



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA MARÍTIMA CIENCIAS**  
**BIOLÓGICAS, OCEANOGRÁFICAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**

*“DISEÑO DE UN MÉTODO MPN-PCR PARA MONITOREO DE *VIBRIO*  
*PARAHAEMOLYTICUS* EN LOS SISTEMAS DE *LITOPENAEUS VANNAMEI*”*

**INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR**

Previa a la obtención del Título de:

**INGENIERO EN ACUICULTURA**

Marco Vinicio Alvarado Molina

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitir terminar esta gran experiencia dentro de la Escuela Superior Politécnica “E.S.P.O.L” la cual me permitió formarme para la vida profesional.

Agradezco a mis padres por todo su cariño porque supieron estar conmigo en todo momento.

A todas las personas que me ayudaron a finalizar este proyecto.

A Marcelo Muñoz Ph.D. por ser un gran guía y maestro.

A Fabrizio Marcillo. M.Sc por su guía y apoyo para poder llevar a cabo este trabajo.

A todos mis amigos de la Universidad que me apoyaron para poder finalizar la materia integradora.

## **DEDICATORIA**

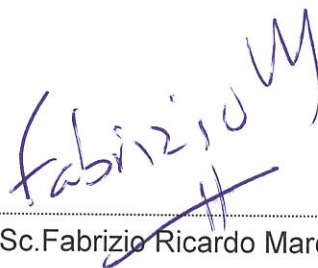
El presente proyecto lo dedico de manera especial a mis padres Néstor Bolívar Alvarado y María Molina Alvarado por siempre preocuparse de mi bienestar y fomentar en mí lo importante que es la educación; a mis tres hermanos Néstor Alvarado, David Alvarado y Teresita Alvarado por su apoyo diverso e incondicional a lo largo de mi ciclo universitario.

Le dedico este esfuerzo a mis seres queridos que no están a mi lado, a mi abuela Rosa Elena Alvarado Robles y a mi abuelo Elías Jacinto Molina Robles.

## TRIBUNAL DE EVALUACIÓN



Ph.D. Marcelo Segundo Muñoz Naranjo



M. Sc. Fabrizio Ricardo Marcillo Morla

PROFESOR EVALUADOR

PROFESOR TUTOR



## DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde exclusivamente; y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

  
.....  
Marco Alvarado Molina.

## RESUMEN

En este documento se va a dar a conocer el protocolo de MPN-PCR que está dando una perspectiva diferente frente a otras técnicas que ya se usan en laboratorios.

Lo que se quiere lograr es la cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* y dar soluciones rápidas para aplicarse en campo. El objetivo principal fue diseñar un métodos estándar MPN-PCR tomando en como referencia las dos metodologías ya establecidas. Primero se realizó la curva de calibración para el vibrio en el que se esta trabajando en este caso es *Vibrio parahaemolyticus*. En este segundo proceso se aplica la metodología MPN con diluciones que van desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup> con 3 replicas para cada tubos. Los tubos que tienen presencia de (turbidez), a estos se les aplica PCR. Pero en este caso se les aplico solo a las diluciones de 10<sup>-7</sup>,10<sup>-8</sup>. En el tercer paso se aplicara la metodología de extracción de ADN y PCR.

Para el protocolo de PCR se usara 2 primer Vp-flaE y Vp-flaR los cuales esta diseñados para detectar el *Vibrio parahaemolyticus* y en el calentamiento se tendrá un tiempo de 1 minuto a 95 °C. La amplificación de los productos se visualizara en electroforesis mediante gel de agarosa a 1,5%. Para finalizar se determinara si los resultados concluyen con presencia de *V. parahaemolyticus* en MPN y también en la recuperación en cajas de TCBS.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                            |                                      |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| AGRADECIMIENTOS.....                                                       | ii                                   |
| DEDICATORIA .....                                                          | iii                                  |
| TRIBUNAL DE EVALUACIÓN .....                                               | iv                                   |
| DECLARACIÓN EXPRESA .....                                                  | v                                    |
| RESUMEN.....                                                               | vi                                   |
| ÍNDICE GENERAL .....                                                       | 1                                    |
| INTRODUCCIÓN.....                                                          | 6                                    |
| CAPÍTULO 1.....                                                            | 9                                    |
| 1. Antecedentes .....                                                      | 9                                    |
| 1.1. Acuicultura del camarón ( <i>L. vannamei</i> ) en el mundo. ....      | 9                                    |
| 1.2. Impacto de la enfermedades .....                                      | 9                                    |
| 1.3. Bacterias más frecuentes en camarones de cultivo .....                | 10                                   |
| 1.3.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....                                | 11                                   |
| 1.3.2. Vibriosis.....                                                      | 11                                   |
| 1.4. Método de diagnostico de reacción en cadena de polimerasa (PCR) ..... | 11                                   |
| 1.4.1. PCR.....                                                            | 11                                   |
| 1.4.2. Método de MPN.....                                                  | 13                                   |
| 2. MATERIALES Y METODOS .....                                              | 15                                   |
| 2.1. Preparación del protocolo de MPN-PCR.....                             | 15                                   |
| 2.1.1. Viabilidad Bacteriana .....                                         | 15                                   |
| 2.1.2. Método para preparar el medio de cultivo .....                      | 15                                   |
| 2.1.3. Curva de Calibración del <i>V. parahaemolyticus</i> .....           | 16                                   |
| 2.1.4. Siembra del <i>V. parahaemolyticus</i> (MPN) .....                  | 17                                   |
| 2.1.5. Extracción de ADN bacteriano .....                                  | 19                                   |
| 2.1.6. Condiciones del método de PCR .....                                 | 20                                   |
| 2.1.7. Recuperación del <i>V. parahaemolyticus</i> .....                   | 22                                   |
| 3. RESULTADOS.....                                                         | 24                                   |
| 3.1. Determinación del Protocolo MPN-PCR .....                             | 24                                   |
| 3.2. Optimización del protocolo MPN-PCR .....                              | 25                                   |
| 3.3. Evaluación del tiempo del protocolo .....                             | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| CAPITULO 4.....          | 26 |
| 4. Conclusiones .....    | 26 |
| 5. Recomendaciones ..... | 27 |
| 6. Bibliografía .....    | 28 |
| 7. Bibliografía .....    | 28 |
| 8. Anexos.....           | 31 |

## ABREVIATURAS

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| ADN  | Ácido desoxirribonucleico           |
| Dntp | Deoxinucleotido trifosfato          |
| Pb   | Pares de bases                      |
| μL   | Micro Litro                         |
| MPN  | El método del Número más probable   |
| PCR  | Reacción en cadena de la polimerasa |
| CFU  | Unidad formadora de colonias        |
| ML   | Mililitro                           |
| DO   | Densidad óptica o absorbancia       |

## INDICE DE GRAFICOS

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Ilustración 1 Fragmento de ADN amplificado por el método de PCR. .... | 13 |
| Ilustración 2 Diluciones de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....      | 14 |
| Ilustración 3 Rotulación de la caja petri.....                        | 14 |
| Ilustración 4. Contador de colonias. ....                             | 17 |
| Ilustración 5. Termociclador. ....                                    | 19 |
| Ilustración 6. Gel de Agarosa.....                                    | 21 |
| Ilustración 7. Electroforesis .....                                   | 22 |
| Ilustración 8. Extracción de hepatopáncreas.....                      | 23 |

## INDICE DE TABLAS

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. reactivos utilizados para la elaboración del medio de cultivo. .... | 31 |
| Figura 2. Cepa de <i>vibrio parahaemolyticus</i> congelada a -80°C.....       | 31 |
| Figura 3. Siembra del <i>vibrio parahaemolyticus</i> .....                    | 32 |
| Figura 4. Preparando el medio de Cultivo. ....                                | 32 |
| Figura 5. Preparando el Autoclave.....                                        | 33 |
| Figura 6. Colocando el medio de cultivo en cajas petri. ....                  | 33 |
| Figura 7. Refrigeración de los medios de cultivo. ....                        | 34 |
| Figura 8. Medios de cultivo sólidos. ....                                     | 34 |
| Figura 9. Agua de peptona ....                                                | 35 |
| Figura 10. Diluciones del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....                | 35 |
| Figura 11. Espectrofotómetro.....                                             | 36 |
| Figura 12. Lectura de la dilución 10-1 .....                                  | 36 |
| Figura 13. Diluciones desde 10-2, 10-3, 10-4, 10-5 .....                      | 37 |
| Figura 14. Máquina para realizar conteo de colonia.....                       | 37 |
| Figura 15. Conteo de las placas .....                                         | 38 |
| Figura 16. Método de MPN.....                                                 | 38 |
| Figura 17. Diluciones desde 10-1 hasta 10-8.....                              | 39 |
| Figura 18. Agitando la dilución.....                                          | 39 |
| Figura 19. Diluciones ingresarlas en la incubadora.....                       | 40 |
| Figura 20. Dilución 10-7 .....                                                | 40 |
| Figura 21. Dilución 10-8.....                                                 | 41 |
| Figura 22. Termociclador .....                                                | 41 |
| Figura 23. Centrifugadora .....                                               | 42 |
| Figura 24. Centrifugando las diluciones de 10-7 a 10-8 .....                  | 42 |
| Figura 25. Extracción de ADN.....                                             | 43 |
| Figura 26. Preparación del Gel de Agarosa .....                               | 43 |
| Figura 27. Gel de Agarosa .....                                               | 44 |
| Figura 28. Electroforesis .....                                               | 44 |

## INTRODUCCIÓN

La técnica de número más probable (MPN) es un método para obtener estimaciones cuantitativas de bacterias de las muestras. También conocido como el método de ceros, es el principio para obtener datos (positivos / negativos) que se utilizan para estimar valores cuantitativos cultivando en porciones duplicadas de la muestra original y con esto determinar si hay presencia o ausencia de microorganismos en cada una de las muestra. En microbiología, esto se ha llegado a obtener realizando diluciones en serie de un cultivo bacteriano, dividiendo la muestra en réplicas seguido de incubación y determinación visual para cada una. La presencia de al menos un organismo en cualquiera de los tubos sembrados arrojaría un cambio bastante visible en los tubo, indicativo de crecimiento. El método MPN se basa en los supuestos de que los microorganismos en la muestra son ordenados uniformemente en la muestra y que los requisitos de crecimiento (medios e incubación) permitirán la recuperación de incluso un solo organismo posible. El método de MPN estándar en los siguientes procedimientos se usa un mínimo de 3, 5 a 10 diluciones. Cuando hay más de tres diluciones utilizadas, se recomienda que los resultados sean obtenidos de la tabla de MPN. En el intervalo de confianza del 95% representa un rango de conteos verdaderos en una muestra, según la cual hay un 95% de probabilidad de que cualquier muestra que contiene una cantidad de microorganismos dentro de ese rango produciría el mismo resultado por método de MPN. La metodología MPN es útil con las muestras donde se espera que las poblaciones microbianas se han bajas (<100 g).

