

Identificar la prevalencia de genes de toxinas del *Vibrio parahaemolyticus* en el ambiente marino de la zona de Mar Bravo – Salinas

Arrobo J.^a, Mendoza S.^b, Cevallos Cevallos J.^c, Monserrate L.^c

^aFacultad de Ciencias de la Vida (FCV)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 Vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil – Ecuador
jarrobo@espol.edu.ec

^bFacultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales (FIMCBOR)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 Vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil – Ecuador
smendoza@espol.edu.ec

^cCentro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 Vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil – Ecuador
jmceva@espol.edu.ec, bmoserr@espol.edu.ec

Resumen

*En el presente trabajo se analizaron la prevalencia de genes de toxinas del **Vibrio parahaemolyticus** en cepas marinas, aisladas de muestras de agua en la zona de Mar Bravo – Ecuador durante las épocas seca y lluviosa, se buscó determinar si este género bacteriano que normalmente se encuentra presente de manera natural en la zona, presenta los genes de toxinas de estudio y si son los causantes de enfermedades que afectan a las producciones acuícolas y a otras actividades pesqueras. Los objetivos de la investigación fueron determinar la presencia de las toxinas “TDH”, “TRH” y “TOX R” con la ayuda de metodología de PCR mediante el empleo de primers específicos de la parte conservada del 16S rDNA de las tres toxinas antes indicadas. Para esto se realizó la extracción de ADN de 132 cepas bacterianas sembradas en agar TCBS y TSA con sal y sin sal, cuyas características de aislamiento fueron predeterminadas antes de la investigación. Se pudo determinar que todas las cepas aisladas resultaron negativo para los genes “TOX R”, “TDH” y “TRH” en *V. parahaemolyticus* analizados.*

Palabras Claves: toxinas, *Vibrio parahaemolyticus*, cepas, 16S rDNA, Mar Bravo

Abstract

*This paper analyzed the prevalence of genes of toxins of **Vibrio parahaemolyticus** in marine strains, isolated from samples of water in the area of Mar Bravo-Ecuador during the dry and rainy season, it was sought to determine whether this bacterial genus that is normally present naturally in the area, presents the genes of study toxins and whether they are the causers of diseases affecting aquaculture production and other fishing activities. The objectives of the research were to determine the presence of toxins "TDH", "TRH" and "Tox R" with the help of PCR methodology through the use of specific firsts of the retained part of the 16s rDNA of the three toxins indicated above. For this, DNA extraction of 132 bacterial strains sown in TCBS agar and TSA with salt and without salt was performed, whose isolation characteristics were predetermined prior to the investigation. It was determined that all isolates were negative for the genes "Tox R", "TDH" and "TRH" analyzed in *V. parahaemolyticus*.*

Key words: toxins, *Vibrio parahaemolyticus*, strains, 16S rDNA, Mar Bravo

1. Introducción.

A nivel mundial las patologías han registrado millonarias pérdidas en especímenes acuícolas, con valores que superan los 3 millones de dólares en las producciones afectadas [1]. Estas infecciones están relacionadas con la época del año y condiciones climáticas manifestando una amplia distribución en diferentes habitats lo que implica manifestaciones similares en distintos hemisferios [2]. De acuerdo a los reportes las mayores enfermedades son las causadas principalmente por bacterias del género *Vibrios*, sin disminuir el impacto que los virus han causado también sobre estos cultivos.

Desde los inicios de la actividad acuícola en el Ecuador, los productores se han visto perjudicados por diversas enfermedades que atacan a las producciones, causando grandes pérdidas, en algunas ocasiones de hasta el 100% en los cultivos larvario de camarones *Litopenaeus vannamei*, esta especie se ve afectada de manera directa por la presencia de este género *Vibrio spp.* Así como de diferentes virus [3].

En la década de los 90' el cultivo más vulnerable fue el *Penaeus vannamei* [4], siendo en los años 1999 y 2000, la manifestación más grave del Virus de la Mancha Blanca (WSSV, siglas en inglés), dejando como resultado una disminución abismal de la economía del sector camaronero. En la actualidad el camarón aprendió a ser tolerante a esta infección viral, indicando que una posible acomodación viral este ha sido erradicado [5].

