

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



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Identificación de poliquetos y bacterias asociados a lesiones
en la concha del abulón rojo *Haliotis rufescens* cultivado en
Baja California**

Tesis

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

Presenta:

Yessica Hernández Mercado

Ensenada, Baja California, México
2015.

Tesis defendida por

Yessica Hernández Mercado

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director de Tesis

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Miembro del comité

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo
Miembro del comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del comité



Autoridades

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador del Posgrado en
Ciencias en Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Yessica Hernández Mercado © 2015

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

Resumen de la tesis que presenta **Yessica Hernández Mercado** como requisito parcial para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias en Acuicultura**.

Identificación de poliquetos y de bacterias asociadas a lesiones en la concha de abulón rojo *Haliotis rufescens* cultivado en Baja California

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director de Tesis

El cultivo de abulón rojo *Haliotis rufescens* representa una alternativa para el desarrollo económico del estado de Baja California ante su demanda en el mercado y las reducciones drásticas de las poblaciones naturales que sostienen la pesquería. Actualmente, en algunas localidades del estado, existen granjas de cultivo de abulón con diferente grado de éxito. Como en todas las actividades productivas, existen factores que afectan su rendimiento, uno de ellos es la presencia de enfermedades infecciosas entre las que se encuentran el Síndrome de Deshidratación, causado por una bacteria intracelular y la Sabelidosis, originada por un poliqueto perforador. Para estas enfermedades existen medidas de prevención y control, lo que permite mantener el desarrollo de cultivos. Sin embargo, la aparición de nuevas enfermedades siempre es un riesgo latente. En la granja de Abulones Cultivados S. de R.L. de C.V., en el ejido de Eréndira, Baja California, se detectó un cuadro clínico que sugiere la presencia de una nueva enfermedad. De acuerdo a los productores, este cuadro se comprende por perforaciones en la cara externa de la concha a la altura de la espira, además de depósitos de materia orgánica en el área lesionada así como en la cara interna. En ocasiones puede presentarse necrosis en el tejido aledaño a la lesión o incluso ocurrir el desprendimiento del cuerpo blando. Este cuadro podría estar asociado a la presencia de gusanos perforadores y además estar ligado a un desarrollo bacteriano. En este trabajo se caracterizan las lesiones en la concha de abulón rojo, a los gusanos perforadores y a las posibles bacterias asociadas, utilizando técnicas convencionales y moleculares. Las perforaciones en la concha de los abulones se sitúan en el área de la espira, cubriendo hasta un 7% de la superficie total. Los segmentos de poliquetos espiónidos encontrados se identificaron como *Boccardia proboscidea*, especie que ha sido asociada con perforaciones en abulones cultivados en Sudáfrica. El análisis bacteriológico mostró que la mayoría de las bacterias presentes en las áreas aledañas a la lesión pertenecen al género *Vibrio* y a su vez, gran parte de ellas forman parte del clado Splendidus, dentro del cual existen bacterias como *Vibrio splendidus*, capaz de provocar infecciones secundarias en el tejido blando y deformaciones en la matriz de la concha. Estamos ante un caso típico de infestación por poliquetos perforadores; suceso que nos reitera la importancia de la aplicación de medidas de control y manejo de abulones en las granjas de cultivo.

Palabras Clave: *Haliotis rufescens*, perforaciones en concha, espiónidos, *Boccardia proboscidea*, clado Splendidus.

Abstract of the thesis presented by **Yessica Hernández Mercado** as a partial requirement to obtain the Master degree in **Science in Aquaculture**. Ensenada, Baja California.

Identification of polychaeta spionids and bacteria from genre *Vibrio* associated with shell injuries on red abalone *Haliotis rufescens* grown in Baja California

Abstract approved by:

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director thesis

The cultured of red abalone *Haliotis rufescens* represents an alternative for economic development of Baja California State in the face of market demand and the collapse of natural populations that support the fisheries. Currently, in some areas of the state, exist abalone farms with varying degrees of success. Like in any other productive activities exist factors affecting the efficiency, one of them is the presence of infectious diseases, among those are the Dehydration Syndrome, caused by an intracellular bacteria; and the Sabelidosis, resulting from a polychaete. For these diseases, there are methods of prevention and control, which keeps the crop development; however, the emergence of new diseases is always a latent risk. On the farm of abalone Cultured S. of RL de CV, in Ejido Erendira, Baja California, a clinical profile suggests the presence of a new disease. According to producers, this profile includes perforations on the outer surface of the shell, brown deposits inside the perforation and in the inner face. Sometimes, soft body detachment or necrosis of the adjacent tissue to the lesion it could happen. This profile could be associated to the presence of borer worms and the possible bacterial growth. In this study the lesions of the shell, borer worms and any associated bacteria, were characterized using conventional and molecular techniques. The perforations are located in the spiral on the outer surface of the shell, covering up to 7% of the total area. The polychaete spionids segments found were identified as *Boccardia proboscidea*, this organism has been associated with similar perforations on cultured abalone in South Africa. The bacteriological analysis, determined that most of the bacteria present in the areas surrounding the lesion belong to the genus *Vibrio*; the majority is affiliated to clade Splendidus, within which bacteria as *Vibrio splendidus* is able to cause secondary infections in soft tissue and strains in the matrix of the shell. We are facing a typical case of boring polychaete infestation. This event reiterated us the importance of implementing control measures and management of abalone farming.

Key words: *Haliotis rufescens*, perforations in the shell, spionids, *Boccardia proboscidea*, Splendidus clade.

Dedicatoria

A **Maltus †**

Por acompañarme durante 14 años. Jamás un corazón conoció un amor tan puro como el tuyo por nosotros y el de nosotros por ti.

A mis padres **Antonia Mercado Martínez** y **Carlos Hernández Marines**

Por permitirme realizar este sueño, alentarme y apoyarme en cada etapa de mi vida. He visto en ustedes que el esfuerzo da resultados. Les agradezco el haberme enseñado a ser una buena persona, son los mejores padres.

A mis hermanas **Elisa** y **Vianey**

Por su apoyo incondicional, porque el amor de hermanas no tiene sustituto, porque me conocen tal y como soy, porque me aceptan a pesar de todas mis faltas, porque posiblemente pensarán que “no les queda de otra”, pero sobre todo porque siempre están conmigo.

Agradecimientos

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

A mi Director de Tesis, Dr. Jorge A. Cáceres Martínez por su interés en mejorar mi desempeño y capacidad académica y por su dirección en este proyecto.

A los miembros de mi comité: Dra. Beatriz Cordero Esquivel, Dra. Rebeca Vásquez Yeomans y Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo, por sus comentarios y sugerencias para la realización de esta tesis y su disposición para atender mis dudas y asistir a mis presentaciones.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por todo el apoyo brindado durante mi estancia como estudiante de posgrado en el Departamento de Acuicultura y por brindarme la oportunidad de formar parte de su institución.

A cada uno de mis profesores por compartir sus conocimientos y ayudarme a alcanzar mi meta.

A la Granja de Abulones Cultivados S. de R.L. de C.V. por su apoyo e interés en este proyecto y por proporcionarme las muestras de abulón para este estudio.

Al Instituto de Sanidad Acuícola, A.C., por brindarme el espacio, el tiempo y el apoyo de sus integrantes así como su ayuda y consejo técnico: Dra. Rebeca Vásquez Yeomans, M. en C. Ananda Aracely Navarro, M. en C. Gissel Dalila Tinoco Orta, M. en C. Adriana Cáceres Figueroa y Sayuri García.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, por su asesoría, apoyo y capacitación en técnicas microbiológicas e histológicas.

Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, por su asesoría, capacitación, apoyo y comentarios acertados durante la realización de esta tesis.

Al M. en C. Roberto Cruz Flores, por su consejo y ayuda durante la realización de las diferentes etapas de este proyecto.

A los chicos del Laboratorio de Genética del Departamento de Acuicultura del CICESE por sus consejos y apoyo en el desarrollo de la técnica de PCR: Stefanny Karina Córdova Rangel y el M. en C. Rigoberto Delgado Vega.

A la M. en C. Maricarmen Necoechea, técnico del laboratorio de Ecología del bentos marino del Departamento de Ecología Marina por su apoyo en la identificación de poliquetos.

A Denisse Stephanie Vega Valdez por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto, por su compañía y su ánimo.

A mis amigos por alentarme siempre que me sentía derrotada: Ana, Meli, Caro y su pequeña Lisa, Diego, Victor, Paco, Israel, Paty, Wendy, Erik, Andrés, Omar y el resto de ellos; todos son muy importantes para mí y agradezco verdaderamente su apoyo.

Y finalmente a cada una de las personas que de una u otra forma me apoyaron en la realización de esta tesis.

Tabla de Contenido

Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Descripción del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> (Swainson, 1822)	1
1.2 Cultivo de abulón rojo en México	2
1.3 Enfermedades infecciosas del abulón rojo	3
Capítulo 2. Justificación	
2.1 Justificación.....	6
Capítulo 3. Hipótesis y objetivos	
3.1 Hipótesis	7
3.2 Objetivo general	7
3.3 Objetivos particulares.....	7
Capítulo 4. Metodología	
4.1 Obtención de organismos	8
4.2 Análisis del grado de lesión de la concha	8
4.3 Análisis histológico.....	9
4.4 Identificación de poliquetos espionidos	10
4.4.1 Obtención e identificación convencional de gusanos perforadores	10
4.4.2 Extracción de ADN genómico de poliquetos.....	10
4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa	11
4.4.4 Análisis de secuenciación.....	13
4.5 Identificación de bacterias.....	13
4.5.1 Análisis bacteriológico	13
4.5.2 Extracción de ADN genómico de bacterias	14

4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa	15
4.5.4 Análisis de secuenciación.....	16
Capítulo 5. Resultados	
5.1 Caracterización del grado de lesión en concha.....	17
5.2 Identificación de poliquetos espiónidos	18
5.2.1 Identificación por taxonomía convencional	18
5.2.2 Identificación por ADN	20
5.3 Análisis histológico.....	20
5.4 Análisis bacteriológico.....	21
5.5.1 Análisis molecular	22
5.5.2 Análisis de secuenciación.....	22
Capítulo 6. Discusiones	
6.1 Discusiones.....	25
Capítulo 7. Conclusiones	
7.1 Conclusiones.....	31
Capítulo 8. Recomendaciones	
8.1 Recomendaciones	33
Lista de referencias bibliográficas	34

Lista de figuras

Figura	Página
1 Distribución geográfica el abulón rojo en México	1
2 Lesión característica en concha de abulón rojo por infestación de poliquetos	5
3 Estimación del área lesionada mediante el uso de moldes	9
4 Obtención de gusanos perforadores	10
5 Perforaciones en la concha de abulón rojo	17
6 Estructuras de poliquetos	19
7 Histología del tejido aledaño a la lesión	21
8 PCR del gen bacteriano 16s ADNr	22
9 Árbol filogenético de bacterias	24

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Mezcla para PCR: espiónidos	12
2 Condiciones de amplificación	12
3 Mezcla para PCR: bacterias	15
4 Condiciones de amplificación	16
5 BLAST espiónidos	20
6 Ubicación en el abulón rojo de las cepas aisladas	21
7 BLAST bacterias	23

Capítulo 1

1. Introducción

1.1 Descripción del abulón rojo (*Haliotis rufescens*)

El abulón rojo, *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) es un gasterópodo marino perteneciente a la familia Haliotidae. Los individuos de esta especie, como sus congéneres, viven adheridos a fondos rocosos. Se distribuyen en las regiones templadas de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico (Geiger and Guido, 2000). En aguas mexicanas, pueden encontrarse a lo largo de la costa de Baja California desde Islas Coronados, con mayor abundancia en la región aledaña a Bahía El Rosario (Figura 1) (Carta Nacional Acuícola, 2013). Su localización va desde la zona intermareal hasta profundidades de 50 metros, especialmente entre 25 y 30 metros cerca de zonas pétreas en contacto con macroalgas, principalmente del género *Macrosystis* (Fischer *et al.*, 1995).