En muestras con alta carga microbiana, la técnica de MPN no puede llegar a ser tan precisa como las que se obtiene por recuentos de placa de colonias que llegan a proporcionan resultados como la formación de colonias (CFU/ml) de muestra.

Indistintamente del organismo que se vaya a realizar la prueba, la sensibilidad, el conteo máximo el rango y la precisión están involucrados por los mismos factores. La sensibilidad de la técnica MPN depende del volumen combinado de muestras probadas en todas las más pequeñas porciones. El método tradicional no da el nivel de confianza que se espera. Pero el método MPN cuanto mayor sea el número de réplicas de cada volumen probado, es más preciso el número de índice MPN. La precisión del procedimiento MPN depende del número de repeticiones de cada volumen.

Con este procedimiento se va a dar solución al problema en el sector acuícola que hay en las piscinas camaroneras para poder determinar la carga bacteriana del agua que se está ingresando. Mediante la metodología MPN-PCR esto arrojará una tabla de datos.



En la industria camaronera al día de hoy ya se utilizan técnicas más avanzadas, equipos que antes no se podían usar ya sea por el costo o porque simplemente no existían para poder hacer un diagnóstico rápido en campo. Sin embargo, el *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria patógena que se ha asociado al síndrome de mortalidad temprana (EMS) también conocida como enfermedad de necrosis hepatopancreática (AHPND) que causa alta mortalidad en las granjas de camarón. (Leda Restrepo, 2016).

Se ha necesitado de técnicas más precisas para poder tener resultados más rápidos y confiable como es la técnica del PCR (Tamay de Dios L, 2013). La PCR es una técnica molecular que incluye la idea básica de sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN. (Pinilla, 2009) El método de PCR es más rápido y preciso, pero no se lo hace en campo. En camaronera se realizan periódicamente, análisis de patología en fresco para determinar el estado de salud de los animales cultivados. La sintomatología macroscópica que nos indica una posible enfermedad en los camarones se da por la coloración rojiza del animal, lesiones necrotizantes en el exoesqueleto, nado errático (en espiral), crecimiento reducido, coloración pálida o blanquecina del HP, tamaño del HP notablemente reducido (atrofia), textura blanda del exoesqueleto (frecuentemente), intestino con presencia entrecortada de alimento. (Cuellar-Anjel, 2013). A nivel microscópico, podemos observar deformación de los túbulos del hepatopáncreas, así como formación de nódulos hemocíticos, y necrosis o melanosis en el tejido del hepatopáncreas.

Con la sintomatología que está presente se puede aplicar un tratamiento a las piscinas de engorde que se han visto mayormente afectadas. La vibriosis puede ser de transmisión vertical y horizontal, dándose la primera en instalaciones de maduración y larvicultura. (Cuellar-Anjel, 2013). Y la segunda se da en estanques de engorde.

El desarrollo de esta técnica para acuicultura será de un impacto positivo porque permite la cuantificación de los productos de la PCR y pueda realizarse combinando los principios de las estadísticas de MPN y la técnica de PCR. Este método de MPN-PCR se puede aplicar fácilmente con diferentes sistemas de cebadores sin un extenso trabajo de desarrollo. (V, 1997)

El objetivo de esta investigación es lograr una técnica que nos permita la determinación de la concentración de *V. parahaemolyticus* de una forma más rápida, sensible y confiable. (Blodgett, 2010)

## OBJETIVOS

Objetivo general.

Diseñar y adaptar el protocolo MPN-PCR para la determinación de la carga bacteriana del *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

Objetivos específicos.

- ✓ Desarrollar una adaptación del protocolo para la determinación del número más probable (MPN) de *V. parahaemolyticus*, utilizando la técnica PCR.
- ✓ Evaluar y comparar la técnica de MPN-PCR desarrollada frente a técnicas comunes de cultivo, para la determinación de la carga de *V. parahaemolyticus*.
- ✓ Implementar la técnica de MPN-PCR para el análisis de muestras de hepatopáncreas de camarones *P.vannamei*.

## CAPÍTULO 1

### 1. Antecedentes

#### 1.1. Acuicultura del camarón (*L. vannamei*) en el mundo.

La acuicultura ha comenzado con un crecimiento rápido y del mismo modo la captura de peces para el consumo humano. Sin embargo la acuicultura suministró tan solo el 7% del pescado se va destinado para el consumo humano (FAO, 2016).

La producción de animales de origen marino en el año 2014, originarios de la acuicultura se incremento en 73,8 millones de toneladas, a consecuencia de que la primera venta tiene un estimado de 160.200 millones de dólares. En el continente Asiático se produjo 45,5 millones de toneladas en el año 2014, con todo esto se da a entender que el 60% de la producción pesquera mundial viene de la acuicultura (FAO, 2016). El cultivo de diferentes plantas acuáticas, como ejemplo principal las algas marinas, en consecuencia ha ido aumentando velozmente y en la actualidad se practica en unos 50 países (FAO, 2016).

El aumento de mano de obra para el sector de la acuicultura se ha dado en un 17% entre 1990 y 2014 que hubo un aumento del 33%, por consiguiente se debe resaltar que en el período 2005-2010, la unión de la pesca y acuicultura no represento un aumento considerable. De manera global, el empleo en dicho sector se termino reduciendo, por este motivo hubo un descenso de 1,5 millones de pescadores con una estabilidad en el sector acuícola.

#### 1.2. Impacto de la enfermedades

Las enfermedades infecciosas en los camarones es uno de los factores que más impacta en el campo de la acuicultura y afecta al desarrollo de la industria del país que está progreso (FAO, 2012), por lo que se puede vincular la idea de las enfermedades con la calidad de agua, y aparece con un período variable. El estrés que ejerce el medio a los organismos que lo rodean, también tienen respuestas adaptativas más allá de sus posibilidades, induciendo a la alteración descomunal del organismo, logrando un pobre progreso, a su vez puede llegar a tener una enfermedad. El dominio de los parámetros ambientales y las desventajas afectan a la par al sistema inmunológico del camarón, restringiendo su eficiencia.

El estrés que provoca en las etapas iniciales son a nivel bioquímico y moleculares, incitando a un conjunto de respuestas que van a dar efectos positivos y van a estar

estructuradas en la regulación hormonal, metabolismo, osmoregulación, y esta variando la capacidad de sobrevivencia, crecimiento y reproducción de los organismos.

Aunque típicamente los organismos cultivados se observen sanos durante y poco tiempo después puede darse un periodo de estrés, y esto activa un brote de enfermedades, que da como resultado mortalidades que pueden desarrollarse más tarde en la población. Varios de los organismos cultivados pueden ser los principales portadores pasivos de un patógeno y con las condiciones estables están siendo camuflados por los mecanismos de defensa. En efecto el sistema de defensa es disminuido producto del estrés, el patógeno puede reproducirse, y sobrepasar los mecanismos de defensa y en efecto podría matar al hospedero.

El estanque para el engorde de camarón se debe tener un procedimiento altamente rotativo en donde van a interactuar, muchos factores como: salinidad, pH, temperatura, oxígeno disuelto, así como diversos nutrientes orgánicos e inorgánicos. Las asociaciones microbianas que están presentes en los estanques, son muy susceptibles a los cambios e interacciones que se dan entre estos factores y pueden ver, debido a ello, modificada su composición y número.

Un ejemplo claro es la distribución de las variables como pH, temperatura y salinidad tienen diversos valores aceptables para las distintas especies que se están cultivando, por lo cual, sus cambios pueden dar un efecto, de quiebre en el equilibrio, en muchos casos, la predominancia de organismos patógenos, los cuales podrían crecer rápidamente.

### **1.3. Bacterias más frecuentes en camarones de cultivo**

Los estudios con los cuales se llegaron a determinar los datos en los siguientes países como Colombia y Panamá (Cuellar-Anjel & 1998a), donde se proyectan resultados que proveen una sugerencia para que los cultivos de camarones se deben tener condiciones optimas con versátiles niveles de bacteria, sin el requerimiento principal de tener la presencia de signos clínicos de enfermedades.

Las bacterias pueden llegar a ser aisladas principalmente del órgano focus que es el hepatopáncreas, aunque se da casos que se puede determinar también del hemolinfa, tejido muscular, cutícula y otros tejidos (Lightner & D., 1998). Los géneros que más comúnmente sean visto por los autores son: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Flavobacterium* (B., A., & S., 2014).

El género que habitualmente asido aislado de la hemolinfa de camarones de los cultivo es el *Vibrio*. Las especies del género que más se reportan para este tejido en los camarones son *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. proteolyticus*, *V. parahaemolyticus*, entre otros (Cuellar-Anjel & 1998a).