Sin embargo son las enfermedades causadas por bacterias las que se han mantenido latentes en los cultivos desde sus inicios hasta la fecha. Estas bacterias *Vibrionaceas* fueron las responsables de la presencia de varios síndromes en los primeros estadios larvarios, etapa de la producción en la que se aislaron las bacterias de este estudio. En estos estadios larvarios las principales enfermedades con las que se siguen manejando los sistemas productivos son las siguientes :

- Síndrome de Bolitas y Zoeas ocasionadas por los *V. harveyi* y *V. vulnificus* respectivamente [6].
- Vibriosis sistémica, causada por el *V. alginoliticus*.
- La erosión bacteriana del caparazón, causada por el *V. parahaemolyticus*.
- Necrosis del hepatopáncreas bacteriana (NHP-B), causada por el *V. parahaemolyticus*, bacterias filamentosas

(*Leucothrix mucor*) y Espiroplasmosis (*Spiroplasma penaei*) [7].

- “Síndrome de Mortalidad Temprana” o “Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática Aguda” (EMS/AHPNS) en las especies *P. monodon* y *L. vannamei*,

Los diferentes manejos acuícolas en cautiverio han favorecido las condiciones anaeróbicas que ocasionan en conjunto la secreción de ácido bilico y pH bajo, la creación de biopelículas para sobrevivir a condiciones adversas del ambiente, absorber nutrientes y resistir a antibióticos [8]. Lo que produce que se adapten a estas condiciones que son favorables para las bacterias en los sistemas productivos de larvas de camarón.

La adaptación a diversos ambientes hace que este patógeno use los factores físico – químicos para dicho fin [9]. En el medio acuático, el *Vibrio sp.*, se encuentran especialmente en el zooplancton, siendo este uno de los reservorios ambientales más importantes de estas bacterias en la naturaleza [10]. Estas bacterias pueden permanecer en estado latente o no, crecer en medios selectivos, pero esto no impide que causen enfermedades debido a que son bacterias viables no cultivables (VBNC), dando como consecuencia que el conteo de placas difiera de acuerdo a los medios de cultivo, muestreo y estacionalidad [11].

El *Vibrio parahaemolyticus* está presente en los sedimentos y en la columna de agua marina [12]. Es capaz de colonizar el intestino humano mediante vía gastrointestinal después de la ingesta de mariscos crudos o medianamente cocidos [13]; una vez que el marisco está contaminado por dicho microorganismo, puede convertirse en vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos, ya sea por la ingesta directa de estos o indirectamente consumiendo alimentos que hayan estado en el mismo hábitat o en contacto con otros animales contaminados, siendo la principal causa de gastroenteritis (diarrea, dolor de cabeza, náuseas y vómitos) [14]; [12].

Desde el año 2009, se han reportado una nueva patología que ha causado grandes pérdidas en países asiáticos casos de enfermedades relacionadas con la *Vibriosis*, tales como el “Síndrome de Mortalidad Temprana” o “Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática Aguda” (EMS/AHPNS) en las especies *P. monodon* y *L. vannamei*, dicha patología se propagó hasta llegar a México en el 2013, donde se logró identificar al causante de la enfermedad: una cepa altamente

virulenta del *V. parahaemolyticus* [15]. Análisis con iniciadores.

De acuerdo a estudios realizados por Soto et al., (2006) [16], menciona que la bioluminiscencia es una de las adaptaciones fenotípicas que ha adquirido la familia *Vibrionaceae* al usar el sistema de secreción de proteínas. Estos además cuentan con la quorum sensing, siendo un medio de comunicación bacteriana (a nivel de proteínas) que nos indica una posible detección de enfermedades en camarones por dicha adaptación ocasionando un ambiente propicio para que los *V. parahaemolyticus* que se encuentran de manera natural en el ambiente se vuelvan patógenos. Dichas adaptaciones permite la identificación de estos en relación a otros competidores del medio.

Las cepas del *V. parahaemolyticus* presentan genes de toxinas que se relacionan con las enfermedades antes descritas; estos son el TDH (hemolisina directa termoestable), TRH (hemolisina relacionada con TDH) [17] y TOX R (gen regulador del operón de la toxina) [18].

Uno de los factores más importantes en la virulencia del *V. parahaemolyticus*, es la toxina TDH, que tiene una variedad de actividades biológicas, esto incluye la actividad hemolítica, cardiotoxicidad y enterotoxicidad [19].