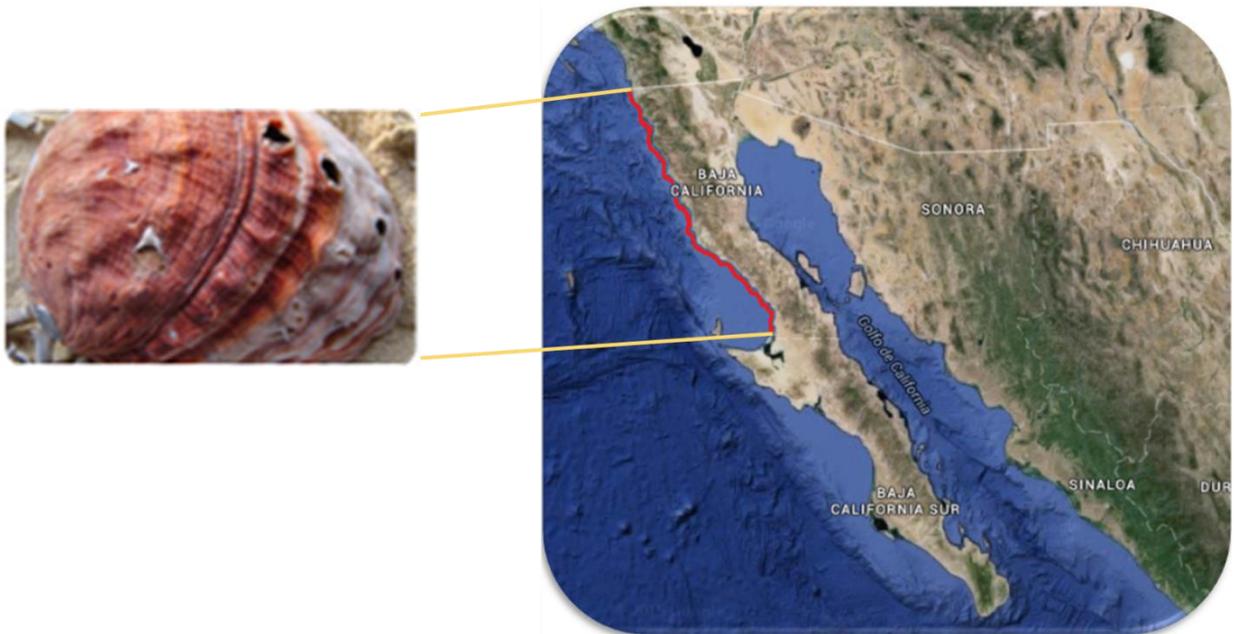


Figura 1. Distribución geográfica del abulón rojo en México.

Su desplazamiento y la capacidad de adherirse al sustrato se deben a la presencia de un pie muscular; este músculo constituye la porción comestible. Presentan una simetría bilateral, concha aplanada y la región dorsal se caracteriza por tener forma de oreja, la cual puede variar desde muy arqueada en la región posterior a plana en la región anterior,

presentando una serie de orificios o poros respiratorios alineados lateralmente sobre la cavidad branquial (Cox, 1962). El abulón rojo puede ser identificado por la superficie rugosa de su concha, la cara externa es de color rojo, aunque el color puede ser enmascarado por organismos que viven sobre ésta; mientras que su cara interna es iridiscente (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997).

1.2 Cultivo de abulón rojo en la península de Baja California

En el Estado de Baja California, México, el cultivo de abulón configura un fenómeno de creciente importancia en las actividades económicas de la acuicultura debido al alto valor comercial del pie, el cual es vendido como un deleite para consumo humano y por la belleza de su concha empleada en la industria joyera y para la elaboración de artesanías (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997). El interés en el cultivo de abulón responde a las reducciones drásticas de las poblaciones naturales resultado de sobreexplotación y cambios ambientales (Troell *et al.*, 2006). A partir de dicha situación, se impulsó el cultivo de abulón en México, como una alternativa para asistir su recuperación (Lluch-Cota y Hernández-Vázquez, 2006); siendo el abulón rojo *Haliotis rufescens* la especie que mejor se ha adaptado a cultivo, debido a su tasa de crecimiento en cautiverio, su gran adaptabilidad y al manejo de su ciclo completo (Enriquez y Villagran, 2008). En México, el cultivo de abulón rojo inició en 1978 con la creación del Centro Acuícola de Eréndira, Baja California, con el objeto de realizar estudios básicos sobre la especie y cultivos en laboratorio. A partir de 1992, se registró una concesión de acuicultura comercial para su cultivo en el país, sumado a la creación de otros tres laboratorios destinados a la producción de semilla (Abulones cultivados S. de R.L de C.V., Productores Marinos Baja S.A. de C.V. y Grupo Empresarial Mexicano de Acuicultura Sustentable). Para el 2011 se reportó una producción de 520,000 semillas anuales durante la operación de estos tres laboratorios y una producción de 39.8 toneladas de producto de talla comercial en cuatro granjas comerciales (Carta Nacional Acuícola, 2013). En este contexto para el 2014, la gran escasez del producto obligó a que toda la producción por acuicultura se colocara en el mercado, además de situar a las granjas en un proceso de reestructuración para atender la demanda (Molina-Carrillo, 2013). La tendencia actual es convertir el cultivo de abulón rojo en la fuente principal del recurso, con esto se pretende reducir la dependencia

de poblaciones silvestres sujetas a gran presión pesquera (Carta Nacional Acuícola, 2013).

1.3 Enfermedades infecciosas del abulón rojo

Si bien se prevé un desarrollo renovado del cultivo de abulón, existen factores de riesgo que pueden afectarlo, tal es el caso de la presencia de enfermedades infecciosas. Estas enfermedades son un factor de gran importancia que puede afectar el rendimiento y la pertinencia del cultivo. En muchas ocasiones donde se han registrado mortalidades inusuales se ha pensado en agentes infecciosos como los principales responsables; sin embargo, se desconocen esos presuntos agentes y por consiguiente las medidas de prevención y control. Referente a la creciente frecuencia de este tipo de padecimientos en abulón, se han fomentado los estudios patológicos al respecto (Valle-Ríos, 2000). Se sabe que en general, los moluscos son susceptibles a ser infectados por una gran cantidad de organismos procariotas, principalmente bacterias gram negativas y positivas, clamidias y micoplasmas (Perkins, 1993), así como una amplia variedad de protozoarios (Lauckner, 1980; Perkins, 1993) y metazoarios como helmintos o artrópodos (Lauckner, 1980). De las enfermedades infecciosas más importantes en los abulones destacan el Síndrome de Deshidratación (SD) causado por la bacteria intracelular *Candidatus Xenohalotus californiensis* (Friedman *et al.*, 2000) y Sabelidosis, causada por el poliqueto *Terebrasabella heterouncinata* (Culver *et al.*, 1997), del que se sabe es capaz de infestar abulones desde tallas muy pequeñas (2 mm- 3 mm), aunque estas son menos susceptibles a infestaciones que las tallas más grandes (Culver *et al.*, 1997). Para ambas enfermedades se han establecido medidas de manejo y tratamiento que permiten mantenerlas bajo control y proteger el desarrollo de los cultivos de abulón (Cáceres-Martínez *et al.*, 2011).

Además de los sabelidos, existen otras especies de poliquetos espionidos capaces de perforar la concha del abulón (Blake and Evan, 1972), siendo los géneros *Polydora* y *Boccardia* los de mayor presencia en la costa occidental mexicana (Blake, 1981). Lo anterior sustenta trabajos como el realizado por Cáceres-Martínez y Tinoco-Orta (2001), donde se encontró la presencia de un espionido, probablemente perteneciente al género

Polydora, responsable de las perforaciones en la concha de abulones rojos cultivados en Bahía de Todos Santos, Baja California. Las infestaciones por estos organismos no suelen limitarse únicamente a una sola especie de poliquetos. En algunas granjas de Sudáfrica, se ha registrado la infestación de abulón por más de una especie de gusanos perforadores del género *Polydora* (Tovar-Hernández y Yañez-Rivera, 2012). Los primeros reportes de infestaciones importantes por poliquetos espiónidos en moluscos se presentaron a finales de 1800 en Australia, desde entonces se ha sugerido que el impacto de las infestaciones depende de la severidad de las mismas, de la especie y el tamaño y de la salud del hospedero y la especie de espiónido (Leonart *et al.*, 2003). La presencia de estos gusanos perforadores no resulta exclusiva de las costas mexicanas. En Sudáfrica se reportan infestaciones por poliquetos de la especie *Boccardia probosidea* en los cultivos de abulón *Haliotis midae*. Esta especie de poliqueto llegó inadvertidamente en organismos de abulón rojo importados de California a Sudáfrica a finales de 1980 (Simon *et al.*, 2009). En el 2006 Simon y colaboradores identificaron a tres especies de espiónidos en abulón en distintas localidades de cultivo de Sudáfrica, las especies: *Polydora hoplura*, *Dipolydora capensis* y *Boccardia* sp. (Simon *et al.* 2006). La mayoría de estos poliquetos pueden ser fácilmente detectados por la presencia de perforaciones en la cara externa de la concha así como la aparición de depósitos de color oscuro en la cara interna de la misma (García-Ulloa, 2003). Existen diferencias en cuanto a las características de infestación entre una especie y otra. Por ejemplo, la infestación por especies de los géneros *Polydora* o *Boccardia* respecto a *T. heterouncinata* difiere en el tamaño de los túneles o perforaciones de la concha, que son mayores en los géneros *Polydora* y *Boccardia*, además de la densidad de individuos ya que por su tamaño, más pequeño, *T. heterouncinata* se encuentra en densidades más altas (Culver *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2005; Tovar-Hernández y Yañez-Rivera, 2012).

El riesgo de infestación en los cultivos de abulón es alto, debido a que estos perforadores utilizan las conchas como un refugio natural (Martin and Britayev, 1998), además de que los sitios de cultivo suelen ser ricos en fitoplancton y materia orgánica, los cuales proveen el alimento necesario para una rápida colonización (Gallo-García *et al.*, 2007). El daño en los cultivos se produce cuando el poliqueto penetra hacia la superficie interna de la concha y los detritos arrastrados por éste crean gradualmente un depósito de lodo. Estos

depósitos resultan en una apariencia desagradable para la comercialización de los abulones y a su vez crean un ambiente ideal para la proliferación de bacterias (Martin and Britayev, 1998). Por lo tanto, la presencia de los gusanos perforadores aunado a condiciones tales como, altas densidades de cultivo, cambios de temperatura o baja calidad del agua, promueven la susceptibilidad de los abulones a infecciones bacterianas secundarias, las cuales pueden reflejarse en pérdidas de la producción (Britzet *et al.*, 1994; Harvell *et al.*, 1999). Entre las bacterias que residen habitualmente en los ecosistemas acuáticos destacan las del género *Vibrio*, dentro de este grupo existen algunas que son señaladas como el problema más común y serio en el cultivo de moluscos, ya que en ocasiones son causantes de enfermedades y mortalidades masivas (Sindermann, 1990, Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Por otro lado, muchas otras aún no han sido plenamente identificadas como patógenas por lo que se requiere profundizar en su estudio.

En el ejido de Eréndira, B.C., recientemente se ha detectado un porcentaje indeterminado de abulones rojos cultivados que presentan una lesión característica en la concha que resulta en la perforación de la misma, cerca del área de la espira, en algunos casos desprendimiento del cuerpo blando e incluso ruptura de la concha (Figura 2). Existen referencias que indican que este tipo de lesiones en moluscos sostienen una relación con gusanos perforadores (Figueras y Villalba, 1988; Culver *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2009) y bacterias del género *Vibrio*, principalmente *Vibrio splendidus* (Villalva-Vega, 2011).