Sin embargo, el papel fundamental que cumplen las bacterias en un estanque de camarón no solamente debe ser enfocado desde el punto de vista de las enfermedades (Zamora & Quiroz, 2005), pues todo este conjunto de microorganismos también cumplen un papel importante en el reciclamiento de los nutrientes y la degradación de la materia orgánica del estanque y contribuyen a mantener un equilibrio en la calidad del agua.

#### **1.3.1. *Vibrio parahaemolyticus***

*Vibrio parahaemolyticus* es una especie la cual contribuye a la capacidad de ocasionar enfermedades y mortalidad en organismos cultivados. Estos bacilos gram negativos tienen un rango entre 1.4 - 2.6  $\mu\text{m}$  de longitud además cuentan con un diámetro de 0.5 – 0.8  $\mu\text{m}$ , y tienen una temperatura óptima la cual se desarrollan entre 35°C a 37°C y un tiempo estimado de 10 y 12 minutos (Zamora & Quiroz, 2005).

El lugar donde habitan principalmente son en aguas marinas costeras, también en los estuarios, donde pasan un tiempo determinado en la columna de agua, en el sedimento o adherido a las superficies de los organismos, principalmente de crustáceos, sobre los que incrementa su concentración (Heitman, Zamora, & Quiròz, 2005).

#### **1.3.2. Vibriosis**

La vibriosis puede ser nombrada como “infección causada por bacterias del género *Vibrio*” (Zamora & Quiroz, 2005). Esta terminología es bastante vaga, quizás como consecuencia de los ambiguos signos que la caracterizan. Los signos y las cepas involucradas no son los mismos que se observan en la larvicultura y en la fase de engorde, por eso es necesario considerarlas por separado (Zamora & Quiroz, 2005). Pero nuestro tema principalmente se ve enfocado en el engorde de camarón.

### **1.4. Método de diagnostico de reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

#### **1.4.1. PCR**

La palabra PCR es conocido como (reacción en cadena de la polimerasa), es una técnica realizada bajo niveles controlado en laboratorio, que reproduce la habilidad innata de la célula para poder duplicar el ADN, generando múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos y llegando también ha amplificar selectivamente y exponencialmente el ADN de un organismo seleccionado (Tamay de Dios, Ibarra, & Vellasquillo, 2013).

La PCR contiene tres etapas, la primera es la fase de desnaturalización, donde la doble cadena de ADN a amplificar es separada o desnaturalizada, donde al ser aplicada altas temperaturas (generalmente llega a 95 °C) (Tamay de Dios, Ibarra, & Vellasquillo, 2013). La etapa siguiente se la llama hibridación, en este lapso o periodo los oligonucleótidos son cortos y se terminan adaptando a una región complementaria del ADN molde, otorgando una parte de la región necesaria de doble cadena, la cual va a llegar a reconocer la polimerasa. En este curso la temperatura óptima es gobernada según el equilibrio de cada uno de los dNTP's que forman parte de los *cebadores*: la temperatura tiene un rango entre 40 y 72 °C, por un tiempo aproximado de 10 a 60 segundos (Prilusky, 2003). La última etapa en la fase de extensión, la enzima se une con los dNTP's, y se puede integrar a la cadena de ADN principal, esta va en el sentido 5'- 3' a partir de los oligonucleótidos (Castro & Ana). Aquí la temperatura óptima para el beneficio de la enzima se encuentra entre 68 y 72 °C, por un tiempo que va a obedecer y tiene una dimensión en la cual la región se va a engrandecer para esto se utiliza 1 minuto por cada 1000 nucleótidos de extensión como regla general (Barlett & M.).

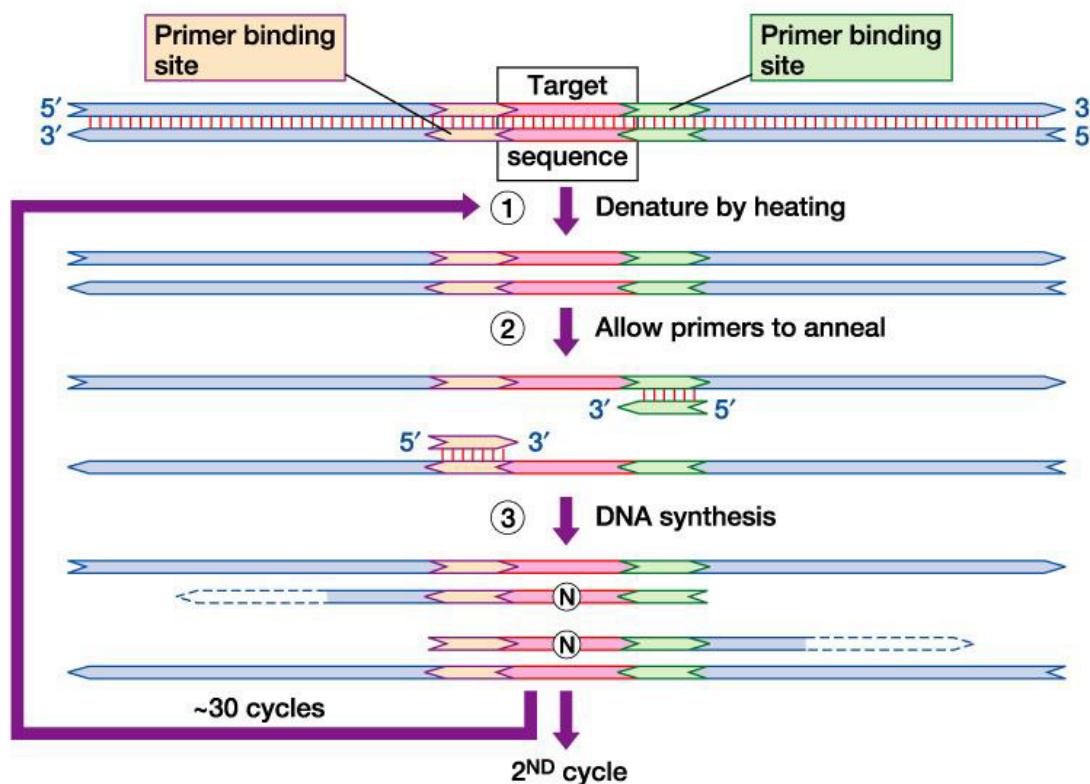


Figure 5-2 part 1 of 3 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

#### ILUSTRACIÓN 1 FRAGMENTO DE ADN AMPLIFICADO POR EL MÉTODO DE PCR.

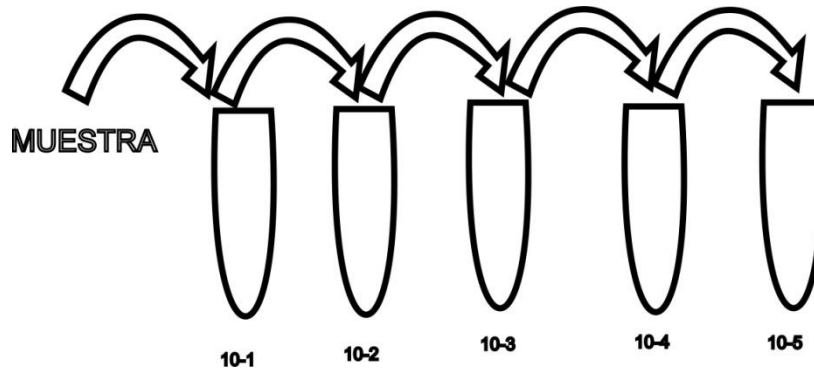
Fuente: (Strachan & Read, 2011)

El método de la PCR, en la acuicultura del Ecuador llegó a necesitarse cuando los productores tuvieron problemas de contaminación y fuertes pérdidas en los cultivos de camarón. Pero esta técnica no fue desarrollada para la detección de *Vibrio parahaemolyticus*, sin embargo fue muy bien adaptada para lo que se deseaba. Los fragmentos de ADN son amplificados por el método de PCR, lo cual se pasa a tener ADN sintetizado y se lo desnaturaliza con calor.

#### 1.4.2. Método de MPN

Esta técnica determina estimaciones cuantitativas de bacterias de las muestras. Se extraen los microorganismos viables y se prepara el caldo (agua de peptona al 2% NaCl) donde van a ser colocados en un tubo de ensayo. Este tubo madre será o tubo con el cual se partirá para realizar las diluciones.

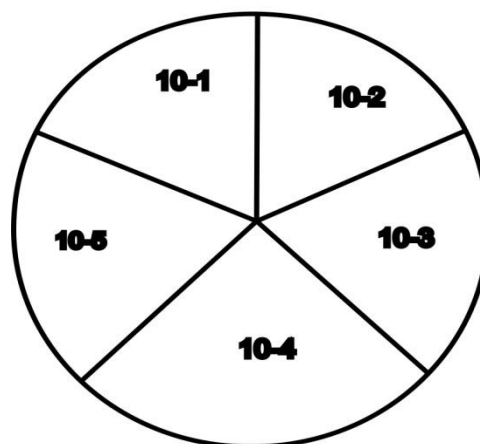
El primer tubo va a tener 9 ml de agua de peptona al 2% NaCl. Cada transferencia corresponde a una dilución de 1 en 10. Repita este siguiente procedimiento hasta lograr alcanzar la dilución requerida.



### ILUSTRACIÓN 2 DILUCIONES DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Fuente: (Marco, 2017)

En una placa petri se deberá colocar los rótulos para lograr identificar las diluciones posteriores. Una vez ya preparadas las diluciones se deberá esparcir el inoculo y dejar secar sobre el medio de cultivo como se puede apreciar en la siguiente ilustración 3



### ILUSTRACIÓN 3 ROTULACIÓN DE LA CAJA PETRI

Fuente: (Marco, 2017)



## CAPITULO 2

### 2. MATERIALES Y METODOS

Se abordó el Método de MPN-PCR que están descritos por (Tinwongger, Proespraiwong, & Thawonsuwan, 2014), para poder determinar la carga bacterianas.