Las propiedades de virulencia detectadas en *V. parahaemolyticus* se dan porque la TDH y TRH se incrustan en las membranas celulares del anfitrión y alteran a estas, actúan como porinas con canales de aproximadamente 23 μm de diámetro. La inserción de estas proteínas en las membranas da una emanación no específica de cationes divalentes y afluencia de las moléculas de agua [19].

Situación Actual

El *V. parahaemolyticus*, en la actualidad, está siendo combatido por diversos antibióticos con la finalidad de reducir el riesgo de enfermedades en camarones, como la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), que ataca directamente el hepatopáncreas del organismo (ver figura 1). A pesar de la aplicación de estas sustancias, este *vibrio* ha adquirido resistencia hacia algunos antibióticos, tal es el caso de la tetraciclina [20], pero es susceptible a la colistina [21]. Hoy en día se emplea la bioseguridad tratando la enfermedad desde las semillas y reproductores, además se usa ácidos orgánicos y probióticos [22], dando animales más resistentes a las enfermedades y dichas defensas puedan ser transmitidas a las larvas.

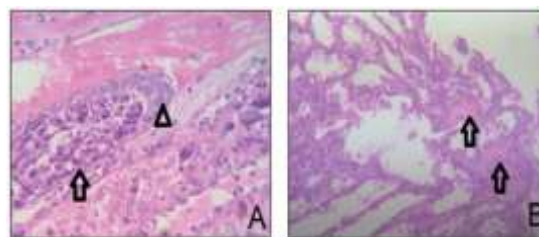


Figura 1 A. Células del hepatopáncreas sanas. B. Se evidencia destrucción de las células del hepatopáncreas. Fuente: Histopatología diferencial de enfermedades bacterianas [23]

Solo una pequeña fracción de las cepas presentes en el medio ambiente marino poseen estos factores de virulencia [24]. El surgimiento de nuevos genotipos patógenos ha ocasionado una dispersión a nivel global durante los últimos años del *V. parahaemolyticus*, causando alerta en los diferentes países del mundo, incrementando la atención de las autoridades sanitarias [25]. En el Ecuador, se adoptaron medidas para el cierre de fronteras de ingreso de productos provenientes de países infectados, o que puedan tener los vectores de virulencia de las enfermedades antes descritas.

Los brotes del *V. parahaemolyticus* tienden a concentrarse a lo largo de regiones costeras durante el verano cuando las temperaturas del agua se elevan [6], siendo un ambiente propicio para proliferar y aumentar las concentraciones de bacterias.

El agua, siendo la mayor fuente de producción de los laboratorios de larvas y camaronerías, debido a las modificaciones ambientales da como consecuencia que el camarón se estrese y posteriormente se enferme.

Para la realización de este trabajo de investigación, se ejecutaron campañas de monitoreo durante las épocas seca y lluviosa, en las que se recolectó muestras de agua en busca de la presencia de *V. parahaemolyticus*

2. Objetivos de la Investigación

2.1. Objetivo General

- Determinar la presencia de genes de toxinas en bacterias del tipo *Vibrios*, aisladas del agua marina en Mar Bravo.

2.2. Objetivos Específicos

- Aislar y cuantificar bacterias de muestras de agua de mar y de descargas de laboratorios de larvas de camarón en la zona de estudio.

- Determinar la sección 16S rADN conservada de las bacterias aisladas mediante PCR.
- Amplificar mediante primers conservados de bacterias el ADN genómico que permita buscar genes de toxinas para identificar al *Vibrio parahaemolyticus*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Tipo y diseño de la Investigación

Es una investigación de tipo exploratoria debido a que su diseño original implica averiguar si existen o no genes de toxinas de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. Es un estudio prospectivo debido a que los datos que se generaron son propios de la investigación desarrollada por el investigador, además es también considerada como aplicada con un enfoque cualitativo.

De acuerdo al número de ocasiones en la que se realizaron los muestreos es considerada una investigación longitudinal.

3.2. Sitio de Muestreo.

Todas las muestras de agua fueron recolectadas en los afluentes de agua de los laboratorios de larvas de camarón asentados en el sector de Mar Bravo, cantón Salinas, Provincia de Santa Elena – Ecuador, específicamente entre las coordenadas -2.266547, -80.928504 y -2.228389, -80.967238 (ver figura 2). Se ejecutaron 8 campañas de muestreos para la toma de muestras en siccía y cuadratura en la época seca y lluviosa, así como en el periodo de transición.