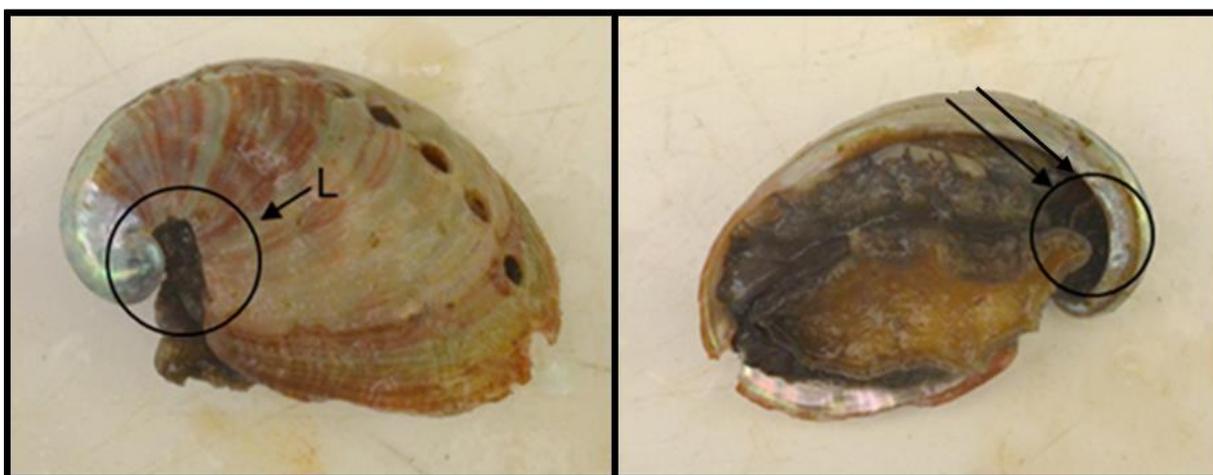


Figura 2. A la izquierda, lesión característica de la concha de abulón rojo por infestación de poliquetos (L). A la derecha, zona donde puede iniciarse el desprendimiento del cuerpo blando (señalado con flechas).

Capítulo 2

2.1 Justificación

El cultivo de abulón rojo es una actividad de gran importancia económica en el Estado de Baja California. Se sabe que esta actividad, al igual que muchas otras, no está exenta de factores de riesgo los cuales comprometen su producción, tales como la presencia de enfermedades infecciosas. Muchas de estas enfermedades aún no han sido identificadas por lo que es indispensable iniciar estudios que permitan identificarlas. Recientemente se han detectado en abulones cultivados signos clínicos que permiten suponer la aparición de una nueva enfermedad. Por lo tanto, este trabajo pretende caracterizar dicho cuadro clínico y su asociación con gusanos perforadores y bacterias.

Capítulo 3

3.1 Hipótesis y objetivos

3.1.1 Hipótesis

- Las perforaciones de la concha del abulón rojo presentan un patrón común que puede ser ordenado, caracterizado y que además, se asocia a la presencia de gusanos perforadores.
- A partir de estas perforaciones se suscitan infecciones secundarias producidas por bacterias tipo *Vibrio*.

3.1.2 Objetivo General

- Caracterizar las lesiones de la concha de abulón rojo *Haliotis rufescens*, así como describir los posibles daños presentes en el tejido aledaño a las mismas y determinar su relación con gusanos perforadores y bacterias. La identificación de estos organismos será mediante bacteriología convencional y análisis de ADN.

3.1.3 Objetivos Particulares

1. Caracterizar la lesión de la concha.
2. Describir a nivel histológico, el daño observado en el tejido aledaño a las lesiones de la concha.
3. Aislar e identificar por taxonomía convencional los gusanos perforadores presentes en la concha.
4. Identificar por análisis de ADN los géneros o especies de gusanos perforadores relacionados con la lesión en la concha.
5. Aislar e identificar por métodos bioquímicos convencionales a las bacterias más comunes asociadas con las lesiones encontradas en la concha.
6. Identificar por medio del análisis del ADN a las bacterias asociadas con las lesiones de la concha.

Capítulo 4

4. Metodología

4.1 Obtención de organismos

Para el estudio se realizó un muestreo dirigido analizando 33 ejemplares de abulón rojo provenientes de la granja de Abulones Cultivados en el Ejido de Eréndira, Baja California, México. El tamaño de muestra se determinó de acuerdo al número de ejemplares encontrados en la granja cuyas características fueron compatibles con las lesiones observadas por los productores. El muestreo se realizó después de la temporada de separación de tallas antes de la fase de preengorda.

Para el transporte de los abulones se guardaron en una bolsa plástica con una esponja húmeda al fondo y se colocaron en una hielera, con hielo en el fondo y en la tapa para conservarlos frescos hasta su arribo al Laboratorio de Patología del Departamento de Acuicultura en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

4.2 Análisis del grado de lesión de la concha

Los ejemplares de abulón fueron lavados con agua de mar estéril, pesados en una balanza analítica y medidos con un vernier. Posteriormente se realizó un análisis de la concha para calcular el porcentaje relativo del área afectada. Partiendo del cálculo del área superficial total de la concha, el cual se obtuvo a través de moldes de papel aluminio amoldados a la cara externa de la concha los cuales fueron pesados en una balanza analítica (Figura 3). El área de cada uno de los moldes de las conchas se obtuvo mediante una regresión lineal ajustada por mínimos cuadrados de áreas conocidas (Zar, 1974) de papel aluminio previamente pesadas, que generaron la ecuación:

$$x = \frac{y}{0.0037 - 0.00005}$$

Donde “x” es el área en centímetros cuadrados que se estimó, “y” es el peso del molde en gramos y “0.0037 - 0.00005” el resultado de la ecuación de regresión lineal. Para este modelo se obtuvo un valor de $r=0.99$, lo que se traduce como la relación entre el área conocida y el peso del papel que se explica en más de un 99%.



Figura 3. Estimación del área lesionada mediante el uso de moldes

Posteriormente se recortó el área de la lesión de los moldes y se pesaron nuevamente para estimar el porcentaje de cobertura de la lesión, obteniéndose la siguiente relación:

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

El peso del área de la lesión se estimó a partir del peso del área total del molde menos el peso del molde sin el área lesionada.

4.3 Análisis histológico

El cuerpo blando de tres abulones se fijó completo en una solución fijadora Davidson (Shaw and Battle, 1957), inyectando previamente esta solución en los tejidos para asegurar su fijación. Después de 24 horas de su fijación, se hizo un corte de una fracción del tejido en contacto con la lesión en la concha que se colocó en un casete histológico. Los casetes con muestras se colocaron en un procesador automático de tejidos para su deshidratación con cambios graduales de etanol (70% hasta alcohol absoluto) y se

incluyeron en parafina. Posteriormente, con la ayuda de un micrótopo se hicieron cortes histológicos con 6 μm de espesor, que se colocaron en un portaobjetos y se tiñeron con la tinción de Hematoxilina-Eosina-Floxina (NOAA, 1983). Las laminillas histológicas se revisaron al microscopio óptico para determinar la posible presencia de bacterias y daños asociados. La revisión se hizo realizando un barrido de zigzag longitudinal a la posición del corte. Se tomaron fotografías para documentar los resultados encontrados.

4.4 Identificación de poliquetos espiónidos

4.4.1 Obtención e identificación convencional de gusanos perforadores

Con ayuda de un microscopio estereoscópico, se examinaron las perforaciones en la cara externa de la concha de los abulones y se raspó el interior de las mismas con una aguja de disección y agua de mar estéril con la intención de remover el contenido de los depósitos para recuperar los fragmentos de los gusanos perforadores (Figura 4). Los 12 fragmentos encontrados fueron preservados en etanol al 70% hasta su revisión. La identificación se llevó a cabo mediante taxonomía convencional utilizando las claves taxonómicas de Rainer (1973); Read (1975); Light (1978) y Blake (1996).



Figura 4. Obtención de los gusanos perforadores: (A) Perforación en la concha de un ejemplar de abulón rojo; (B) Materia proveniente de la perforación y (C) Fragmento de poliqueto recuperado.

4.4.2 Extracción de ADN genómico de poliquetos

Para la extracción del ADN genómico de los gusanos perforadores se utilizó el kit comercial de Qiagen DNeasy® Blood & Tissue siguiendo el protocolo del fabricante el cual se describe a continuación.

Los fragmentos de los espionidos extraídos de las conchas de abulón se separaron individualmente en 12 tubos de microcentrífuga de 1.6 ml previamente etiquetados, de acuerdo al número de abulón correspondiente y al número de fragmento por abulón. A cada uno de los fragmentos de cada tubo se les adicionó 180 µl de la solución ATL y 20 µl de Proteinasa K y se mezclaron con un vórtex durante 10 segundos. Tras la adición de los reactivos, las muestras fueron incubadas durante 3 horas a una temperatura de 56 °C, dando vórtex cada 15 minutos. Al transcurrir el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 1,500 rpm durante 10 segundos para retirar las gotas que pudieran haber quedado en la tapa y se les agregó 200 µl de la solución AL Buffer y se mezclaron con un vórtex por 15 segundos. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 56 °C, posteriormente se les adicionó 200 µl de Etanol al 96% y se mezclaron con un vórtex y se centrifugaron por 10 segundos a 1,500 rpm. Posteriormente, las muestras se transfirieron a una columna con una membrana de sílica y se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto. Se añadieron 500 µl de la solución AW1 centrifugando a 10,000 rpm durante 1 minuto. Se agregaron 500 µl de la solución AW2, centrifugando a 13,600 rpm por 3 minutos. En cada uno de estos pasos se colocó un tubo de recolecta descartando el filtrado y el tubo. Por último, las columnas se colocaron en un tubo de microcentrífuga estéril para realizar la elución, adicionando 200 µl de la solución AE al centro de la columna y dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por un minuto para finalmente almacenarlas a -20 °C hasta su utilización.

Se utilizó un espectrofotómetro UV a 260 nm ($A_{260/280} \sim 1.86 - 2.03$) para la cuantificación y pureza del ADN genómico y se visualizó por medio de la técnica de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 0.8%. Una vez realizada la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de GelRed™ (Biotium, Inc.) durante 20 minutos y se detectó bajo luz ultravioleta.

4.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación del ADN fueron el 16S Sar: 5'-CGC-CTG-TTT-ATC-AAA-AAC-AT-3' y el 16S Sbr: 5'-CCG-GTC-TGA-ACT-CAG-ATC-

ACG-T-3', los cuales amplifican un fragmento de 400-500 pb de una región conservada del gen 16S. Se prepararon dos mezclas para PCR, considerando dos rangos de concentraciones de ADN genómico: baja concentración (4-33 µg/ml) y alta concentración (45-58 µg/ml). Se utilizó la metodología descrita por Radashevsky y Pankova (2013), la cual fue modificada de acuerdo a la concentración de ADN de las muestras ajustando la cantidad de MgCl₂ a usar (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos utilizados para la mezcla de PCR a 50 µl para la detección del gen 16S ADNr

Baja concentración		Alta concentración	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Buffer 10x	5.0 µl	Buffer 10x	5.0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3.0 µl	MgCl ₂ (50 mM)	5.0 µl
Primer Sar (10 µM)	1.0 µl	Primer Sar (10 µM)	1.0 µl
Primer Sbr (10 µM)	1.0 µl	Primer Sbr (10 µM)	1.0 µl
dNTPs (10 mM)	5.0 µl	dNTPs (10 mM)	5.0 µl
Taq (5 U/µl)	5.0 µl	Taq (5 U/µl)	5.0 µl
H ₂ O grado molecular	25 µl	H ₂ O grado molecular	26 µl
ADN (4-33 µg/µl)	5 µl	ADN (45-58 µg/µl)	2 µl

En todas las reacciones realizadas se incluyó agua estéril como control negativo. La reacción de PCR se realizó en un termociclador. Se siguieron las condiciones de amplificación descritas por Radashevsky y Pankova (2013), mismas que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de amplificación para la detección del gen 16S ADNr de poliquetos espionidos

Temperatura °C	Tiempo	Evento	Ciclos
95	2 minutos	Desnaturalización inicial	1
95	40 segundos	Desnaturalización	35
46	40 segundos	Alineamiento de los iniciadores	
72	50 segundos	Extensión	
72	5 minutos	Extensión final	1

Los productos de PCR se detectaron por medio de la técnica de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5%. Se aplicó una carga de 100 voltios por 30 min y el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1 µg/ µl. El gel teñido se analizó con el software Quantity one.