#### 2.1. Preparación del protocolo de MPN-PCR

##### 2.1.1. Viabilidad Bacteriana

Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* se mantienen en congelación a -80°C como se puede observar en el anexo (Figura 1 hasta 3) .La reactivación de las cepas de patógenos se realizaron en un medio de LB mas Agar-Agar y se agrega 2% de NaCl y se incubaron a 35°C por 24 horas (Nunan & Lightner, 2014).

##### 2.1.2. Método para preparar el medio de cultivo

Se debe tener 200 ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer y se procede a pesar los medios de cultivos y el cloruro de sodio, donde se los disolverá dentro del matraz. Con el fin de llevarlo a la estufa para calentarlo durante el tiempo que se disuelve todo dentro del matraz.

TABLA 1. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE REACTIVOS

| Medios de cultivo | Cantidad |
|-------------------|----------|
| LB                | 4 gramos |
| Agar-Agar         | 4 gramos |
| Cloruro de Sodio  | 4 gramos |
| Agua destilada    | 200ml    |

Fuente: (Marco, 2017)

Se procede a trasladar el matraz a la cámara de flujo laminar para después poder tener una manipulación sin que se dañe el medio de cultivo. Se requiere que las cajas petri se las abran hasta la mitad y el matraz que contiene el cultivo líquido se agrega a las cajas vacías. A continuación se espera 20 a 30 minutos para que se solidifique el medio de cultivo y se puede observar en el anexo (Figura 4 hasta 8).

Ya para finalizar se rotula las cajas petri y se las lleva a refrigeración hasta que se realice la siembra con el *Vibrio parahaemolyticus*.

### 2.1.3. Curva de Calibración del *V. parahaemolyticus*

Inmediatamente se procede a revisar si se tiene las suficientes placas de LB+ Agar - Agar con 2% de NaCl.

Se procede a agregar 200 ml de agua destilada y se adiciona 4 gramos de NaCl en un matraz. En este paso se va a rotular 6 tubos de ensayo y adicionar 9ml de NaCl, para realizar las diluciones seriadas (Inés, Orruño, & Barcina).

Luego se procede a cerrar todos los tubos con papel aluminio y a auto clavar la solución para el trabajo. Ya una vez que se dio el auto clavado se procede a esperar que se enfríe, enseguida se saca la caja de *Vibrio parahaemolyticus* y con el asa de platino se escoge una pequeña parte de Vibrio y se la disuelve en el tubo madre (E.Coto). A partir de aquí se puede realizar las diluciones seriadas de la suspensión bacteriana y se podrá medir en el espectrofotómetro y observar en el anexo (Figuras 11 hasta la 12). Se sembrarán las diluciones 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6, 10-7, 10-8 (Arunrut & Kampeera, 2016); y se incubará a 35°C por 24 horas donde se realizara conteo de UFC/ml obtenido en las placas de medio LB+ Agar-Agar al 2% de NaCl donde se puede observar en el anexo (Figuras 13 hasta la 15). Se comparado con las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro y las cajas de siembra. La absorbancia del *V. parahaemolyticus* es de D.O.=1, 600nm ("D.O.=densidad óptica o absorbancia") (Arunrut & Kampeera, 2016). Y se realizará una curva de calibración para usarse en los ensayos siguientes. La grafica obtenida será la curva de calibración, que relaciona la absorbancia con las unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

TABLA 2. DATOS DE CURVA DE CALIBRACION

| Suspensión | Absorbancia (600nm) | Bacterias /ml     |
|------------|---------------------|-------------------|
| 1          | 0,019               | $2,89 \cdot 10^6$ |
| 2          | 0,01                | $1,87 \cdot 10^7$ |
| 3          | 0,001               | $0,97 \cdot 10^8$ |

Fuente: (Marco, 2017)

### Técnicas de Recuento

Al terminar el tiempo de incubación que será 24 horas, se realizara el recuento de colonias.

Se determinara principalmente aquellas cajas petri que tengan un rango entre 30 y 300 colonias (Izurieta Cergneux). Este número de colonias va determinado con el rango, para poder realizar un correcto conteo. Aquellas placas que tengan más de 300 colonias se reportan como "INCONTABLES" (López, Leonor, Torres, & Carola, 2006).

Con este método se procederá a contar toda la placa para determinar el número de colonias respectiva para cada placa (Camacho,, M.Giles, & A.Ortegón, 2009).

Al finalizar el conteo por el método ya explicado, se debe emplear la siguiente fórmula para poder lograr el No. de UFC/ ml o UFC/g.

Para determinar los UFC se dispondrá de esta fórmula  $\text{UFC/ml ó UFC/g} = \text{No. de colonias por placa} \times \text{el factor de dilución} \times \text{ml de la muestra sembrada}$ .



ILUSTRACIÓN 4. CONTADOR DE COLONIAS.

Fuente: (CSA)

#### **2.1.4. Siembra del *V. parahaemolyticus* (MPN)**

Se debe preparar 20 tubos de ensayo que contengan 10ml de agua de peptona al 2% NaCl (D.Eaton, S.Clesceri, W.Rice, & E.Greenberg, 2013). Se utilizan 3 tubos con 9ml de solución salina al 2% de NaCl para realizar las diluciones que se sembrarán en los tubos de agua de peptona al 2% NaCl (Chandrapati & Williams, 2014). Disponerlos como lo indica la siguiente matriz y sembrar 1ml de la suspensión bacteriana, se puede observar en el anexo (Figura 16 hasta 18). Incubar por un lapso de 24 a 48 horas a 35°C. Luego de la incubación se da lectura a los frascos, seleccionando los tubos que muestren presencia bacteriana mediante observación por turbidez. Los tubos que den positivos serán analizados mediante la técnica de PCR (D.Eaton, S.Clesceri, W.Rice, & E.Greenberg, 2013).

#### **Tabla de MPN**

TABLA 3. ESQUEMATIZACIÓN DE DILUCIONES QUE PRESENTAN TURBIDEZ (+)

| 1         | 2         | 3         |
|-----------|-----------|-----------|
| 10-1<br>+ | 10-1<br>+ | 10-1<br>+ |
| 10-2<br>+ | 10-2<br>+ | 10-2<br>+ |
| 10-3<br>+ | 10-3<br>+ | 10-3<br>+ |
| 10-4<br>+ | 10-4<br>+ | 10-4<br>+ |
| 10-5<br>+ | 10-5<br>+ | 10-5<br>+ |
| 10-6<br>+ | 10-6<br>+ | 10-6<br>+ |
| 10-7<br>+ | 10-7<br>+ | 10-7<br>- |
| 10-8<br>- | 10-8<br>+ | 10-8<br>- |

Fuente: (Marco, 2017)

**Tabla de MPN**

TABLA 4. TABLA DE PORCENTAJE DE MPN (NUMERO MÁS PROBABLE)

| Tubos Positivos |            |             |         | Tubos Positivos |            |             |         | Tubos Positivos |            |             |         | Tubos Positivos |            |             |       |
|-----------------|------------|-------------|---------|-----------------|------------|-------------|---------|-----------------|------------|-------------|---------|-----------------|------------|-------------|-------|
| 0.1<br>mL       | 0.01<br>mL | 0.001<br>mL | NM<br>P | 0.1<br>mL       | 0.01<br>mL | 0.001<br>mL | NM<br>P | 0.1<br>mL       | 0.01<br>mL | 0.001<br>mL | NM<br>P | 0.1<br>mL       | 0.01<br>mL | 0.001<br>mL | NMP   |
| 0               | 0          | 0           | <3      | 1               | 0          | 0           | 3.6     | 2               | 0          | 0           | 9.1     | 3               | 0          | 0           | 23    |
| 0               | 0          | 1           | 3       | 1               | 0          | 1           | 7.2     | 2               | 0          | 1           | 14      | 3               | 0          | 1           | 39    |
| 0               | 0          | 2           | 6       | 1               | 0          | 2           | 11      | 2               | 0          | 2           | 20      | 3               | 0          | 2           | 64    |
| 0               | 0          | 3           | 9       | 1               | 0          | 3           | 15      | 2               | 0          | 3           | 26      | 3               | 0          | 3           | 95    |
| 0               | 1          | 0           | 3       | 1               | 1          | 0           | 7.3     | 2               | 1          | 0           | 15      | 3               | 1          | 0           | 43    |
| 0               | 1          | 1           | 6.1     | 1               | 1          | 1           | 11      | 2               | 1          | 1           | 20      | 3               | 1          | 1           | 75    |
| 0               | 1          | 2           | 9.2     | 1               | 1          | 2           | 15      | 2               | 1          | 2           | 27      | 3               | 1          | 2           | 120   |
| 0               | 1          | 3           | 12      | 1               | 1          | 3           | 19      | 2               | 1          | 3           | 34      | 3               | 1          | 3           | 160   |
| 0               | 2          | 0           | 6.2     | 1               | 2          | 0           | 11      | 2               | 2          | 0           | 21      | 3               | 2          | 0           | 93    |
| 0               | 2          | 1           | 9.3     | 1               | 2          | 1           | 15      | 2               | 2          | 1           | 28      | 3               | 2          | 1           | 150   |
| 0               | 2          | 2           | 12      | 1               | 2          | 2           | 20      | 2               | 2          | 2           | 35      | 3               | 2          | 2           | 210   |
| 0               | 2          | 3           | 16      | 1               | 2          | 3           | 24      | 2               | 2          | 3           | 42      | 3               | 2          | 3           | 290   |
| 0               | 3          | 0           | 9.4     | 1               | 3          | 0           | 16      | 2               | 3          | 0           | 29      | 3               | 3          | 0           | 240   |
| 0               | 3          | 1           | 13      | 1               | 3          | 1           | 20      | 2               | 3          | 1           | 36      | 3               | 3          | 1           | 460   |
| 0               | 3          | 2           | 16      | 1               | 3          | 2           | 24      | 2               | 3          | 2           | 44      | 3               | 3          | 2           | 1100  |
| 0               | 3          | 3           | 19      | 1               | 3          | 3           | 29      | 2               | 3          | 3           | 53      | 3               | 3          | 3           | >1100 |

Fuente: (Blodgett, 2010)

Con la siguiente tabla vamos a confirmar los datos que se obtuvieron con las diluciones de (10-1,10-2,10-3,10-4,10-5,10-6,10-7,10-8), y con esto se determinara los limites de confianza, en conclusión va a depender de los numero de tubos que den positivos.