Figura 2. Área de muestreos para el proyecto.
Fuente: Google Maps

3.3. Unidad de estudio

El sector de Mar Bravo, Salinas, que al ubicarse en zona costera posee como principal actividad lucrativa el desarrollo acuícola, donde se han asentado 45 laboratorios de producción larvaria de camarón, representando el 40% larvas en el Ecuador [26]. En este mismo lugar, también se dedican a la pesca artesanal y a la extracción de sal industrial [27].

3.4. Características del lugar

La playa de Mar Bravo tiene una extensión de 17 Km. de largo, las olas en este lugar transmiten gran cantidad de energía reflejada por el fuerte oleaje que ocasiona la erosión de la playa, dichas características le dan el nombre a este sector [28].

Esta playa se encuentra en categoría “E”, debido a la presencia de una playa arenosa, su costa es rectilínea y baja, cuenta con dunas y barrera litoral [29].

Su clima oscila entre los 24 - 29°C, influenciado principalmente por las corrientes marinas, y estas a su vez, por la estación climática y los vientos [28]. Tienen un déficit hídrico muy grave porque la precipitación anual es muy poca lo que ocasiona mayor evapotranspiración [27].

3.5. Tamaño de la muestra

Para el muestreo se tomaron 7 puntos del mar a 200 metros con respecto al perfil costero en la zona de estudio, incluyendo de norte a sur, los sitios 1 y 2 fueron considerados como controles y los otros puntos referenciales con los laboratorios muestreados. Se analizaron puntos 5 puntos en el mar a mas de 200 metros con respecto a la playa, en el perfil costero en la zona de rompiente se analizaron 5 puntos, así como muestras de descargas y aguas tratadas, en los cinco laboratorios de producción de larvas de camarón seleccionados se extrajeron muestras de agua en sus descargas y descargas tratadas (figura 2).

3.6. Siembra en agar

Las muestras fueron llevadas al laboratorio en recipientes esterilizados, se mantuvieron a una temperatura de 4°C, una vez adecuadas a temperatura ambiente fueron sembradas en agares selectivos y específicos, Agar TCBS marca (DIFCO TM), (thiosulfato / citrato / sales biliares / sucrosa) donde van a teñirse de color azul verdoso o verde [17]. Agar TSA, marca (DIFCO TM) para crecimiento de bacterias totales [30].

A este último agar se le modificó la concentración de sal al 5 % más de lo que contiene, completando a 2% como concentración final y otro sin sal. Dicha modificación fue para tratar de recuperar bacterias que normalmente no crecen en medios sólidos. Se aislaron 132 cepas, las mismas fueron crío preservadas con glicerol al 15% en un congelador Thermo Fisher Scientific a temperatura de -80°C [31].

3.7. Selección de las muestras.

Las muestras se seleccionaron siguiendo las siguientes características:

- Colonias positivas en agar TCBS, tanto amarillas como verdes.
- Vibrios luminiscentes de ambos colores (“quorum sensing”).
- Colonias verdes que presenten conteos bajos y conteos altos o que indicaron baja diversidad.
- En el agar TSA se tomaron en consideración las bacterias que se repitan por sus características morfológicas.

Lo que respecta a la tinción de Gram, se usó el protocolo de Lightner (1996) [32] para poder diferenciar los Gram positivos de Gram negativos.

3.8. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico para aislados bacterianos se realizó usando el protocolo proporcionado para dicho fin [33], el cual nos permitió extraer el ADN de las muestras bacterianas sembradas en agar TSA a las cuales se les agregó Buffer TE o agua estéril para luego ser cuantificadas con la ayuda del NanoDrop 2000 y ser finalmente almacenadas en el congelador Thermo Scientific a -20°C.

3.9. PCR (Polymerase Chain Reaction).

Por tratarse de genes de toxinas se realizaron 2 programas de PCR distintos, los mismos fueron programados en el Termociclador “Mastercycler – NEXUS” marca Eppendorf. Lo que respecta a la concentración del mix de la PCR fue de 10 µl detallando en la tabla 1 los componentes de esta:

Tabla 1. Concentraciones usadas para realizar la PCR. Fuente: Autoría propia

REACTIVO	VOLUMEN POR MUESTRA
GoTaq Green	5 µl
Primer F	0,4 µl
Primer R	0,4 µl
ADN	1.0 µl
Agua	3,2 µl
Total	10 µl

3.10. Secuencia de primers

Para la elaboración de los primers se tomaron como base a los estudios de Nair et al., 2007[24] para las toxinas “TOXR” [18] y “TDH” y “TRH” [24] (ver tabla 2).