4.4.4 Análisis de secuenciación

Los productos de PCR amplificados fueron enviados para su secuenciación a QUIMERA BIOLABS S. de R.L. de C.V. Las secuencias obtenidas fueron comparadas por medio de BLAST en la base de datos del GenBank (banco de genes,) para determinar su similitud. Una vez obtenidas las secuencias con el mayor porcentaje de similitud y de cobertura se determinó su identidad.

4.5 Identificación de bacterias

4.5.1 Análisis bacteriológico

Se eligieron tres ejemplares de abulón que presentaron la perforación en la concha, y bajo condiciones asépticas, se raspó la zona afectada mediante el uso de un asa bacteriológica, tanto de la cara externa como de la interna. Así mismo, se hizo un frotis del tejido contiguo a la lesión y cada muestra se inoculó por separado y triplicado, mediante el método de sembrado en estría en cajas Petri con medio Agar Marino (AM) y Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) al 2% de NaCl. Los medios se mantuvieron en incubación durante 36 h a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) o hasta observar un crecimiento de colonias (48 h). El aislamiento se continuó hasta obtener un solo tipo de colonia, basándonos en una revisión microscópica que incluyó la morfología colonial, coloración, tipo de crecimiento y la consistencia de la colonia (Bergey *et al.*, 1994). La identificación de las bacterias se hizo sólo de las colonias obtenidas en al menos dos de las zonas en contacto directo con el área de la lesión (directamente en la perforación, tanto en la cara externa como en la interna y/o en el tejido aledaño a la misma).

Las bacterias aisladas fueron analizadas por los siguientes métodos convencionales: pruebas de KOH, catalasa, oxidasa, motilidad, crecimiento en NaCl, tinción Gram y sensibilidad al agente vibriostático O/129 (150 µg).

Para continuar con la identificación de las colonias de bacterias, se eligieron las colonias obtenidas de la zona en contacto con el área de la lesión, es decir, directamente en la perforación (tanto en la cara externa como en la interna de la valva) y/o en el tejido aledaño a la misma.

4.5.2 Extracción de ADN genómico de bacterias

Las colonias aisladas, fueron transferidas a tubos de ensayo con 10 ml de medio líquido (Caldo Marino DIFCO) para obtener una densidad óptima para la extracción de ADN. Los tubos se mantuvieron en agitación continua y a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) durante 18 h. Del cultivo se recolectaron alícuotas de 1.5 ml en tubos estériles de 1.6 ml y se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 minuto para concentrar a las bacterias. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril, 100 µl de SDS 10% (dodecil sulfato de sodio) y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) incubando a 56 °C durante 3 horas, mezclando con un vórtex cada 15 minutos para homogeneizar el proceso de digestión. Transcurrido ese tiempo se agregaron 500 µl del reactivo comercial DNAzol® y se incubaron de nuevo durante 1 hora a 56 °C, homogeneizando con vórtex cada 15 minutos. Se centrifugaron los tubos a 12,600 rpm por 10 minutos y se transfirieron 800 µl del sobrenadante a un nuevo tubo, agregando 200 µl de cloroformo a 4 °C, mezclando con un vórtex durante 10 segundos y dejando reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron nuevamente los tubos a 12,600 rpm durante 10 minutos y se tomaron 600 µl de la fase acuosa, los cuales se transfirieron a un nuevo tubo estéril, agregando 800 µl de isopropanol. Los tubos se mezclaron por inversión y se dejaron reposar durante 24 horas a -20 °C para precipitar el ADN. Transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron a 13,600 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el ADN precipitado se lavó con alcohol etílico al 70%. Se centrifugaron de nuevo a 13,600 rpm y se eliminó el alcohol por decantación. El ADN se secó en la estufa a 56°C durante 10 min

para eliminar los restos de etanol y los pellets se resuspendieron en 100 μl de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril. El ADN se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Se utilizó un espectrofotómetro UV a 260 nm ($A_{260/280} \sim 1.86 - 2.03$) para la cuantificación y pureza del ADN genómico y se visualizó por medio de la técnica de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 0.8%. Una vez realizada la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de GelRed™ (Biotium, Inc.) durante 20 minutos y se detectó bajo luz ultravioleta. Con esto se determinaron las cantidades de ADN genómico a utilizar ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se estandarizaron las concentraciones de ADN a 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos empleados fueron el 16S forward (B1): 5'-CCG-TCG-ACA-GAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TCA-G-3' y el 16S reverse (B2): 5'-CGG-GAT-CCA-CCT-TGT-TAC-GAC-TTC-ACC-C-3', los cuales amplifican un fragmento de 1500 pares de bases, siendo universales para procariontes. Para la preparación de la mezcla de PCR se utilizó la metodología descrita por García-Ortega (1997) detallada en la Tabla 3. En todas las reacciones realizadas se empleó ADN genómico de *Vibrio* sp. como control positivo y agua estéril como control negativo.

Tabla 3. Reactivos utilizados para la mezcla de PCR a 50 μl para la detección del gen 16S ADN bacteriano

Reactivo	Cantidad
Buffer 10x	2.5 μl
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 μl
Primer B1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1.0 μl
Primer B2 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1.0 μl
dNTPs (10 mM)	0.50 μl
Taq (5 U/ μl)	0.25 μl
H ₂ O grado molecular	Variable
ADN	500 ng

La reacción de PCR se realizó en un termociclador. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de amplificación para la detección del gen 16S ADNr

Temperatura °C	Tiempo	Evento	Ciclos
95	5 minutos	Desnaturalización inicial	1
95	1 minuto	Desnaturalización	25
55	1 minuto	Alineamiento de los iniciadores	
72	2 minutos	Extensión	
72	60 minutos	Extensión final	1

Los productos de PCR se detectaron por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Se aplicó una carga de 100 voltios por 30 minutos y el gel fue teñido con una solución de GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 200 a 10,000 pb (Bioline) a una concentración de 1 µg/µl. El gel teñido se analizó con el Software Quantity One.

4.5.4 Análisis de secuenciación

Los productos de PCR amplificados fueron enviados para su secuenciación a QUIMERA BIOLABS S. de R.L. de C.V. Las secuencias obtenidas fueron comparadas por medio de BLAST en la base de datos del GenBank (banco de genes) para determinar su similitud. Una vez obtenidas las secuencias con el mayor porcentaje de similitud y de cobertura se determinó su identidad. Se ajustó la longitud de las secuencias a 219 pb y se alinearon con las secuencias de conceso obtenidas de los genes de interés amplificados para la realización de un árbol filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining por medio del modelo de Tamura (Kumar *et al.*, 2008) con ayuda del programa MEGA 6.

Capítulo 5

5. Resultados

5.1 Caracterización del grado de lesión de la concha

El tamaño promedio de las conchas analizadas en el presente estudio fue de 47.5 ± 10.7 mm de largo y 33.8 ± 7.4 mm de ancho. En cuanto a la ubicación de los daños, cumpliendo con lo descrito en el cuadro clínico, las perforaciones se presentaron en el área de la espira como se observa en la Figura 5. El porcentaje de cobertura de estas perforaciones alcanza valores desde 0.98% hasta un 7.14% de la superficie total de la concha con una media de 2.5 y una mediana 2.3%.



Figura 5. Perforaciones en la concha de abulones rojos.

5.2 Identificación de poliquetos espiónidos

5.2.1 Identificación por taxonomía convencional

Se encontraron fragmentos vivos con una coloración anaranjada y otros con una cubierta blanquecina, indicador de un posible proceso de descomposición, estos últimos no fueron utilizados para su identificación taxonómica pero si fueron fijados junto al resto para su identificación por análisis de ADN. Una vez fijados en etanol al 70% todos adquirieron una coloración similar al amarillo pálido. Los trozos de gusanos perforadores recuperados tuvieron un tamaño de 2 mm–5 mm y pese a que el número de segmentos se mantuvo variable entre los mismos, fue posible realizar una identificación hasta género.

Descripción: Los fragmentos se muestran comprimidos dorsoventralmente y se distinguen regiones como la cabeza, que se encuentra bien diferenciada del resto del cuerpo, el cual se va estrechando hacia la región posterior. En la zona cefálica se observa un prostomio redondeado, al menos con un par de ojos y una carúncula prominente. Las branquias se encuentran presentes antes del quinto segmento setífero y en la parte exterior, parcialmente unidas a las mismas, se observan estructuras como los parápodos que se forman por notópodos compuestos por laminillas notopodiales; además se observan las fascículas setales, que constituyen el arreglo de las setas (Figura 6). Entre las características que se observan en las imágenes están también los palpos, que surgen emparejados dorsalmente al final de la región del peristomio, estas estructuras presentan una coloración similar a la del resto del cuerpo pero son de apariencia translúcida y funcionan como órganos sensoriales; al otro lado se observa la mancha ocular y al final del cuerpo en la región más estrecha se ubica el pigidio que es la región posterior post segmental donde se encuentra el ano seguido, en algunas ocasiones, de estructuras como cirros (Figura 6).

La primera diferenciación se puede observar a partir de la modificación del quinto setífero, ya que este puede o no estar modificado según el género, hasta este punto los organismos se ubican entre los géneros *Boccardia* y *Polydora*. El segundo punto importante para su diferenciación es la presencia o ausencia de branquias antes del

quinto setífero, en este caso se observa que corresponden a ejemplares del género *Boccardia*.

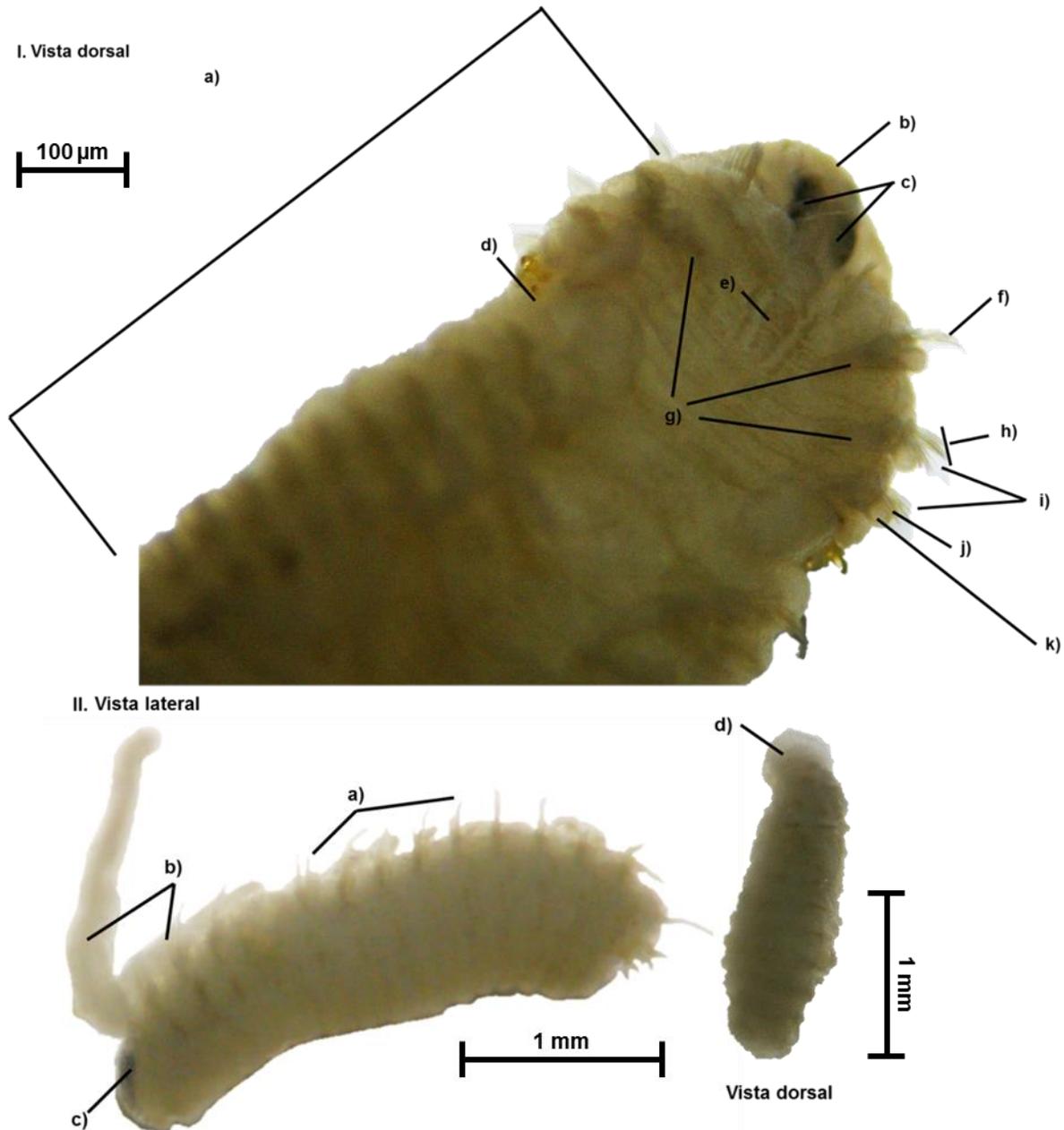


Figura 6. Estructuras de poliquetos. I. Vista dorsal de los gusanos perforadores, se observa: a) metastomio (sección del cuerpo entre prostomio y el pigidio pero que no los incluye); b) prostomio redondeado; c) ojos; d) quinto setífero modificado; e) carúncula; f) setas; g) branquias; h) fasícula setal; i) parapódos; j) laminillas notopodiales y k) notópodos. II. A la izquierda se presenta una vista lateral de los gusanos perforadores donde se observan: a) parapódos; b) palpos y c) mancha ocular y a la derecha en la región posterior se observa: d) pigidio.