### 2.1.5. Extracción de ADN bacteriano

De los tubos de MPN que se realizaron diluciones se escoge los de 10-7,10-8. Se los lleva al laboratorio de extracción de ADN, además se tendrán preparados 3 tubos vacios por cada dilución (10-7,10-8) en cada uno de ellos se va a colocar los 50 µl.

Después de haber preparado los tubos eppendorf pequeños con las diluciones, se los ubica dentro del termociclador y se da inicio al programa donde se puede observar en el anexo (Figuras 22). De esta forma es preparado por el método de ebullición (Koch, 2011).



ILUSTRACIÓN 5.TERMOCICLADOR.

Fuente: (CSA)

Luego todos los tubos que están en el termociclador se los retira y se procede a colocar los tubos eppendorf pequeños dentro de los grandes.

Se programa la centrifugadora en a 5 minutos a una velocidad de 13000rpm y se espera que concluya el tiempo programado, y se observa en el anexo (Figura 23 hasta 24).

Por último se saca los tubos centrifugados y se prepara 6 tubos eppendorf pequeños (nuevos), donde se extraerán 30 µl del sobrenadante para usarse en la PCR (Koch,

2011). De esta forma se obtiene la extracción de ADN se puede observar en anexos (Figura 25).

### 2.1.6. Condiciones del método de PCR

Se va a la sala de PCR y se prepara el mastermix de la PCR. En la mastermix tiene (TP10x, Cl<sub>2</sub> Mg, Dntps, Primer, Taq, H<sub>2</sub>O, ADN), y conjuntamente son dos los cebador denominado Vp-flaE y tiene una secuencia (5' para 3') (GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT) y Vp-flaR (ATTATCGATCGTGCCACTCAC) (Tarr et al., 2007).

Se va a tener 8 tubos de eppendorf (nuevos), uno de ellos va a servir para preparar la mastermix-PCR. Y en el siguiente tubo se va poner agua y la master-mix este tubo va a ser nuestro control positivo.

Por último los 6 tubos sobrantes se van a colocar 24 µl y 1 µl de ADN y se procede a llevarlos al termociclador y se lo configura Vp-flag. Y se espera a que se termine el programa.

### Cálculos para la preparación de 8 tubos (PCR).

TABLA 5. ESPECIFICACIÓN DE LAS CONCENTRACIÓN DE LA PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

|                    |        |       |          |
|--------------------|--------|-------|----------|
| TP10x              | 10X    | 1x    | 20 µl    |
| Cl <sub>2</sub> Mg | 50mM   | 1,5   | 6 µl     |
| Dntps              | 10mM   | 0,2mM | 4 µl     |
| Primer             | 10mM   | 0,3mM | 6 µl     |
| Taq                | 5U/ µl | 1U    | 1,6 µl   |
| H <sub>2</sub> O   |        |       | 154,4 µl |
| ADN                |        |       | 8 µl     |

(Marco, 2017)

TABLA 6. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

| Cebador                             | Desnaturalización        | Hibridación              | Extensión                 | Número de Ciclos |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|
| Vp-flaE<br>(GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT) | 95°C durante 30 segundos | 60°C durante 30 segundos | 72°C durante 30 segundos. | 28 ciclos        |
| Vp-flaR<br>(ATTATCGATCGTGCCACTCAC)  |                          |                          |                           |                  |

### Preparación del Gel de Agarosa

Se debe pesar 0,5 gramos de agarosa y colocar 35 ml de TAE 1x, se lo diluye apropiadamente y se procede a calentarlo en el horno hasta que no presente grumos en la solución (Cortazar Martinez & Silva Rincón, 2004). Sacamos la solución de agarosa caliente y se coloca 6 µl de SYBR safe DNA se agita hasta que se homogenice bien.

Este producto se coloca en la placa base y se deja enfriar para que la agarosa este solidificada. Después de se agrega TAE 1x hasta que supere el gel por lo tanto se procede a abrir los frascos de la PCR y se extrae 15 µl y se coloca en las hendiduras creadas por las peinetas, se observa en el anexo (Figura 26 hasta 27).

Ya colocado en todas las hendiduras se agrega un marcador de peso molecular con el cual va arrojar o permitir lecturas.

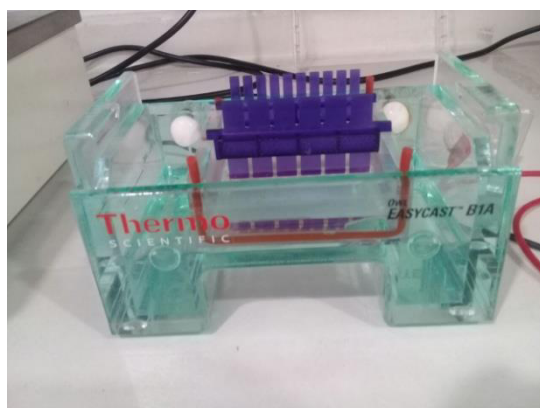


ILUSTRACIÓN 6. GEL DE AGAROSA

Fuente: (Marco, 2017)

Para finalizar se tapa la caja de gel. El cátodo (cables negros) debe estar más cerca de los pozos que el ánodo (cables rojos). Verifique nuevamente que los electrodos estén enchufados en las ranuras correctas de la fuente de alimentación y se espera 1

hora para ver los resultados. Cuando la electroforesis se complete apague la maquina y quite la tapa de la caja del gel. Retire el gel de la bandeja y exponga el gel a la luz ultravioleta, se observa en anexo (Figura 28).



ILUSTRACIÓN 7. ELECTROFORESIS

Fuente: (Marco, 2017)

#### 2.1.7. Recuperación del *V. parahaemolyticus*

Se obtiene muestras de camarón con un peso de 3 a 5 gramos aproximadamente. Se extrae el órgano foco de infección (hepatopáncreas) de los camarones y se pesa 1 gramo después se macera con un mortero y a continuación se agrega el hepatopáncreas macerado en 9 ml de agua de peptona (Cuellar, 2008). Además se prepara agua de peptona para realizar diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ .

Se deja 24 horas las diluciones de agua de peptona en la incubadora. Al día siguiente se escoge las diluciones donde allí presencia de turbidez en los tubos ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ).

Una vez se ha realizado la observación se procede a la siembra en cajas de TCBS. Para finalizar se coloca las cajas en la incubadora con una temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de 24 horas. En las caja de TCBS se observara *V. parahaemolyticus* de coloración verde (B., A., & S., 2014).





## ILUSTRACIÓN 8. EXTRACCIÓN DE HEPATOPÁNCREAS

Fuente: (Cuellar, 2008)

## CAPITULO 3

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinación del Protocolo MPN-PCR

##### 3.1.1. Curva de Calibración

La curva de calibración determino a que concentración se está trabajando con el *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, la absorbancia no es una medida directa del número de células, por lo cual es necesario realizar una curva de calibración para obtener la correspondencia entre las medidas de la biomasa en el cultivo y las de Absorbancia (medidas a 600 nm de longitud de onda). Para determinar la concentración del vibrio parahaemolyticus hicimos una dilución en serie y luego se sembraron en placa de Petri hasta la dilución de 10-6. Datos de la curva de calibración a continuación.

$$\frac{187 \text{ UFC}}{10^{-4}} = 187 \times 10^4$$

$$\frac{187 \text{ UFC}}{100 \mu\text{l}} * \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = 187 \times 10^5 \text{ UFC/ml}$$

Absorbancia del *V. parahaemolyticus* 0,450 =  $1,87 \times 10^7 \text{ UFC/ml}$

##### 3.1.2. Comparación de los tubos positivos de MPN con la Tabla

Una adaptación del protocolo descrito por (Blodgett, 2010) (Koch, 2011) y (D.Eaton, S.Clesceri, W.Rice, & E.Greenberg, 2013), se llego a estos resultados descritos que están en la tabla 3. En las diluciones se observo que en el tubo 10-6 presenta una turbidez en los tres tubos, en el siguiente tubo de 10-7 cuenta con dos tubos de turbidez, en la dilución de 10-8 tiene dos tubos de turbidez. Ya con los datos 3-2-2 se puede revisar la tabla N°4, y en esta se podrá localizar los límites de confianza máximos y mínimos del valor MPN. Se aplico la siguiente formula, valor del MPN x 10/ grado más alto de dilución, con esta aplicación de formula se dio el siguiente resultado.

$$21 \times 10 / 10^{-5} = 210 \times 10^5$$

$$2,1 \times 10^7 \text{ MPN/gr}$$

Se esta es la interpretación de los datos que se dieron en las diluciones MPN.

### 3.1.3. Observación de la Siembra de hepatopáncreas

Se sembró hepatopáncreas de camarones en agua de peptona y en 24 horas se observó que presentaba turbidez en algunos tubos, pero solo se tomaron los tubos de 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>. Lo que se sembró en cajas de TCBS para ver si había crecimiento de vibrio.