Tabla 1. Secuencias de toxinas de estudio. Fuente: Secuencias de primers [34].

Toxina	Secuencia de primer	Dirección	Tamaño del Amplicon
TOXR	5'- GTCTTCTGACG CAATCGTTG-3'	Forward	368 bp

	5'- ATACGAGTGG TTGCTGTCATG -3'	Reverse	
TDH	5'- GTAAAGGTCT CTGACTTTTGG AC-3'	Forward	269 bp
	5'- TGGAATAGAA CCTTCATCTTC ACC-3'	Reverse	
TRH	5'- TTGGCTTCGAT ATTTTCAGTAT CT-3'	Forward	500 bp
	5'- CATAACAAAC ATATGCCCAT TCCG-3'	Reverse	

3.11. Termociclador (Programas)

Para tener una amplificación de la cantidad de ADN gracias a la PCR mediante ciclos de temperaturas. En este caso de estudio se necesitó configurar con 2 programas diferentes, el uno para la toxina TOXR [18] y el segundo para las toxinas TDH y TRH [35] (ver tabla 3).

Tabla 2. Temperaturas y tiempo de estas en termociclador para amplificación de ADN mediante PCR. Fuentes: Programas de PCR [18]; [35].

Toxinas	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anidación	Extensión.	Extensión final
TOXR	96°C – 5 min.	94°C – 1 min.	63°C – 1.5 min.	72°C – 1.5 min.	72°C – 7 min.
20 Ciclos					
TDH	94°C – 3 min.	94°C – 1 min.	58°C – 1 min.	72°C – 1 min.	72°C – 5 min.
TRH	94°C – 3 min.	94°C – 1 min.	58°C – 1 min.	72°C – 1 min.	72°C – 5 min.
30 Ciclos					

4. Resultados

De las 132 cepas bacterianas de muestras de agua sembradas en agar TCBS y TSA que se extrajeron el ADN, se analizaron con la ayuda de gel de agarosa al 2% sometido a electroforesis a 120V, 400mA a 60 minutos, revelándose resultados negativos a la presencia de genes de

toxinas “TDH”, “TRH” y “TOXR” para todas las muestras con ADN bacteriano.

Se realizaron alrededor de 6 geles de agarosa para la toxina “TOXR” y 8 geles de agarosa para las toxinas “TDH” y “TRH”.

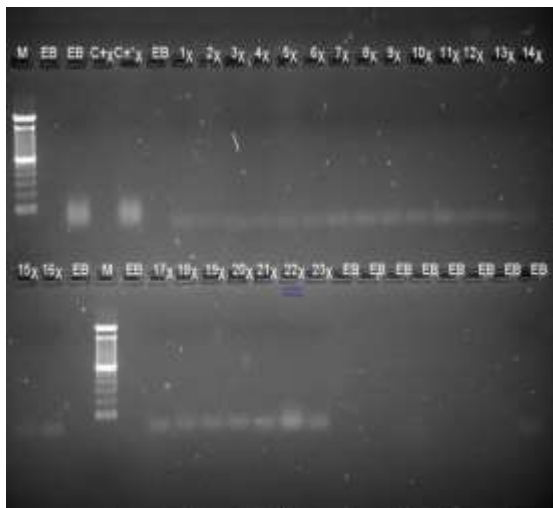


Figura 3 ADN Bacteriano con gen de toxina “TOXR”. Fuente: Figura del programa Gel Doc.

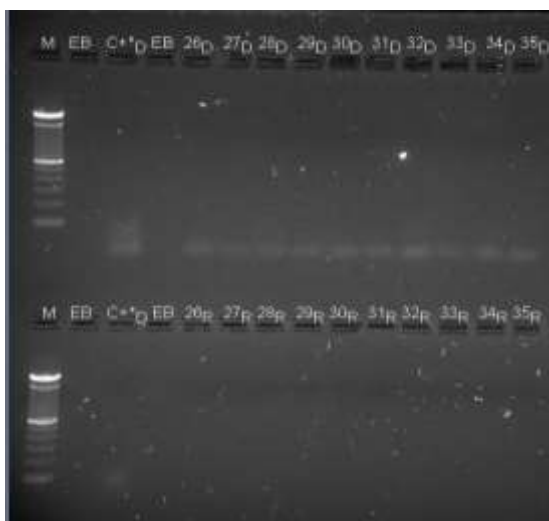


Figura 4 ADN Bacteriano con gen de toxina “TDH” y “TRH”. Fuente: Figura del programa Gel Doc.

