae ctxA-*, Cholix A+, no-O1 y no-O139, en una muestra de bioincrustación tomada sobre el muelle donde atracan barcos mercantes internacionales. También se identificaron cepas de *V. parahaemolyticus trh+*, *tdh+* y una *orf8+*, tanto en las muestras procedentes de los muelles, como sobre el casco de un barco mercante japonés. En dos ocasiones se lograron aislar colonias de *Vp tdh+* y una *orf8+*, donde las proporciones de cepas virulentas a no virulentas en varias muestras alcanzó un porcentajes de 20% hasta 100%, situación poco común en aguas naturales costeras.

Aunque es poco probable que la dispersión de todas las especies invasoras pueda ser controlada o mitigada, un entendimiento completo de los mecanismos de transporte y sus reservorios naturales, pueden favorecer un cambio significativo en su propagación (Minchin, 2006). Con la mejora de normas preventivas en distintos sectores, se puede lograr mantener y rescatar ambientes naturales, aminorando el impacto no sólo para las especies nativas sino su posible efecto nocivo a la salud y economía mundial.

Capítulo IX. Recomendaciones

En base a los resultados presentados sería recomendable continuar con el análisis a profundidad de todas las cepas aisladas, evaluando sus subtipos con una electroforesis en gel de campos pulsados. Técnica que ha permitido una comparación del ADN de varias especies de bacterias patógenas, y con esto obtener un acervo de información con respecto al monitoreo de la diseminación global de cepas pandémicas existentes y emergentes.

Se propone continuar con el análisis de las bioincrustaciones en otros puertos Mexicanos que presenten alta tasa de tráfico marino internacional, como medida preventiva tanto en el ámbito ambiental, como en la economía y la salud, evitando la invasión de especies nocivas. Por último se sugiere la implementación de estrategias y normas preventivas en el comercio marítimo con el fin de prevenir y no mitigar.

Referencias Bibliográficas

- Apte, S., Holland, B., Godwin, L. & Gardner, J. (2000). Jumping ship: a stepping stone event mediating transfer of non-indigenous species via a potentially unsuitable environment. *Biological Invasions* 2: 75-79.
- Bej, A., Patterson, D., Brasher, C., Vickery, M., Jones, D. & Kaysner, C. (1999). Detection of total and hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods* 36: 215-225.
- Bhunja, A. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens*. New York, NY, Springer.
- Cabanillas-Beltrán, H., Llausás-Magaña, E., Romero R., Espinoza, A., García-Gasca, A., Nishibuchi, M., Ishibashi, M. y Gómez-Gil, B. (2006). Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiol. Lett.* 265: 76-80.
- Carlton, JT. (1985). Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast water. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 23: 313–374.
- Carlton, JT. (1989). Man's role in changing the face of the ocean: biological invasions and implications for conservation of near shore environments. *Conservation Biology* 3: 265–273.
- Carlton, JT. (1996). Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. *Conservation Biology* 78: 97–106.
- Carlton, JT., Reid, D. & van Leeuwen, H. (1995). Shipping study: the role of shipping in the introduction of non-indigenous aquatic organisms to the coastal waters of the United States (other than the Great Lakes) and an analysis of control options. *US Coast Guard, Connecticut*. Department of Transportation, Washington, DC.
- Carman, K. & Dobbs, F. (1997). Epibiotic microorganisms on copepods and other aquatic crustaceans. *Microscopy Research and Technique* 37: 116–135.
- Chacón, L., Barrantes, K., García, C. y Achí, R. (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 30:18-23.
- Colwell, R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274: 2031–2025.