El método de PCR arrojó resultados negativos de las diluciones 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>.

Los resultados que arrojan las cajas de TCBS son vibrio presuntivo lo cual no se sabe qué tipo de vibrio se recupero del hepatopáncreas del *penaeus vannamei*.

Las diluciones que se hicieron son 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> en el cual todas había crecimiento.



ILUSTRACIÓN 9. SIEMBRA DE LA DILUCIÓN DE HEPATOPÁNCREAS EN 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>

### 3.2. Optimización del protocolo MPN-PCR

Tiene la capacidad de estimar tamaños poblacionales en base a un proceso de selectividad. La selectividad se da cuando se realiza el paso de PCR y se aplica los cebadores específicos de *V. parahaemolyticus*.

## CAPITULO 4

### 4. Conclusiones

1. El método MPN-PCR es confiable y adecuado para la enumeración de organismos.
2. Los métodos tradicionales como los medios de cultivos requieren más tiempo frente a la PCR, que solo se demora horas.
3. Tener un método para realizar la cuantificación de carga bacteriana para el *Vibrio parahaemolyticus*

## **5. Recomendaciones**

1. Antes que nada se puede utilizar el mismo protocolo y cambiar los cebadores y todo eso depende de los que se vaya a investigar.
2. El método MPN llega a determina cargas microbianas baja, pero también pueden emplearse para determina cargas mayores utilizando las diluciones apropiadas.
3. Una desventaja del método MPN, es que no detectan las poblaciones con menos de 1 célula/mililitro, sólo permite microorganismos viables.

## 6. Bibliografía

### 7. Bibliografía

Arunrut, N., & Kampeera, J. (2016). Sensitive Visual Detection of AHPND Bacteria Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined DNA-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes. *NCBI* , 12.

B. G.-G., A. R., & S. S.-R. (19 de Mayo de 2014). *ResearchGate*. Recuperado el 29 de Diciembre de 2017, de [https://www.researchgate.net/profile/Bruno\\_Gomez-Gil/publication/235636525\\_Vibriosis\\_en\\_camarones\\_y\\_su\\_diagnostico\\_vibriosis\\_in\\_shrimp\\_and\\_its\\_diagnosis/links/0fcfd51224b70b98a0000000.pdf?origin=publication\\_detail](https://www.researchgate.net/profile/Bruno_Gomez-Gil/publication/235636525_Vibriosis_en_camarones_y_su_diagnostico_vibriosis_in_shrimp_and_its_diagnosis/links/0fcfd51224b70b98a0000000.pdf?origin=publication_detail)

Barlett, D., & M., J. PCR. En *PCR Protocols Second Edition*. New Yersey.

Blodgett, R. (Octubre de 2010). *FDA*. Recuperado el 04 de Noviembre de 2017, de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>

Brito, L. (2012). *Departamento de Cultivo Celular*. Recuperado el 30 de Diciembre de 2017, de <http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/L%20Brito%20INHRR.pdf>

C. A., M.Giles, & A.Ortegón. (2009). *Técnicas para el analisis Microbiologico*. Recuperado el 29 de Diciembre de 2017, de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa\\_6527.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf)

C.-A. e., & 1. y. (s.f.). Recuperado el 30 de Diciembre de 2017, de <https://www.aboutseafood.com/sites/all/files/S-200.pdf>

Castro, P., & A. M. (s.f.). *Universidad Politecnica de Valencia*. Recuperado el 1 de Enero de 2018, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

Chandrapati, & Williams, M. (2014). Most Probable Number. *Elsevier* , 621-622.

Contreras, R. (5 de Abril de 2013). *Biología La guía*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2017, de <https://biologia.laguia2000.com/tecnicas-en-biologia/explicando-el-protocolo-de-la-pcr>

Cortazar Martinez, A., & Silva Rincón, E. P. (Junio de 2004). *UNIVERSIDAD NACIONAL*. Recuperado el 29 de Diciembre de 2017, de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>

Cuellar, J. (2008). *Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Panamá.

Cuellar-Anjel, J. (Agosto de 2013). *The Center for Food Security & Public Health*. Recuperado el 03 de Noviembre de 2017, de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>

- D.Eaton, A., S.Clesceri, L., W.Rice, E., & E.Greenberg, A. (2013). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
- E.Coto, C. (s.f.). Recuperado el 14 de Enero de 2018, de Quimicaviva: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/dilucion/dilucion.htm>
- FAO. (Junio de 2012). Recuperado el 09 de Diciembre de 2017, de <http://www.fao.org/aquaculture/en/>
- FAO. (Octubre de 2016). Recuperado el 10 de Febrero de 2018, de FAO: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- Heitman, Zamora, & Quiròz. (2005). Shrimp AHPND causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*.
- I. A., Orruño, M., & Barcina, I. (s.f.). Recuperado el 14 de Enero de 2018, de Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología: [https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/1654/mod\\_resource/content/1/Tema\\_1.\\_Diluciones\\_y\\_concentraciones.pdf](https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/1654/mod_resource/content/1/Tema_1._Diluciones_y_concentraciones.pdf)
- Izurieta Cergneux, N. (s.f.). *Recuento Bacteriano*. Recuperado el 29 de Diciembre de 2017, de <https://s3.amazonaws.com/ppt-download/laboratorio-4-recuentobacteriano-110424211045-phpapp01.pdf?response-content-disposition=attachment&Signature=xQxAC6q3j8FH3JcinQ7eCZqQDXY%3D&Expires=1512924853&AWSAccessKeyId=AKIAJ5J46ODGN4IB2ZXQ>
- Koch. (2011). Development of PCR Diagnosis for Shrimps Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) Strain of *Vibrio parahaemolyticus*. 161.
- L. T., Leonor, Torres, & Carola. (2006). *Universidad Nacional del Nordeste*. Recuperado el 29 de Diciembre de 2017, de <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>
- Leda Restrepo, B. B. (2016). Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. *Science Direct*, 143.
- Lightner, & D. a. (1998). *Elsevier*. Recuperado el 30 de Diciembre de 2017, de <https://www.aboutseafood.com/sites/all/files/S-200.pdf>
- M. A. (2017).
- Nunan, L., & Lightner, D. (2014). Detection of acute hepatopancreas necrosis disease(AHPND) in Mexico. *Researchgate*, 82.
- Pineida, A. (18 de Noviembre de 2016). *Mundo Ciencia*. Recuperado el 23 de Diciembre de 2017, de <http://mundociencia-arqueobacterias.blogspot.com/>
- Pinilla, G. (2009). PCR en laboratorio. *Nova UCMC*, 5-6.
- Prilusky, J. (2003). *BioGuide-PCR*. Recuperado el 30 de Diciembre de 2017, de <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/>

Strachan, T., & Read, A. (2011). Human molecular genetics. En *Human molecular genetics* (pág. 120). United States.

Tamay de Dios L, \*. I. (Mayo de 2013). *Medigraphic*. Recuperado el 04 de Noviembre de 2017, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Vellasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic* , 2.

Tinwongger, S., Proespraiwong, P., & Thawonsuwan, J. (2014). Development of PCR Diagnosis for Shrimp Acute. 159-160.

V, M. (20 de Mayo de 1997). *NCBI*. Recuperado el 08 de Noviembre de 2017, de [/www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)

Zamora, & Quiroz. (2005). *Vibrio. vibrio parahaemolyticus características en el entorno* , 160.



## 8. Anexos

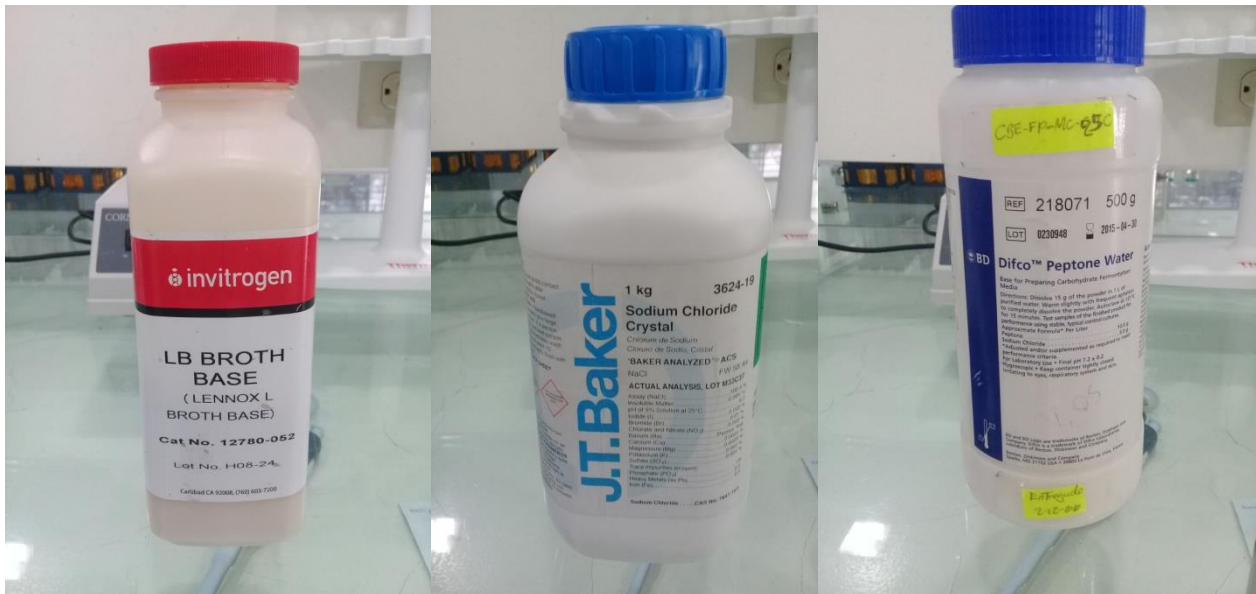


FIGURA 1. REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Fuente: (MARCO, 2017)