5.2.2 Identificación de poliquetos espiónidos por análisis de ADN

El análisis de secuenciación mostró la longitud total de las secuencias así como la composición nucleotídica. La comparación de secuencias realizada con el GenBank mostró una alta semejanza de todas las muestras con la especie *Boccardia proboscidea*. Los valores de cobertura así como de identidad se pueden observar en la tabla 5.

Tabla 5. Comparación por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de las secuencias de espiónidos aislados de la lesión en concha de *Haliotis rufescens* con las bacterias del GenBank

Número de acceso en el GenBank	Posible especie(s)	Cobertura	Identidad
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	96%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	94%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	99%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	92%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	93%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	95%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	95%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	95%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	91%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	94%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	90%	99%
FJ434486.1	<i>Boccardia proboscidea</i>	90%	97%

5.3 Análisis histológico

El resultado del análisis histológico del tejido del cuerpo blando en contacto con el área más próxima a la perforación, así como al resto de tejidos analizados por histología convencional, mostraron un arreglo tisular normal. No se encontró evidencia de daños celulares que pudieran sugerir alteraciones en el tejido debido a la infestación por poliquetos perforadores, ni deterioros por la presencia de bacterias como se puede observar en la Figura 7.

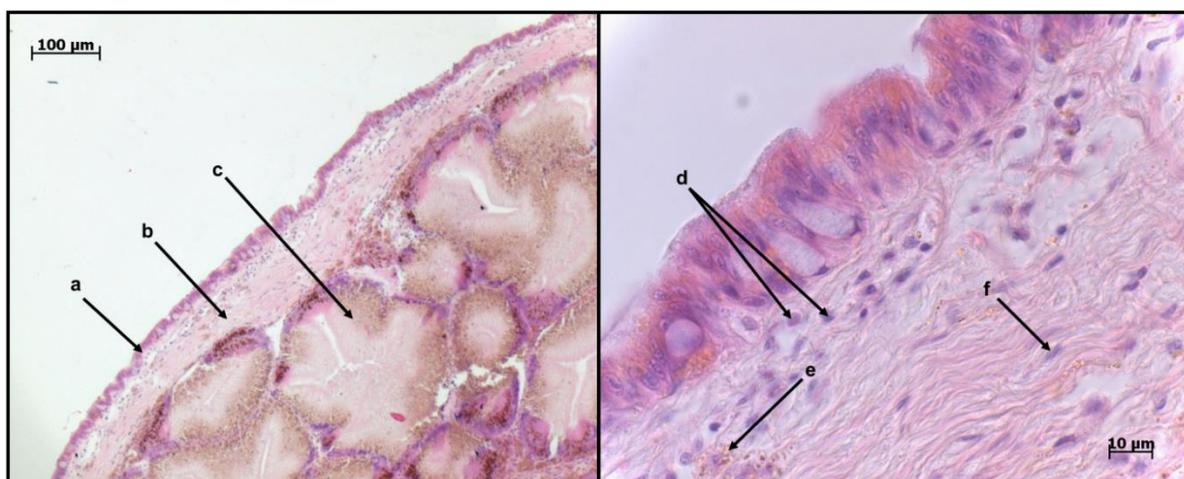


Figura 7. Histología del tejido próximo a la perforación en concha del abulón rojo. A la izquierda, arreglo del tejido cercano a la lesión: (a) Epitelio externo, (b) Tejido conectivo. (c) Divertículo digestivo. A la derecha, acercamiento del epitelio externo: (d) Hemocitos redondeados, (e) Gránulos enzimáticos y (f) Célula normal del tejido conectivo con núcleo bien definido.

5.4 Análisis bacteriológico

Del aislamiento de las bacterias realizado en los ejemplares de abulón rojo se obtuvieron 27 colonias de bacterias diferentes, de las cuales nueve estuvieron presentes en al menos dos zonas de todos los ejemplares analizados (Tabla 6). La mayoría de ellas no fueron exclusivas de una zona, es decir, que las colonias encontradas en los ejemplares estuvieron presentes en al menos dos de las zonas de análisis. Las pruebas convencionales de identificación como Tinción de Gram, KOH, oxidasa, catalasa, motilidad, crecimiento en NaCl y sensibilidad al agente vibriostático 0/129, indican que se tratan de colonias gram negativas, todas ellas con forma de bacilos cortos y presentan sensibilidad al agente vibriostático 0/129 por lo que fueron señaladas como miembros del género *Vibrio*.

Tabla 6. Ubicación de las cepas aisladas de ejemplares de abulón rojo

Cepa	Perforación	Cara interna	Tejido
1	x		x
2	x	x	
3	x		x
4	x	x	
5	x	x	
6	x		x
7	x	x	
8		x	x
9	x	x	

5.4.1 Análisis molecular: Amplificación del gen 16S ADNr

De las nueve colonias que fueron sensibles al agente vibriostático 0/129, se amplificó el gen 16S ADNr, cuyo fragmento fue de aproximadamente 1,500 pb (Figura 8).

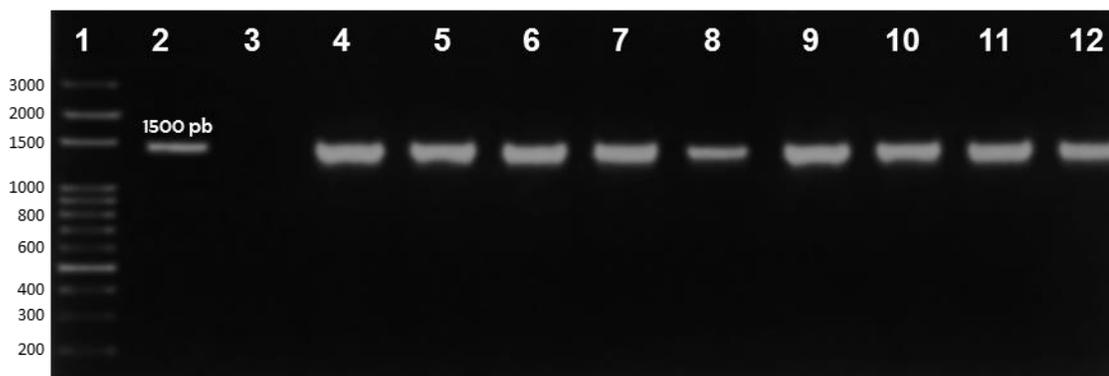


Figura 8. Resultado de la técnica de PCR para la detección del gen 16S ADNr. Carril 1 Marcador de peso molecular Hyper Ladder I (BIOLINE 100 lines); Carril 2 Control positivo (ADN genómico de *Vibrio* sp.); Carril 3 Control negativo (Agua grado molecular estéril) y del Carril 4 al 12 Muestras.

5.4.2 Análisis de secuenciación

El análisis de secuenciación mostró la longitud total de las secuencias así como la composición nucleotídica. Debido a superposiciones observadas en las secuencias de los cromatogramas los fragmentos fueron recortados, excluyendo esas secciones superpuestas, para realizar una mejor identificación. La comparación de secuencias realizada con el GenBank mostró una alta semejanza entre especies del género *Vibrio* y con *Shewanella*. Los valores de cobertura así como de identidad se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de las secuencias de bacterias obtenidas del gen 16S ADNr aisladas de *Haliotis rufescens* con las bacterias del GenBank

Cepa	Longitud del fragmento	Número de acceso en el GenBank	Posible especie(s)	Cobertura	Identidad
1	409	NR_114234.1	<i>Shewanella japonica</i>	100%	99%
		NR_114234.1	<i>Shewanella japonica</i>	100%	97%
2	305	NR_113182.1	<i>Vibrio jasicida</i>	99%	90%
		NR_117424.1	<i>Vibrio owensii</i>	99%	90%
		NR_118091.1	<i>Vibrio rotiferianus</i>	99%	90%
3	502	NR_118242.1	<i>Vibrio shilonii</i>	100%	97%
		NR_117681.1	<i>Vibrio mediterranei</i>	100%	97%
4	654	NR_117891.1	<i>Vibrio chagasii</i>	100%	99%
		NR_074953.1	<i>Vibrio splendidus</i>	100%	99%
		NR_044078.1	<i>Vibrio crassostreae</i>	99%	98%
5	538	NR_117681.1	<i>Vibrio mediterranei</i>	98%	94%
		NR_118242.1	<i>Vibrio shilonii</i>	98%	94%
6	644	NR_115806.1	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	100%	99%
		NR_074953.1	<i>Vibrio splendidus</i>	100%	99%
		NR_116067.1	<i>Vibrio atlanticus</i>	100%	99%
		NR_036929.1	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	100%	99%
7	554	NR_122060.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100%	99%
		NR_118569.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100%	99%
		NR_118432.1	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	100%	99%
8	479	NR_114234.1	<i>Shewanella japonica</i>	93%	99%
9	511	NR_119060.1	<i>Vibrio splendidus</i>	100%	100%
		NR_116067.1	<i>Vibrio atlanticus</i>	100%	99%

Las casillas sombreadas pretenden a especies que pertenecen al clado *Splendidus*, mantienen una relación filogenética muy estrecha (Hedlund y Staley, 2001; Macián *et al.*, 2001; Thompson, Thompson & Swings, 2003; Thompson *et al.* 2003; Faury *et al.*, 2004; Le Roux *et al.*, 2005; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Diéguez *et al.*, 2011). Esta relación se puede observar en el árbol filogenético de Neighbor-Joining, elaborado a partir de la comparación de las secuencias de las cepas aisladas y las secuencias de referencia correspondientes a las especies con mayor afinidad procedentes del GenBank (Figura 9). En este árbol se muestran los dos grupos en los que se encuentran las bacterias aisladas, el primero, el grupo de los *Vibrio* y el segundo, el de las *Shewanella*.