- Colwell, R., & Huq, A. (1994). Vibrios in the environment: viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. In: I.K., Blake, P.A., & Olsvik. *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*. Washington, DC. ASM Press.
- Cook, D. (1994). Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in postharvest Gulf coast shellstock oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3483–3484.
- Costerton, J., Stewart, P. & Greenberg, E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.
- Coutts, A., & Dodgshun, T. (2007). The nature and extent of fouling in vessel sea-chests: a protected mechanism for marine bioinvasions. *Marine Pollution Bulletin* 54: 875–886.
- Coutts, A., Moore, K., & Hewitt, C. (2003). Ships' sea-chests: an overlooked transfer mechanism for non-indigenous marine species? *Marine Pollution Bulletin* 46: 1510–1513.
- Coutts, A., & Taylor, M. (2004). A preliminary investigation of biosecurity risks associated with biofouling of merchant vessels in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 38: 215–229.
- Cranfield, H., Gordon, D., Willan, R., Marshall, B., Battershill, C., Francis, M., Nelson, W., Glasby, C., & Read, G. (1998). *Adventive marine species in New Zealand*. NIWA Technical Report.
- Decho, A. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20: 1257–1273.
- Deming, J. (1997). Unusual or extreme high-pressure marine environments. In: Hurst C., Knudsen G., McInerney M., Stetzenbach L., & Walter M. *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, DC.
- DePaola, A., Hopkins, L., Peeler, J., Wentz, B., & McPhearson, R. (1990). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal water and oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2299–2302.
- Donlan, R. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*. 8: 881-890.
- Drake, L., Doblin, M., & Dobbs, F. (2007). Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilms. *Marine Pollution Bulletin* 55: 333–341.

- Elton, C. (1958). *The ecology of invasions by animals and plants*. Methuen & Co., London.
- Faruque, S., Islam, M., Ahmad, Q., Biswas, K., Faruque, A., Nair, G., Sack, R., Sack, D., & Mekalanos, J. (2006). An Improved Technique for Isolation of Environmental *Vibrio cholerae* with Epidemic Potential: Monitoring the Emergence of a Multiple Antibiotic Resistant Epidemic Strain in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases* 193: 1029–36.
- Floerl, O., & Inglis, G. (2005). Starting the invasion pathway: the interaction between source populations and human transport vectors. *Biological Invasions* 7: 589–606.
- Frisch, F., Green, A., & Figuerola, J. (2007). High dispersal capacity of a broad spectrum of aquatic invertebrates via waterbirds. *Aquatic Science* 69: 568–574.
- Fuentes, J. (2012). Determinación de *Vibrio cholerae* Toxigénico en Ostiones Destinados para el Consumo Humano. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.
- Gollasch, S. (2002). The Importance of Ship Hull Fouling as a Vector of Species Introductions into the North Sea. *Biofouling* 18: 105–121.
- Gollasch, S. (2006). Assessment of the introduction potential of aquatic alien species in new environments. In: Koike, F., Clout, M., Kawamichi, M., De Poorter, M., & Iwatsuki, K. *Assessment and Control of Biological Invasion Risks*. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto, Japan y IUCN, Gland, Switzerland.
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2005). Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiology*. 13: 7–10.
- Halpern, M., Senderovich, Y., & Izhaki, I. (2008). Waterflow the missing link in epidemic and pandemic cholera dissemination? *PLoS Pathog* 4 doi: 10.1371/journal.ppat.1000173.
- Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, H., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M., & Kumagai, S. (2003). Prevalence of Pandemic Thermostable Direct Hemolysin-Producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3883-3891.
- Hartung de Capriles, C., Mata-Essayag, S., Abate, T., de Waard, J., Pérez, C., Olaizola, C., Roselló, A., y Colella, M. (2005). Extracción simplificada de ADN en especies de *Candida*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 25: 114-116.