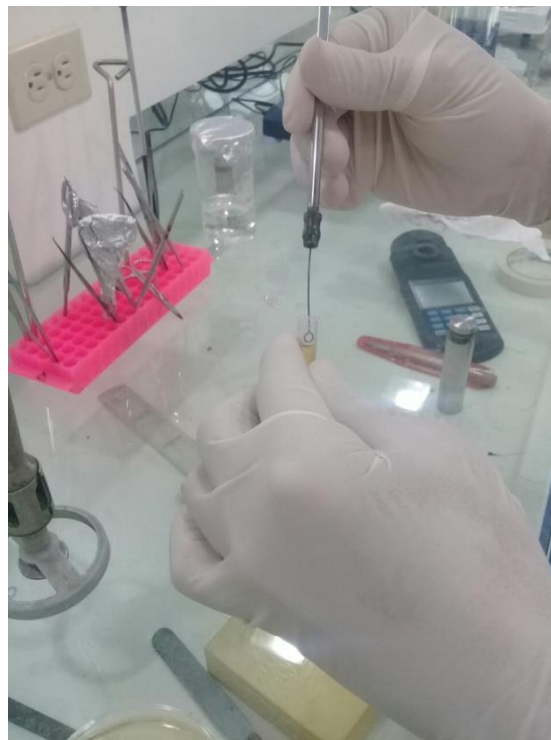


FIGURA 2. CEPA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CONGELADA A  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Fuente: (MARCO, 2017)

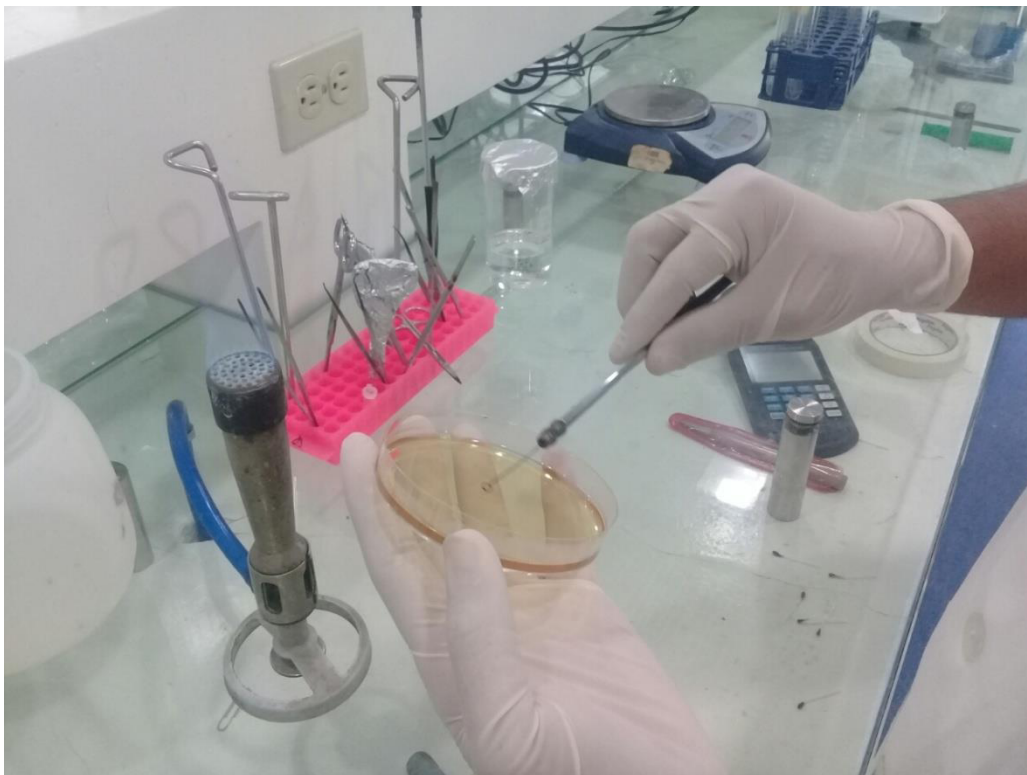


FIGURA 3. SIEMBRA DEL *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*.

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 4. PREPARANDO EL MEDIO DE CULTIVO.

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 5. PREPARANDO EL AUTOCLAVE

Fuente: (Marco, 2017)

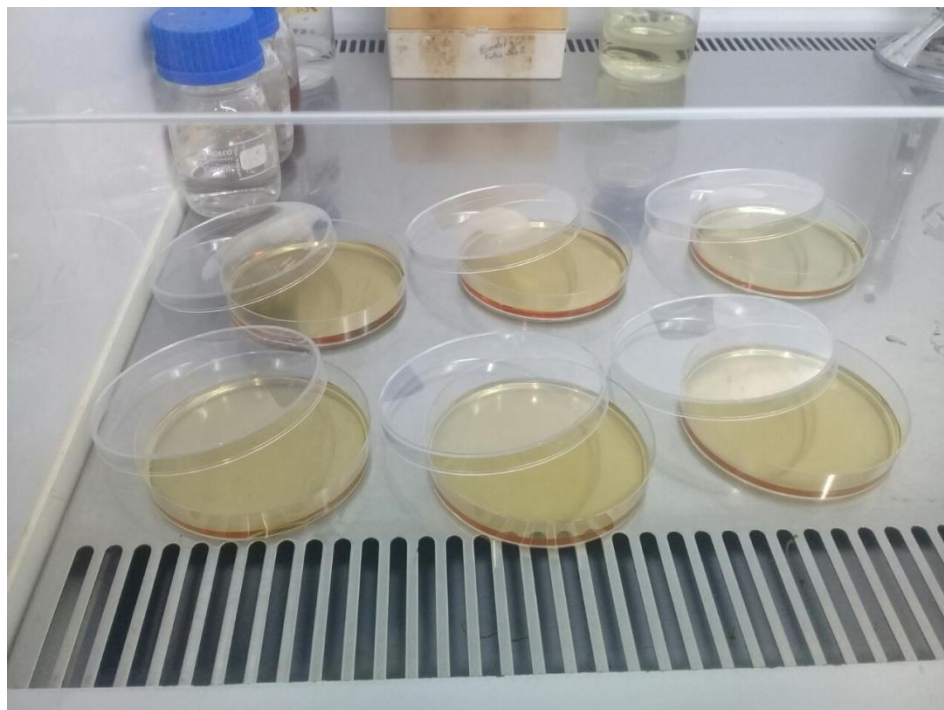


FIGURA 6. COLOCANDO EL MEDIO DE CULTIVO EN CAJAS PETRI.

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 7. REFRIGERACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 8. MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS.

Fuente: (Marco, 2017)



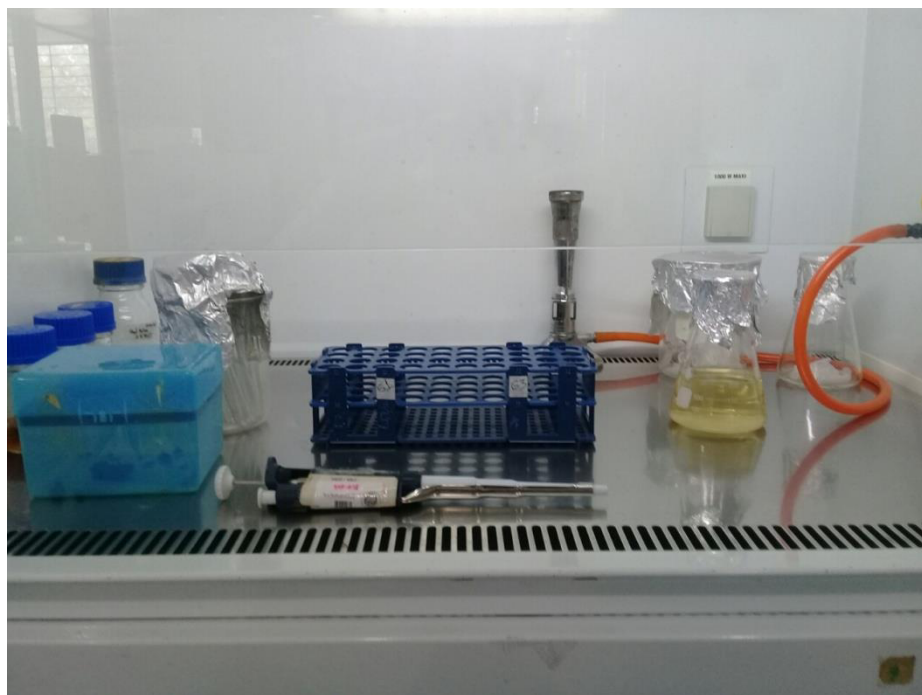


FIGURA 9. AGUA DE PEPTONA

Fuente: (Marco, 2017)

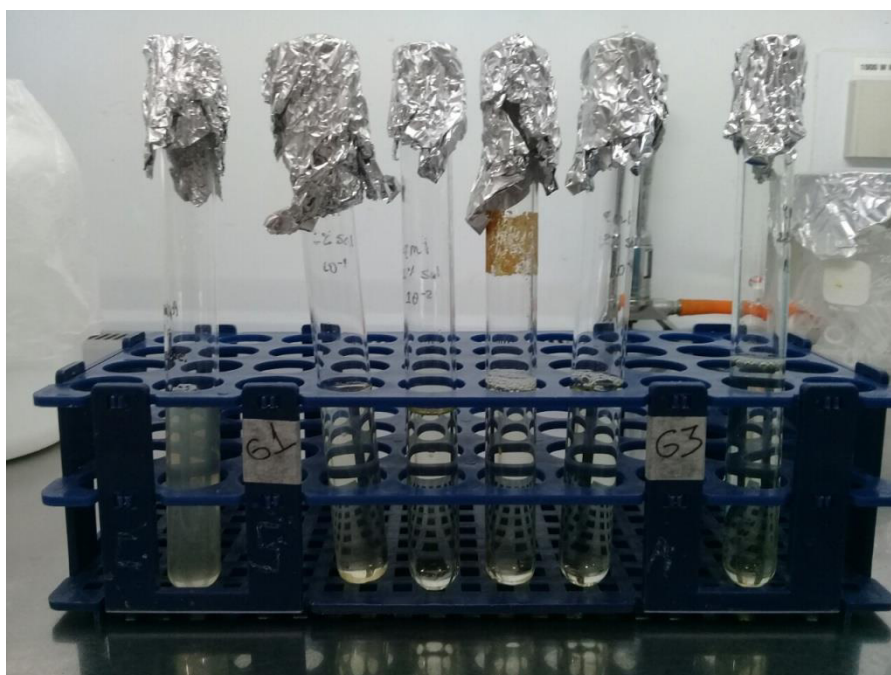


FIGURA 10. DILUCIONES DEL *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*.