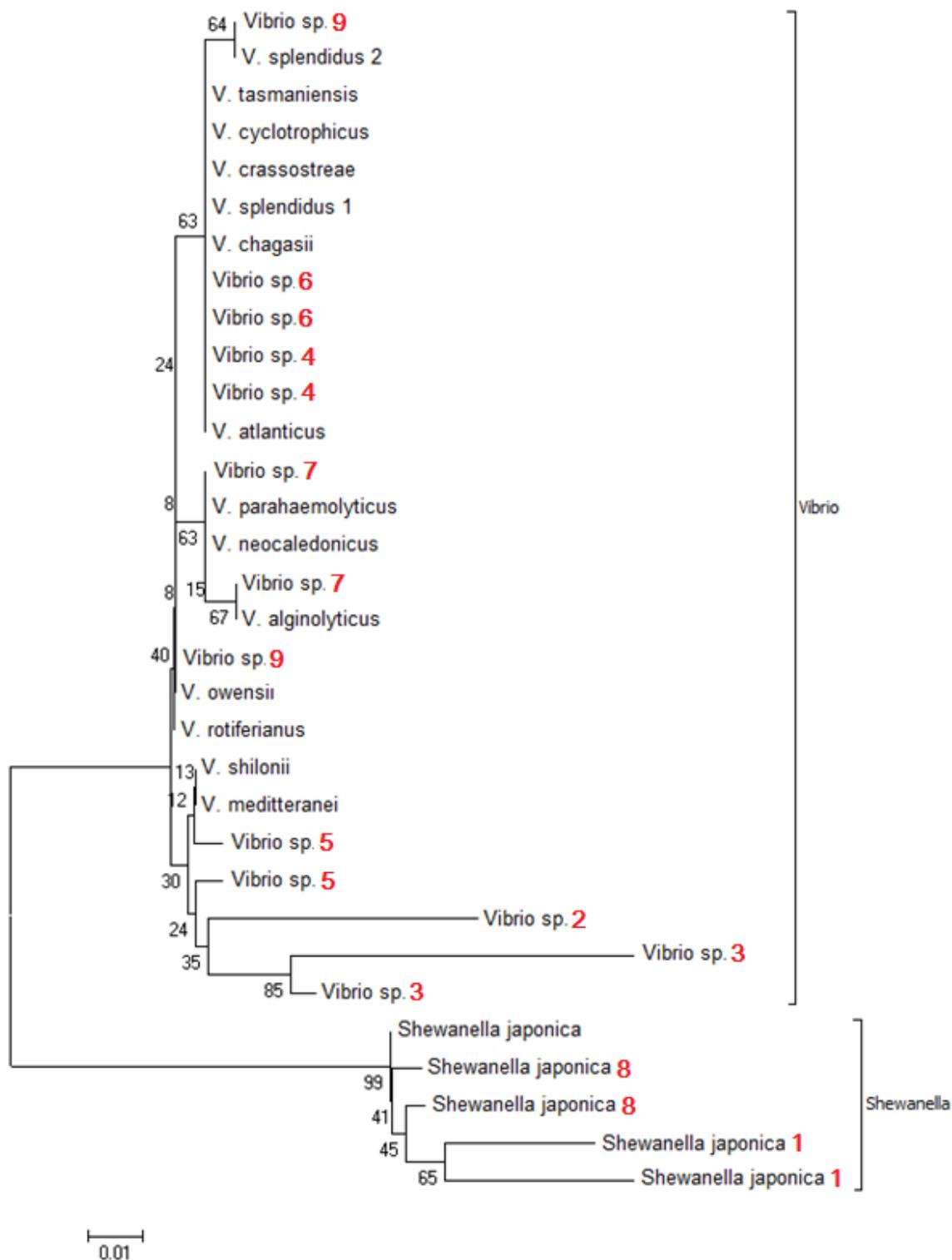


Figura 9. Árbol filogenético elaborado con el modelo de Neighbor-Joining. Secuencias obtenidas para el gen 16S ADNr de las bacterias aisladas de la lesión en concha y tejido adyacente del abulón *Haliotis rufescens* (con numeración) y secuencias de las posibles especies según el Blast del GenBank (sin numeración).

Capítulo 6

6.1 Discusiones

El desarrollo inadecuado de actividades como la acuicultura es un elemento clave en la propagación de enfermedades y en la proliferación de parásitos e infecciones bacterianas. La alteración de las condiciones ambientales sumado a deficiencias o alteraciones de la salud de los organismos cultivados, resultado de condiciones previas como, enfermedades nutricionales, problemas de estrés provocado por altas densidades de cultivo, cambios de temperatura, baja calidad del agua; así como introducción accidental de parásitos (Dixon, 1994), incrementan la susceptibilidad de los organismos a presentar nuevos padecimientos.

La presencia de poliquetos perforadores en los cultivos de moluscos puede causar daños importantes en su producción. Estos helmintos llegan a formar grandes colonias las cuales repercuten en el deterioro de las conchas de sus hospederos (Figueras y Villalba, 1988; Balseiro 2008). Sin ser parásitos verdaderos, ya que no se alimentan directamente de su hospedero, los poliquetos perforadores, especialmente los miembros de la familia Spionidae, han causado considerables pérdidas económicas en los cultivos de ostión, vieiras, ostras perleras, almejas y abulones (Culver *et al.*, 1997; Tinoco-Orta, 2001; Tinoco-Orta and Cáceres-Martínez, 2003; Cáceres-Martínez, 2003; Gallo-García *et al.*, 2007). Por tanto, existe un alto riesgo de infestación en los cultivos de moluscos, ya que estos perforadores buscan naturalmente las conchas de estos organismos para refugiarse (Martin and Britayev, 1998) y los sitios de elección para cultivo proveen el alimento necesario para la rápida colonización. Las larvas de los poliquetos prefieren grietas, huecos o líneas de crecimiento de su hospedero para asentarse y quedar protegidas en lo que excavan su propio canal (Delgado-Blas, 2003).

La infestación por espionidos ha sido relacionada con factores abióticos como temperatura, salinidad y calidad del agua; así como el tipo de equipo empleado para el cultivo y su posición en la columna de agua además de factores bióticos como la densidad de moluscos en cultivo e incluso la presencia de otros poliquetos (Lleonart, 2001);

además de deficiencias en su manejo relacionadas con la transferencia indiscriminada de especies de una región a otra, sin la aplicación oportuna de un control sanitario (Cáceres-Martínez, 2003). Las primeras infestaciones en abulones cultivados se registraron a finales de 1800 en granjas de Tasmania y del sur de Australia (Lleonart *et al.*, 2003). La colonización de los gusanos perforadores comienza con la fijación de los juveniles a la concha del molusco hospedero y con la construcción de tubos de lodo sobre la superficie que utilizan como refugio y desde donde se alimentan, al tiempo en que comienzan a perforar la concha. Lleonart y colaboradores (2003) sugieren que el impacto de las infestaciones depende de la severidad de la infestación, el tamaño del hospedero, la especie hospedera, la especie de espionido y la salud del hospedero. En otros moluscos, los problemas de la apertura de la concha o la perforación de la misma, facilita la entrada a depredadores u organismos oportunistas, incrementando la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Gallo-García *et al.*, 2007).

Se identificó por taxonomía convencional la presencia de poliquetos del género *Boccardia*, los cuáles más tarde por análisis de ADN se identificaron como *Boccardia proboscidea*, una especie muy común en el océano Pacífico (Martínez y López, 2006). Este poliqueto fue descrito originalmente por Hartman (1940) en la costa oeste de Norte América (California), desde la Columbia británica hasta Baja California (Jaubet *et al.*, 2004). No obstante se ha dispersado hacia otras regiones como el Sur de África, donde la transferencia de ejemplares de *H. rufescens* provenientes de California llevó consigo a dicho poliqueto y como consecuencia la infestación de los cultivos de *H. midae* (Simon *et al.*, 2009). Esto último, resulta interesante pues previamente el incremento en la producción de abulones cultivados en África presentaba un incremento en la incidencia de infestación de poliquetos perforadores de la concha pero de la especie *T. heterouncinata* (Simon *et al.*, 2005), misma que fue introducida accidentalmente en granjas de abulones en California (E.U.A), como epibionte del abulón *H. midae* importado de África a mediados de los 80's (Kuris and Culver, 1999).

La utilización de los diferentes sistemas y técnicas de cultivo crea un ambiente artificial que favorece no solo la presencia de gusanos perforadores sino también, la proliferación

bacteriana que toma ventaja de los cambios introducidos (Sinderman, 1990). En ambientes acuáticos las bacterias pueden representar hasta un 60% de la flora autóctona tanto de los organismos como del ecosistema, convirtiéndose en una fuente constante de posibles agentes patógenos para peces, crustáceos y moluscos (Robert *et al.*, 1996). Entre las bacterias que residen en estos ecosistemas destacan las del género *Vibrio*, al que pertenecen algunas señaladas como causantes de enfermedades y mortalidades masivas (Sindermann, 1990, Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Las patologías causadas por vibrios en moluscos se conocen desde los años 60's. Sin embargo, son escasos los estudios de su afectación en moluscos gasterópodos como abulones. En las últimas décadas se ha asociado la aparición de problemas en cultivos con la presencia de bacterias de tipo vibrio.

Entre las enfermedades de la concha más conocidas causadas por vibrios se encuentran la enfermedad del anillo marrón registrada en almejas adultas de la especie *Ruditapes philippinarum*, causada por *V. tapetis* (Borrego *et al.*, 1996), la cual ha sido ampliamente estudiada ya que es la principal enfermedad de etiología bacteriana en almejas adultas (Paillard *et al.*, 2004). Se caracteriza por alterar el proceso de calcificación en la cara interna de la concha y la aparición de un depósito marrón característico entre el borde de la concha y la línea paleal, dando formación a una especie de láminas (Borrego *et al.*, 1996; Paillard *et al.*, 1994); estas láminas de conchiolina que rodean el manto, en la superficie interna de la concha, ocasionan la retracción del manto y lesiones en el epitelio, las cuales pueden observarse como células color marrón. Sin embargo, también se ha observado en otras especies del género *Crassostrea* que el manto no presenta alteraciones (Perkins, 1996). En cuanto a los abulones, se han descrito varias enfermedades infecciosas, siendo en su mayoría producidas por infecciones bacterianas de donde se han aislado patógenos como *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, responsables de algunas mortalidades masivas (Bower, 2000). Los signos clínicos de esta enfermedad son abscesos o ulceración en el manto, manchas blancas en el pie, blanqueamiento general y pérdida de la capacidad de adhesión a superficies (Cai *et al.*, 2007).

Se han aislado cepas de vibrios de cultivo de larvas de ostión europeo, asociadas con una enfermedad compatible con la necrosis bacilar, esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de células y cilios del velo, crecimientos bacterianos alrededor de la cara interna de la concha y comportamiento anormal de las larvas (Prado *et al.*, 2005). Adicionalmente, los depósitos de materia orgánica detectados en diferentes episodios de mortalidades de moluscos, están asociados a un mecanismo de defensa, estos depósitos actúan como una barrera física contra la invasión de bacterias o algún daño físico (Paillard *et al.*, 1994). En cuanto la presencia de depósitos, se cree que este mecanismo puede estar relacionado con la presencia de *V. tasmaniensis*, otra especie de *Vibrio* que recibe su nombre al haber sido aislada de cultivos de salmón en Tasmania, la cual, aunque si bien no se han desarrollado pruebas de patogenicidad de este organismo, se ha encontrado junto a *V. splendidus* y *V. aestuarianus* durante episodios de mortalidad en *Crassostrea gigas* (Thomson *et al.*, 2003; Saulnier *et al.*, 2010). A nivel histológico se ha observado un arreglo en los tejidos que asemejan unas laminillas, estas se forman cuando una lámina orgánica en contacto con la cara interna de la concha, que constituye el periostraco, se alterna con capas de tejido granulomatoso, que se forma como consecuencia de la incapacidad de las células para eliminar totalmente a las bacterias (Comps *et al.*, 2001).