Las figuras 3 y 4 corresponden a una muestra del total de las muestras de ADN bacteriano, las mismas muestran que no hay presencia de los genes de toxinas. Se usaron controles positivos y marcador de peso molecular de 100 bp, el control proviene de la especie *Vibrio*, el marcador sirvió para tener referencia el tamaño del amplicon como se detalló en la tabla 2 en donde tenía que salir las bandas de cada una de los genes de toxina en el caso de que estos hubiesen resultado positivos para las toxinas.

Se evidenció una amplificación diferente a los dímeros aunque no con tamaño similar a los amplicones, cabe mencionar que estas cepas mencionadas fueron resistentes a los antibiogramas realizados por estudios en paralelo a dicha investigación que aún se encuentran en desarrollo.

5. Conclusiones

- En las bacterias de agua asiladas en la zona de estudio no se encontró los genes de toxina TDH, TRH y TOX R del *V. parahaemolyticus*.
- Se debe averiguar el por qué hay mortalidades en animales de cultivo y naturales debido a la ausencia de las toxinas del *V. parahaemolyticus*.
- Gracias a la cuantificación del ADN bacteriano se pudo buscar la presencia de los genes de toxinas a pesar de que dieran negativo.

6. Recomendaciones

- Se sugiere que el método para la extracción de genes de toxinas sea realizado en muestras de agua filtrada poder evitar la pérdida de viabilidad sobre medios sólidos.
- Probar otros programas en el termociclador, en especial la temperatura de Melting, asegurándonos que sea la adecuada para los primers usados según el fabricante.
- Trabajar en toxinas de algas debido a que las mareas rojas pueden ser posible causa de enfermedades.
- Extraer los genes de toxinas no solo bacterias en el agua, sino en otros posibles vectores como los animales.
- Debido a las grandes pérdidas de los camarones, se debe realizar un estudio para determinar que microorganismos provocan eso.
- Las condiciones ambientales y factores como sensibilidad y resistencia hace que el *Vibrio* esté en el ambiente pero no se manifieste.

7. Agradecimientos

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a la investigadora Sonnya Mendoza L. Ph.D. (c) que me incentivo a realizar la presente investigación y que gracias a su apoyo incondicional he podido concluir esta investigación.

Al Ing. Joseph Villareal, el Blgo. Kevin Nieto y a la srta. Kety Anchundia que me ayudaron en cada uno de los procesos de recolección de muestras de agua en cada uno de los muestreos en la zona de estudio y en el procesamiento de estas en el laboratorio.

A los investigadores del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), permitiendo a través de la Directora del centro, la Ph.D. Daynet Sosa del Castillo, quien permitió el desarrollo de la investigación. A los técnicos investigadores del área de Fitopatología, al Ph.D. Juan Manuel Cevallos Cevallos, jefe del área de Fitopatología y a la Blga. Lorena Monserrate Maggi.

A Dios, familiares y amigos que no permitieron que me doblegue ante las adversidades.