- Heidelberg, J., Eisen, J., Nelson, W., Clayton, R., Gwinn, M., Dodson, R., Haft, D., Hickey, E., Peterson, J., & Umayam, L. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406: 477–483.
- 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.
- Hendersen, K. (2011). Marlin Series of Containers Feeders. Recuperado de: <http://articles.maritimepropulsion.com/?tag=/container-feeders>.
- Hewitt, C., & Campbell, M. (2010). *The relative contribution of vectors to the introduction and translocation of marine invasive species*. Australian Department of Agriculture Fisheries, and Forestry, Commonwealth of Australia.
- Hewitt, C., Campbell, M., Thresher, R., & Martin, R. (1999). *Marine biological invasions of Port Philip Bay, Victoria*. Technical Report No. 20. Centre for Research on Introduced Marine Pests, CSIRO Marine Research, Hobart.
- Hood, M.A., & Winter, P.A. (1997). Attachment of *Vibrio cholerae* under various environmental conditions and to selected substrates. *FEMS Microbiol Ecology* 22: 215–223.
- Hoshino, K., Yamasaki, S., Mukhopadhyay, A., Chakraborty, S., Basu, A., Bhattacharya, S., Nair, G., Shimada, T., & Takeda. (1998). Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 20: 201-207.
- Huq, S., Ali, S., & Rahman, A. (1995). Sea-level rise and Bangladesh: A preliminary analysis. *Journal of Coastal Research* 14: 44-53.
- Hurley, C., Quirke, A., Reen, J., & Boyd, F. (2006). Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics* 7: 104.
- Inoue, Y., Ono, T., Matsui, T., Miyasaka, J., Kinoshita, Y., & Ihn, H. (2008). Epidemiological survey of *Vibrio vulnificus* infection in Japan between 1999 and 2003. *J. Dermatol.* 35: 129-39.
- Islam, M. 1994. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *vibrio cholerae*. *J Diarrhoeal. Dis. Res.* 12: 1987–1994.
- Kaper, J., Morris, J., Jr, & Levine, M. (1995). Cholera. *Clin Microbiol Rev.* 8: 48-86.

- Lee, W., Lee, M., Kim, J., & Park, S. (2001). Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. *J Food Prot.* 64, 899–902.
- Leppäkoski, E., Gollasch, S., & Olenin, S. (2002). *Invasive aquatic species of Europe: distribution, impacts and management*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Lewis, P., Hewitt, C., Riddle, M., & McMinn, A. (2003). Marine introductions in the Southern Ocean: an unrecognized hazard to biodiversity. *Marine Pollution Bulletin* 46: 213–223.
- Long, R., Rowley, D., Zamora, E., Liu, J., Bartlett, D., & Azam, F. (2005). Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8531–8536.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., & Iida, T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361: 743-9.
- McCarthy, S., & Khambaty, F. (1994). International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2597–2601.
- Ministry of Health Labor and Welfare (MHLW). (2009). *Food Poisoning Statistics*. Inspection and Safety Division, Department of Food Safety, Pharmaceutical and Food Safety Bureau. Recuperado de: <http://www.mhlw.go.jp/english/index.html>).
- Minchin, D. (2006). The transport and the spread of living aquatic species. In: Davenport, J., & Davenport, J. *The Ecology of Transportation: Managing Mobility for the Environment*. Springer.
- Minchin, D., Gollasch, S., & Wallentinus, I. (2005). *Vector pathways and the spread of exotic species in the sea*. ICES Cooperative Research Report. International Council for the exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark.
- Mineur, F., Johnson, M., Maggs, C., & Stegenga, H. (2007). Hull fouling on commercial ships as a vector of macroalgal introduction. *Marine Biology*. 151: 1299–1307.
- Motes, M., DePaola, A., Cook, D., Veazey, J., Hunsucker, J., Garthright, W., Blodgett, R., & Chirtel, S. (1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1459–1465.

- Munirul, A., Marzia, S., Balakrish, N. Siddique, A., Nur, A., Sack, B., Sack, D., Ahmed, U. Sadique, A., Watanabe, H., Grim, C., Huq, A., & Colwell, R. (2007). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *PNAS* 45: 17801-17806.
- Myers, M., Panicker, G., & Bej, A. (2003). PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2194-2200.
- Nair, B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S., Dutta, B., Takeda, Y., Sack, D. (2007). Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. *Clinical Micro. Reviews* 20: 39-38.
- Nandi, B., Nandy, R., Mukhopadhyay, S., Nair, G., Shimada, T., & Ghose, A. (2000). Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* Using primers targeted to the gene of outer membrane protein ompW. *Microbiology* 38: 4145-4151.
- National oceanographic and atmospheric (NOAA). (2009). Annual mean temperature [°C] at the surface. World Ocean Atlas. Recuperado de: http://data.nodc.noaa.gov/woa/WOA09F/temperature/JPEG/t_1_0_1_hr.jpg
- Novitsky, J., & Karl D. (1986). Characterization of microbial activity in the surface layers of a coastal sub-tropical sediment. *Marine Ecology Progress Series* 28: 49–55.
- Olenin, S., Gollasch, S., Jonusas, S., & Rimkute, I. (2000). En-route investigation of plankton in ballast water in ship's voyage from the Baltic Sea to the open Atlantic coast of Europe. *International Review of Hydrobiology* 85: 577–596.
- Oliver, J. (1995). The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbial Ecology*. 133: 203–208.
- Park, J., Cho, Y., Chun, J., Seok, Y., Lee, J., Kim, K., Lee, S., Park, S., & Choi, S. (2011). Complete genome sequence of *Vibrio vulnificus* MO6-24/O. *J Bacteriol.* 193: 2062-2063.
- Portillo-López, A., y Lizárraga-Partida, M. (1997). Detección de *Vibrio cholerae* O1 en diferentes hábitats de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. *Ciencias Marinas* 23:435-447.
- Pruzzo, C., Vezzulli, L., & Colwell, R. (2008). Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Applied and Environmental Microbiology* 10: 1400–1410.