Los resultados de este proyecto mostraron la presencia de varias especies del género *Vibrio*, un género habitual de los ecosistemas marinos. Si bien las cepas obtenidas no pudieron identificarse hasta llegar al nivel de cepa o variedad, dada la longitud de los fragmentos analizados tras su secuenciación, deleciones en el fragmento, así como poca diferencia entre sus nucleótidos; si fue posible realizar una aproximación de las especies con las que muestran una estrecha relación filogenética. Cabe destacar que miembros del género *Vibrio* han sido descritos como agentes patógenos oportunistas y se ha demostrado su afectación en todos los estadios del ciclo de vida de los moluscos bivalvos, desde larva hasta adulto (Allam *et al.*, 2002). Las especies de vibrios obtenidas en este trabajo coinciden con: *V. chagasii*, *V. crassostreae*, *V. cyclitrophicus*, *V. atlanticus*, *V. tasmaniensis* y *V. splendidus*; pertenecientes al clado Splendidus. Dentro de este clado podemos resaltar a *V. splendidus* y *V. tasmaniensis* que han sido relacionados con enfermedades que se caracterizan por producir depósitos anómalos de materia orgánica

sobre la superficie interna de las valvas y una coloración café del tejido del manto en las partes en contacto con dichos depósitos (Eltson *et. al.*, 1982; Paillard *et. al.*, 1994; Perkins, 1996; Comps *et. al.*, 2001; Gay *et. al.*, 2004). De acuerdo con estas características, los depósitos marrones producidas por estos vibrios, coinciden con lo observado por los productores de la granja de Abulones Cultivados.

De acuerdo con lo encontrado en este trabajo, el cuadro clínico de la lesión en concha del abulón rojo, presenta un cuadro típico de infestación por espiónidos. Estas perforaciones incrementan la susceptibilidad de los abulones cultivados a infecciones bacterianas de las que más adelante podrían derivar otras alteraciones como los padecimientos relacionados con vibriosis, tales como las que se han originado por miembros del género *Vibrio*, siendo *V. splendidus* el principal responsable en el desarrollo de alteraciones en el cuerpo blando, seguido de *V. tasmaniensis*, al cual se le relaciona con los depósitos marrones de conchiolina y principalmente con la degeneración del tejido del manto. Sin embargo, dada la alta similitud entre las secuencias analizadas de cada una de las cepas aisladas, no fue posible su identificación precisa, por lo que se sugiere, profundizar en su caracterización para confirmar su identidad y su relación con las especies involucradas en el posible desarrollo de enfermedades secundarias.

Por otro lado, se detectó además la presencia de una bacteria oportunista identificada como *Shewanella japonica*. El género *Shewanella* cuenta con 12 especies de bacterias Gram negativas, asociadas principalmente con hábitats acuáticos. Originalmente *Shewanella* sp., fue nombrada como *Achromobacter putrefaciens*, posteriormente se le clasificó dentro del género de las *Pseudomonas*, subsecuentemente en el de las *Alteromonas* y finalmente en 1985 fue reclasificada en el género *Shewanella* (Ivanova *et al.*, 2001). El primer aislamiento de la especie *S. putrefaciens* se realizó a partir de material humano en 1963. En el ambiente marino, el género *Shewanella* se presenta como patógeno en peces. Sin embargo, la importancia de este recae en la salud humana. El papel de esta bacteria en procesos patológicos es poco común. El cuadro clínico de la infección comprende signos muy variados, desde el comprometimiento de la piel y del tejido subcutáneo a la bacteremia (presencia de bacterias en la sangre) hasta su evolución a úlceras (Silva *et al.*, 2010), además de gastroenteritis, celulitis e infecciones de heridas,

entre otras (Koneman *et al.*, 2006). *Shewanella* puede ser contraída al consumir o manipular alimentos contaminados, principalmente aquellos provenientes de ambientes acuáticos, o bien al entrar en contacto con áreas contaminadas. Así pues los registros de patologías en moluscos relacionadas con la presencia de esta bacteria son escasos y poco específicos, por lo que se considera importante abundar más en su estudio.

En general, las enfermedades bacterianas tienen mayor importancia durante el cultivo de larvas o juveniles que en organismos adultos, debido a las altas densidades de cultivo a las que se encuentran sometidos durante las primeras etapas y al estrés producido por las condiciones de estas explotaciones comerciales. Los resultados aquí mostrados así como los descritos por otros autores (Elston *et al.*, 1982; Perkins, 1996; Gay *et al.*, 2004; Paillard, 2004), nos alertan sobre la necesidad de adoptar medidas de bioseguridad para evitar la dispersión del problema y pérdidas en la producción, mismas que ya están siendo tomadas por los productores de abulones en el Ejido de Eréndira al separar y eliminar a los abulones que presenten este cuadro clínico. En este sentido, el presente estudio proporciona la información científica necesaria que sustenta las medidas de manejo que ya han sido establecidas.

Capítulo 7

7.1 Conclusiones

Los ejemplares de abulón rojo examinados en el presente trabajo presentaron perforaciones en el área circundante a la espira, equivalentes hasta un 7.14% de su superficie total. Estas perforaciones corresponden con las características típicas de una infestación por poliquetos perforadores y su presencia se traduce en una mayor susceptibilidad a infestaciones por otros organismos oportunistas como bacterias.

La recuperación de los fragmentos de poliquetos extraídos de las perforaciones de la concha de abulón rojo, fueron identificados por taxonomía convencional dentro de la familia Spionidae y del género *Boccardia*. Su identificación completa se llevó a cabo por análisis de ADN identificándolos como ejemplares de la especie *Boccardia proboscidea* dado el alto porcentaje de cobertura e identidad de sus secuencias. Esta es una especie de poliquetos espiónidos considerados responsables de perforaciones en la concha de abulones en la costa occidental de México y que además se sabe está presente también en abulones cultivados en Sudáfrica.

El análisis histológico mostró un arreglo celular normal en todos los ejemplares analizados. En ninguno de los casos se encontró que la lesión avanzará hasta la cara interna de la concha y por tanto entrará en contacto con los tejidos más próximos a dicha zona (epitelio externo, gónada, epitelio gonadal y divertículos digestivos). En caso de presentarse una lesión más grave podrían observarse alteraciones en la estructura de dichos tejidos, principalmente en el tejido del manto y posteriormente en el de la gónada.

En cuanto al análisis bacteriológico, por métodos convencionales, así como, el análisis de ADN utilizando la región conservada del gen 16S ADNr, se determinó que la mayoría de las bacterias presentes en las áreas aledañas a la lesión pertenecen al género *Vibrio* y aunque si bien, debido a la alta similitud de nucleótidos entre especies no fue posible discernir entre ellas para hacer una identificación de cepas o variedades, si pudo determinarse la pertenencia de algunas de estas bacterias al clado Splendidus, dentro

del cual existen vibrios como *Vibrio splendidus* que potencialmente pueden provocar infecciones secundarias de mayor gravedad.

Capítulo 8

8.1 Recomendaciones

Inicialmente como medida precautoria es necesario mantener bajas densidades de cultivo, tanto como el comercio lo permita, y realizar revisiones frecuentes para detectar a los organismos dañados. Estos organismos deben ser separados del resto para evitar el contagio a organismos no infestados.

Se sugiere además abundar en el estudio del proceso de infestación realizando muestreos en la etapa anterior a la fase de preengorda para obtener un número mayor de organismos, para confirmar las alteraciones por la presencia de gusanos perforadores en la concha de los abulones rojos, así como los daños histológicos que podrían presentarse en caso de que progresará la infestación y una posible infección bacteriana subsecuente.

En cuanto a la transferencia de organismos de un cuerpo de agua a otro así como el manejo de residuos debe hacerse bajo certificación sanitaria para evitar la dispersión de parásitos por transfaunación, sobre todo si se desconoce la carga parasitaria de los organismos.

Lista de referencias bibliográficas

- Allam, B., Paillard, C. and Ford, S.E. (2002). Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown ring disease in clams. *Diseases of Aquatic Organisms*. 48: 221-231.
- Balseiro, V.P. (2008). Diagnóstico de epizootias en moluscos de interés comercial cultivados en Galicia. Contribución al conocimiento patológico de *Haliotis tuberculata* L. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) Instituto de Investigaciones Marinas. 317 p.
- Beaz Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L. and Figueras, M.J. (2010). Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports* 2(1): 34-43.
- Beaz Hidalgo, R., Diéguez, A.L., Cleenwerck, I., Balboa, S., Doce, A., de Vos, P. and Romalde, J.L. (2009). *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the Splendidus clade with pathogenic potential for clams. *Journal of Systematic and Applied Microbiology*. 33(6): 311-315.
- Beaz Hidalgo, R., Doce, A., Pascual, J., Toranzo, A.E. and Romalde, J.L. (2009). *Vibrio gallaeicucis* sp. nov. Isolated from cultured clams in north-western Spain. *Journal of Systematic and Applied Microbiology*. 32(2): 111-117.
- Bergey, D.H., Holt, J.G., Krieg, N.R. and Sneath, H.A. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- Blake, J.A. (1981). *Polydora* and *Boccardia* species (Polychaeta: Spionidae) from western Mexico, chiefly from calcareous habitats. *Biological Society of Washington*. pp. 947-962. Recuperado de: <http://biostor.org/reference/73888>
- Blake, J.A., 1996. Taxonomic Atlas of the benthic fauna of the Santa Barbara channell. Volume 6. The annelida Part 3. Polychaeta: Orbiniidae to Cossuridae. 81-92 p.
- Blake, J.A. and Evan, J.W. (1972). *Polydora* and related genera as borers in mollusk shells and other calcareous substrates (Polychaeta:Spionidae). *California Malacozoological Society*.

- Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., García, M. and Ventosa, A. (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46(2): 480-484.
- Bower, S. (2000). Infectious diseases of abalone (*Haliotis* spp.) and risks associated with transplantation. Ed. Workshop on rebuilding abalone stocks in British Columbia. Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Sciences 130. pp. 111- 122. Recuperado de: [https://books.google.com.mx/books?id=xNSx9e5lqpYC&pg=PA111&lpg=PA111&dq=Bower+S.+Infectious+diseases+of+abalone+%28Haliotis+spp.%29+and+risk+s+associated+with+transplantation&source=bl&ots=cNVt1loT_F&sig=tkmfPNH5EhvWmuqeAQZN_cl1-sg&hl=es-419&sa=X&ei=T7FTVbq3LZProAS22YGIBA&ved=0CCQQ6AEwAA#v=onepage&q=Bower%20S.%20Infectious%20diseases%20of%20abalone%20\(Haliotis%20spp.\)%20and%20risks%20associated%20with%20transplantation&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=xNSx9e5lqpYC&pg=PA111&lpg=PA111&dq=Bower+S.+Infectious+diseases+of+abalone+%28Haliotis+spp.%29+and+risk+s+associated+with+transplantation&source=bl&ots=cNVt1loT_F&sig=tkmfPNH5EhvWmuqeAQZN_cl1-sg&hl=es-419&sa=X&ei=T7FTVbq3LZProAS22YGIBA&ved=0CCQQ6AEwAA#v=onepage&q=Bower%20S.%20Infectious%20diseases%20of%20abalone%20(Haliotis%20spp.)%20and%20risks%20associated%20with%20transplantation&f=false)
- Britz, P.J., Hecht, T., Knauer, J. and Dixon, M.G. (1994). The development of an artificial feed for abalone farming. *South Africa Journal Marine Science*. 90: 7-8.
- Cáceres Martínez, J. (2003). Gusanos perforadores de los géneros *Polydora* y *Broccardia* y su impacto en el cultivo de moluscos. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*. UAM-SAGARPA 4: 1-6.
- Cáceres Martínez, J. and Tinoco Orta, G. (2001). Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 20(2): 875-881.
- Cáceres Martínez, J., Vásquez Yeomans, R. and Flores Saaib, R. D. (2011). Intracellular prokaryote *Xenohaliotis californiensis* in abalone *Haliotis* spp. from Baja California, México. *Ciencia Pesquera* 19(2): 1-5.
- Cai, J., Li, J., Thompson, KD., Li, C. and Han, H. (2007). Isolation and characterization of pathogenic of *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology* 47(1): 84-86.
- Carta Nacional Acuícola (2013). Recuperado de: <http://www.inapesca.gob.mx/portal/publicaciones/carta-nacional-acuicola>
- Cifuentes Lemus, J.L., Torres García, P. y Frías, M.M. (1997). El océano y sus recursos. Vol. X. Pesquerías. Capítulo III. Moluscos. Pesquería del abulón. Versión online.