8. Referencias

- [1] Subasinghe, R. (1997). *Fish health and quarantine. Review of the State of World Aquaculture, 1-166*. Roma, Italia: FAO, Inland Water Resources and Aquaculture Service - Fishery Resources Division.
- [2] Chowdhury, M., Yamanaka, H., Miyoshi, S. & Shinoda, S. (1990). Ecology and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic environments of a temperate region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 1-10.
- [3] Sandoval Romero, M. & Rodriguez Loaiza, N. (2012). *Caracterización de bacterias marinas presentes en suelos de piscinas camarónicas en tiempo de post-cosecha y pre-siembra, luego de la preparación de suelos mediante el método de aplicación de fuentes. (Bachelor's thesis)*. Guayaquil.
- [4] Cámara Nacional de Acuicultura. (2000). Análisis a las Exportaciones de Camarón. Enero - Julio del 2000. *Acuicultura del Ecuador. Edición* 39, 86.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. Roma: FAO.
- [6] Abd-Elghany, S. & Ibrahim, K. (2013). Occurrence and molecular identification of *Vibrio parahaemolyticus* in retail shellfish in Mansoura, Egypt. *Elsevier Ltd.*, 399 - 405.
- [7] Cuellar, J., Pantoja, C., Lightner, D., Lemos, A., Shinozaki, E., Vasconcelos, T., et al., (2014). *Guía técnica de Patología e inmunología de camarones penaeidos*. Panamá.
- [8] Hartig, C., Loffhagen, N. & Harms, H. (2005). Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Applied Environmental Microbiology* 71, 1915-1922.
- [9] Muhammad, J., Ken-Ichi, T., Shin-Ichi, M. & Sumio, S. (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters* 208, 83 - 87.
- [10] Vezzulli, L., Pruzzo, C., Huq, A. & Colwell, R. (2010). Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ Microbiol.*, 27-33.
- [11] Brown, B. & Leff, L. (1996). Comparison of fatty methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2183-2185.
- [12] Zamora, D., Quiróz, C. & Quiñónez, E. (2005). Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Digital Universitaria*, 2 - 9.
- [13] Gutierrez, C., Klein, S. & Lovell, C. (2013). High Frequency of Virulence Factor Genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio Parahaemolyticus* Strains Isolated from a Pristine Estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 2247-2252.
- [14] Chung-Saint, L., Tser-Sheng, L., Din-Yuan, Y., Yi-Cheng, S. & Yung-Hsiang, T. (2016). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood by Multiplex PCR. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17-43.
- [15] Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohney, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., et al., (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105, 45-55.
- [16] Soto, R., Simoes, N., Roque, A. & Gómez, G. (2006). Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, 258, 109-115.
- [17] 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. *J. Microbiol. Methods.* 36, 215-225.

[18] Kim, Y., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. & Nishibuchi, M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the toxR Gene. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 1173-1177.

[19] Yanagihara, I., Nakahira, K., Yamane, T., Kaieda, S., Mayanagi, K., Hamada, D., et al. (2010). Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin. *J. Biol. Chem.* 285, 16267-16274.

[20] Han, J., Mohney, L., Tang, K., Pantoja, K. & Lightner, D. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture.* 2, 17 - 21.

[21] Dworkin, M. & Falkow, S. (2006). *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass.* Springer.

[22] FAO. (2014). Report of FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). *Hanoi, Viet Nam.*, 25-27.

[23] Varela-Mejías, A. & Peña-Navarro, N. (2016). Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan el hepatopáncreas de camarones peneidos. *Agronomía Mesoamericana*, 27(1), 73-80.

[24] Nair, G., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S., Dutta, B. & Sack, D. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev.* 20(1), 39-48.

[25] Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R. & Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), 7-18.

[26] Espinoza, J. (2014). *Estudio microbiológico del agua en diferentes puntos de recorrido de un laboratorio de larvicultura. Previo a la obtención de título de Acuicultor, Facultad de Ingeniería Marítima, Escuela Superior Politécnica del Litoral.* Guayaquil.

[27] Camposano, F., Soto, K. & Parrales, C. (2007). *Caracterización y propuesta técnica de la acuicultura en el sector de Mar Bravo Salinas.*

Guayaquil - Ecuador.: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

[28] Vera, D. (2009). *Establecimiento de una base de información biológica sobre los varamientos de tortugas marinas ocurridos en la playa de Mar Bravo, Salinas - Ecuador, Junio - Diciembre/2008.* La Libertad - Ecuador: UPSE.

[29] Ottmas, F. (1967). Introducción a la Geología Marina y Litoral. En M. de Miro, *Curso de Geología Marina. Programa de Investigación y Exploración Oceanográfica 1971-1975.* (pág. 6). EUBEDA.

[30] Lee, C. & Pan, S. (1993). Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology*, 139, 3225-323.

[31] Morrison, D. (1979). Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. *Methods Enzymol*, 68:326-31.

[32] Lightner, D. (1996). *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp.* World Aquaculture Society.

[33] Frederick, A., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., et al. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

[34] Alam, M., Tomochika, K., Miyoshi, S. & Shinoda, S. (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters* 208, 83-87.

[35] Honda, T. & Lida, T. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins. *Rev. Med. Microbiol.* 4., 106 - 113.