- Purdy, E., Balch, D., Lizarraga-Partida, M., Islam, M., Martinez-Urtaza, J., Huq, A., Colwell, R., & Bartlett, D. (2010). Diversity and Distribution of cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology Reports* 2: 198-207.
- Ruiz, G., Rawlings, T., Dobbs, F., Drake, L., Mullady, T., Huq, A., Colwell, R. (2000). Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408: 49–50.
- Sanyal, S., & Sen, P. (1974). *Human volunteer study on the pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus*. In: Fujimo, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R., & Takeda, Y. International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Company, Tokyo.
- Secretaría de Comunicaciones y Transporte (SCT). (2011). Anuario estadístico 2011 para movimiento portuario. Recuperado de: http://www.sct.gob.mx/fileadmin/CGPMM/U_DGP/estadisticas/2011/Anuarios/index.htm.
- Shikuma, N., & Hadfield, M. (2010). Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio*. *Biofouling* 26: 39–46.
- Smith, K., & Guégan, JF. (2010). Changing Geographic Distributions of Human Pathogens *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 41: 231–50.
- Staroscik, A. (2004). *Calculator for determining the number of copies of a template*. University of Rhode Island. Recuperado de: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>
- Strain, D. (2012). Invasive Species: Researchers Set Course to Blockade Ballast Invaders. *Science* 336: 664-665.
- Tamplin, M., Gauzens, A., Huq, A, Sack, D., Colwell, R. (1990). Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1977-1980.
- Taylor, M., MacKenzie, L., Dodgshun, T., Hopkins, G., de Zwart, E., Hunt, C. (2007). Trans-Pacific shipboard trials on planktonic communities as indicators of open ocean ballast water exchange. *Marine Ecology Progress Series* 350: 41–54.
- 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.

- Todd, E. (1989). Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the U.S. *J Food Prot.* 52: 595–601.
- Vezzulli, L., Pruzzo, C., Huq, A., & Colwell, R. (2010). Environmental reservoirs of *Vibrio cholera* and their role in cholera. *Environmental Microbiology Reports* 2: 27–33.
- Whitman, R., & Flick, G. (1995). Microbial contamination of shellfish: Prevalence, risk to human health and control strategies. *Ann. Rev. Public Health.* 16: 123–140.
- Wong, H., Liu, S, Ku, L., Lee, I., Wang, T., Lee, Y., Lee, C., Kuo, L., & Shih, D. (2000). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *J. Food Prot.* 63: 900–906.
- World Health Organization (WHO).2011 *Weekly epidemiological record.* 86: 325-340. Recuperado de: <http://www.who.int/wer/2011/wer8631.pdf>
- Yamazaki, M., Inuzuka, K., Matsumoto, M., Miwa, Y. Hiramatsu, R., Matsui, H., Sakae, K., Suzuki, Y., & Miyazaki, Y. (2003). Epidemiological study of outbreaks and sporadic cases due to *Vibrio parahaemolyticus*--serotype O3:K6 in Aichi Prefecture, Japan, during 1988 and 2001. *Kansenshogaku Zasshi* 77: 1015-23.
- Yeung, P., & Boor, K. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Food-borne Pathog Dis.* 1: 74-88.
- ZoBell, C., & Anderson, D. (1936). Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored seawater and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biological Bulletin* 71: 324–342.
- Zobell, D., & Allen, C. (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *J. Bacteriol.* 29: 239-251.

ANEXO

Extracción Genómica de ADN por Choque Térmico