Recuperado de:
http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_12.htm

- Comps, M., Herbaut, C., Fougerouse, A. and Laporte, F. (2001). Progress in pathological characterization of syndrome 85 in the black-lip Pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquatic Living Resources*. 14(3): 195-202.
- Cox, K.W. (1962). California Abalones, family haliotidae. Department of fish and Game, the Resources Agency, State of California. 114-123 p.
- Cruz Flores, R. (2013). Distribución, prevalencia e intensidad de *Xenohaliotis californiensis* parásito del abulón *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata*, en la península de Baja California, México Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 80p.
- Culver, C.S., Kuris, A.M. and Beede, B. (1997). Identification and Managment of the Exotic Sabellid Pest in California Culured Abalone. California Sea Grant College System. 1-28 p.
- Delgado Blas, V.H. (2003). Los perforadores de conchas. Jornada UNAM online. Recuperado de: <http://www.jornada.unam.mx/2003/10/27/eco-polique.html>
- Diáñez, A.L., Beaz Hidalgo, R., Cleenwerck, I., Balboa, S., de Vos, P. and Romalde, J.L. (2011). *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov. isolated from the clams *Ruditapes philippinarium* and *Ruditapes decussatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61(10): 2406-2411.
- Dixon, B.A. (1994). Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*. 25(1): 60-63.
- Elston, R., Elliot, E.L. and Colwell, R.R. (1982). Conchiolin infection and surface coating vibrio shell fragility growth depression and mortalities in cultured oysters and clams *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of fish Diseases*. 5(4): 265-284.
- Enriquez, R. y Villagrán, R. (2008). La experiencia del desarrollo del cultivo de abalón (*Haliotis spp.*) en Chile: oportunidades y desafíos. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 27(1): 103-112.

- Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F.L., Gay, M., Swings, J. and Le Roux (2004). *Vibrio cassostreae* sp. nov. Isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54(6): 2137-2140.
- Figueras, A. y Villalba, A. (1988). Patología de Moluscos. Patología en acuicultura. JE Monteros an U. Labarta (eds.). Mundi-Prensa Libros,, Madrid. 327-376 p.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Soomer, C., Carpenter, K.E. y Niem, V.H. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca, Pacífico centro-oriental. Vol. I. Plantas e invertebrados.
- Friedman, C.S., Andree, K.B., Beauchamp, K.A., Moore, J.D., Robbins, T.T., Shields, J.D. and Hedrick, R.P. (2000). "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. International Journal of Systematic and Evolutionary of Microbiology. 50(2): 847–855.
- Gallo García, M.C., García-Ulloa Gómez, M., Rejón Aviña, A., Gódinez Siordia, D.E. y Díaz, A.H. (2007). Infestación de espiónidos perforadores en el ostión *Crassostrea gigas* cultivado en la Laguna de Barra de Navidad, Jalisco, México. Revista Avances en Investigación Agropecuaria. 11(3): 63-73.
- García-Ortega, A.M. 1997. Caracterización molecular de especies marinas del género *Vibrio*. Tesis de licenciatura, UABC/Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). 45 p.
- García-Ulloa Gómez, M. (2003). Aspectos generales sobre la presencia de gusanos barrenadores en el cultivo de ostión. Revista online Panorama acuícola. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/837/83711306.pdf>
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.M. and Le Roux, F. (2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Diseases aquatic Organisms. 62(1-2): 65-74.
- Geiger, D.L., and Guido, G.P. (2000). A Conchological Iconography: The Family Haliotidae. ConchBooks. Grudwerk.
- Harvel, C.D., Kim, K., Berkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R. and Grimes, D.J. (1999). Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors. Science. 285(5433): 1505-1510.

- Hedlund, B.P. and Sataley, J.T. (2001). *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov. a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(1): pp. 61-66.
- Instituto Nacional de Pesca (2014). Carta Nacional Acuícola, 2013. Recuperado de: <http://www.inapesca.gob.mx/portal/publicaciones/carta-nacional-acuicola>
- Ivanova, E.P., Sawabe, T., Gorshkova, N.M., Svetashev, V.I., Mikahailov, V.V., Nicolau, D.V. and Christen, R. (2001). *Shewanella japonica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(3): 1027-1033.
- Jaubet, M.L., Garaffo, G.V., Vallarino, E.A. and Elías, R. (2014). Invasive polychaete *Boccardia proboscidea* Hartman, 1940 (Polychaeta: Spionidae) in sewage-impacted areas of the SW Atlantic coasts: morphological and reproductive patterns. *Marine Ecology Journal*. 36: 611-622.
- Koneman, E.W., Giovanniello, O., Klajin, D. y Preciado, M. (2006). Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica Panamericana 6ta edición. 397-401 p.
- Kumar S, Nei M, Dudley, J. and Tamura K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9(4): 299-306.
- Kuris, A.M. and Culver, C.S. (1999). An introduced sabellid polychaete pest infesting cultured abalones and its potential spreads to other California gastropods. *Invertebrate Biology*. 391-403 p.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. and Nicolas, J.L. (2006). Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarius* strain 01/32. *Science direct. Microbes and infection*. 2715-2724p.
- Lauckner, G. (1980). Diseases of mollusca: Gastropoda. *Diseases of Marine Animals Book series*. Vol. 1 General Aspects, Protozoa to Gastropoda. Chapter 12. Recuperado de: <http://www.int-res.com/book-series/diseases-of-marine-animals-books/>
- Lleonart M (2001). Australian Abalone Mudworms: Avoidance and Identification. A Farm Manual. Fisheries Research and Development Corporation, Project, (98/301).

- Lleonart, M., Handlinger, J. and Powell, M. (2003). Spionid mudworm infestation of farmed abalone (*Haliotis spp.*). *Aquaculture Magazine*. 221(1): 85-96.
- Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F.L., Faury, N., Gay, M., Swings, J. and Saulnier, D. (2005). *Vibrio gigantis* sp. nov. Isolated from haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(6): 2251-2255.
- Light, W.J. (1978). Spionidae. Polychaeta. Annelida. The boxwood press. Pacific Grove, California. 1: 1-149.
- Lightner, D.V. (1985). A review of the disease of culture penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and development. Ed. In Taki Y., Primavera J.H. and Llobrera J.A., *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps* 79-103 p.
- Lluch Cota, D.B. y Hernández Vázquez, S. (2006). Desarrollo sustentable de la pesca en México Orientaciones estratégicas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 127-156 p.
- Macián, M.C., Ludwing, W., Aznar, R., Grimont, P.A., Schelfier, K.H., Garay, E. and Pujalte, M.J. (2001). *Vibrio lentus* sp. nov. Isolated from Mediterranean oysters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(4): 1449-1456.
- Martin, D. and Britayev, T.A. (1998). Symbiotic polychaetes: Review of known species. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. UCL Press. 36. 217-340 p.
- Martinez, J., Adarraga, I. y López, E. (2006). Nuevos datos del género *Boccardia* Carazzi, 1893 (Polychaeta: Spionidae) para la península Ibérica y el océano Atlántico. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 22(1-4): 53-64.
- Molina Carrillo, L.M. (2013). Expresión de genes inmunorrelacionados y de estrés térmico en abulón rojo, *Haliotis rufescens*, sintomático al síndrome de deshidratación Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 99 p.
- NOAA (1983). Histological techniques for marine bivalve mollusk, NMFS-F/NEC-25. pp. 97.

- Paillard, C., Le Roux, F. and Borrego, J.J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resource*. 17(04) 477-498.
- Paillard, C., Maes, P. and Oubella, R. (1994). Brown ring disease in the manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Annual Review of Fish Diseases*. 4: 1–22.
- Perkins, F.O. (1993). Infectious diseases of molluscs. Pathobiology of marine and estuarine organisms. Ed. Couch, J.A. & J.W. Fournie. CRC. Press. USA. pp. 255-288.
- Perkins, F.O. (1996). Shell disease in the gold lip pearl oyster, *Pinctada maxima*, and the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquatic Living Resources*. 9(02): 159-168.
- Prado, S., Romalde, J.L., Montes, J. and Barja, J.L. (2005). Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Journal of Diseases of Aquatic Organisms*. 67(3): 209-215.
- Radashevsky, V.I., and Pankova, V.V. (2013). Shell-boring versus tube-dwelling: is the mode of life fixed or flexible? Two cases in spionid polychaetes (Annelida, Spionidae). *Marine Biology*. 160(7): 1619–1624 p.
- Rainer, S. (1973). *Polydora* and related Genera (Polychaeta: Spionidae) from Otago Waters. *Journal of the Royal Society of New Zeland*. 3(4): 445-464.
- Read, G.B. (1975). Systematics and biology of polydorid species (Polychaeta: Spionidae) from Wellington Harbour. *Journal of the Royal Society of New Zeland*. 5(4): 395-419.
- Robert, R., Miner, P. and Nicolas, J.L. (1996). Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquaculture International*. 4(4): 305-313.
- Robert Thomas, L. 2005. Biology of the red abalone, *Haliotis rufescens*, in Northern California. U.S.A. Master of Science Thesis. San Jose State University. 84 p.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M. and Gracia, C. (2010). A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster

Crassostrea gigas and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial Ecology*. 59(4): 787-798.

Shaw, B.L., and Battle, I.H. (1957). The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal Zoology*. 35(3): 325-346.

Silva, A. R. D., Matos, W. B. D., Lima, J. F., Barbosa, A. V., Hofer, E., and Gonçalves, E. D. G. D. R. revista(2010). *Shewanella putrefaciens* en lesión cutánea traumática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 1(3): 125-128. Recuperado de: <http://revista.iec.pa.gov.br/>

Simon, C.A., Keiser, H. and Britz, P.J. (2005). The life history response of the abalone pest *Terebrasabella heterouncinata*, under natural and aquaculture conditions. Department of Ichthyology and Fisheries Science, Rhodes University, Grahamstown, South Africa. 147(1): 135-144.

Simon, C.A., Ludford, A. and Wynne, S. (2006). Spionid polychaetes infesting cultured abalone *Haliotis midae* in South Africa. *African Journal of Marine Science*. 28(1): 167-171.

Simon, C.A, Thornhill, D.J., Oyarzun, F. and Halanich, K.M. (2009). Genetic similarity between *Boccardia proboscidea* from Western North America and cultured abalone, *Haliotis midae*, in South Africa. *Revista Aquaculture*. 294(1): 18-24.

Sinderman, C.J. (1990). Principal diseases of marine fish and shellfish. Ed. Academic Press, New York London.

Thompson, F.L., Thompson, C.C. and Swings, J. (2003). *Vibrio tasmaniensis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Systematic and Applied Microbiology*. 26(1): 65-69.

Thompson, F.L., Thompson, C.C., Li, Y., Gómez Gil, B., Vandenberghe, J., Hoste, B. and Swings, J. (2003). *Vibrio kanaloe* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov. from sea water and marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53(3): 753-759.

Tinoco Orta, G. (2001). Infestación del poliqueto perforador *Polydora* sp. nov. en la almeja *Chione fluctifraga* (Sowerby). Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 99 p.

- Tinoco Orta, G. and Cáceres Martínez, J. (2003). Infestation of the clam *Chione fluctifraga* by the burrowing worm *Polydora* sp nov. in laboratory conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83(3): 196-205.
- Tovar Hernández, M.A. y Yañez Rivera, B. (2012). Ficha técnica y análisis de riesgo de *Terebrasabella heterouncinata* Fitzhugh & Rouse, 1999 (Polychaeta: Sabellidae). *Invertebrados marinos exóticos en el Pacífico mexicano*. Cap.XI. 45-68, 215-233 p.
- Troell, M., Robertson-Andersson, D., Anderson, R.J., Bolton, J.J., Maneveldt, G., Halling, C. and Probyn, T. (2006). Abalone farming in South Africa: an overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socio-economic importance. *Aquaculture Magazine*. 257(1): 266–281.
- Valles Ríos, H. (2000). Análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro. *Ciencia pesquera* N° 14. 5-18 p.
- Villalva Vega, J.N. (2011). Caracterización de bacterias asociadas a las lesiones de la concha de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) cultivada en Bahía Tortugas, Baja California Sur. Tesis de maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Zar, J.H. (1974). *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 620 p.