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 11. ESPECTROFOTÓMETRO

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 12. LECTURA DE LA DILUCIÓN 10-1

Fuente: (Marco, 2017)

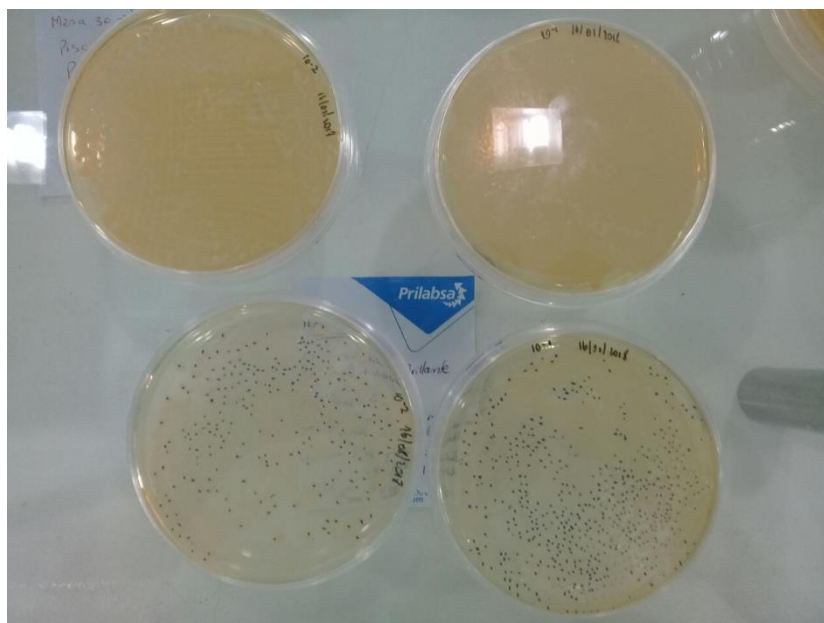


FIGURA 13. DILUCIONES DESDE 10-2, 10-3, 10-4, 10-5

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 14. MÁQUINA PARA REALIZAR CONTEO DE COLONIA

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 15. CONTEO DE LAS PLACAS

Fuente: (Marco, 2017)

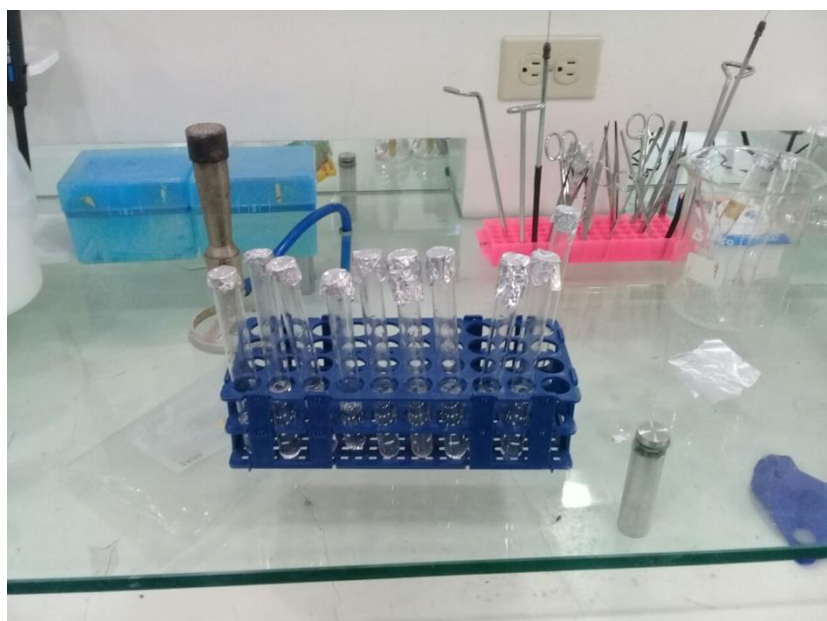


FIGURA 16. MÉTODO DE MPN

Fuente: (Marco, 2017)





**FIGURA 17.** DILUCIONES DESDE  $10^{-1}$  HASTA  $10^{-8}$

Fuente: (Marco, 2017)



**FIGURA 18.** AGITANDO LA DILUCIÓN

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 19. DILUCIONES INGRESARLAS EN LA INCUBADORA

Fuente: (Marco, 2017)

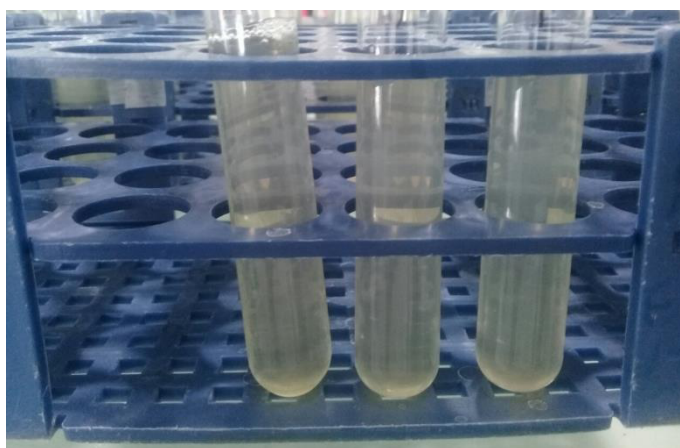


FIGURA 20. DILUCIÒN 10-7

Fuente: (Marco, 2017)

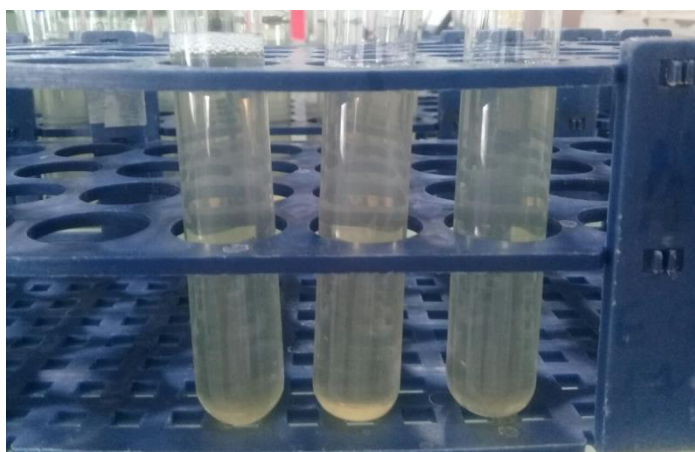


FIGURA 21. DILUCIÓN 10-8

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 22. TERMOCICLADOR

Fuente: (Marco, 2017)



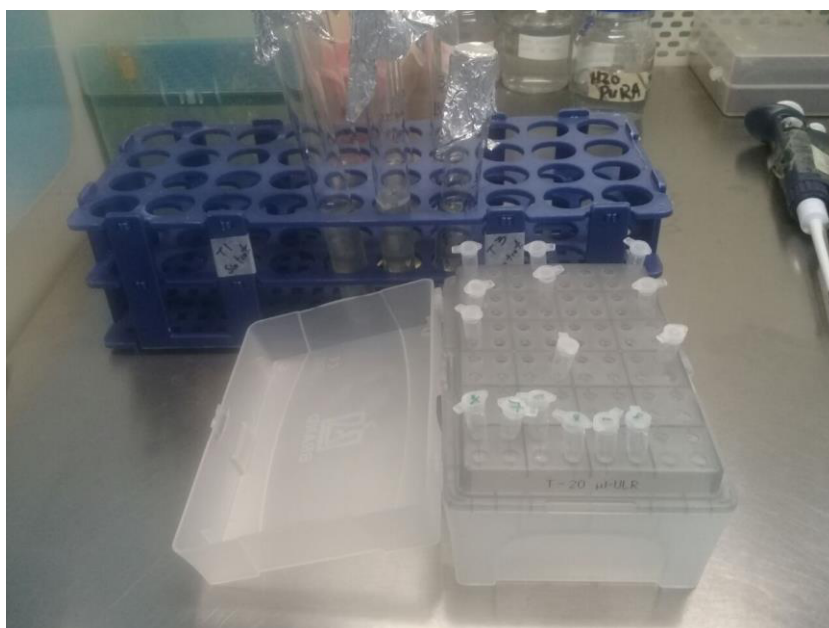
FIGURA 23. CENTRIFUGADORA

Fuente: (Marco, 2017)



FIGURA 24. CENTRIFUGANDO LAS DILUCIONES DE  $10^{-7}$  A  $10^{-8}$

Fuente: (Marco, 2017)



**FIGURA 25. EXTRACCIÓN DE ADN**

Fuente: (Marco, 2017)



**FIGURA 26. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA**

Fuente: (Marco, 2017)

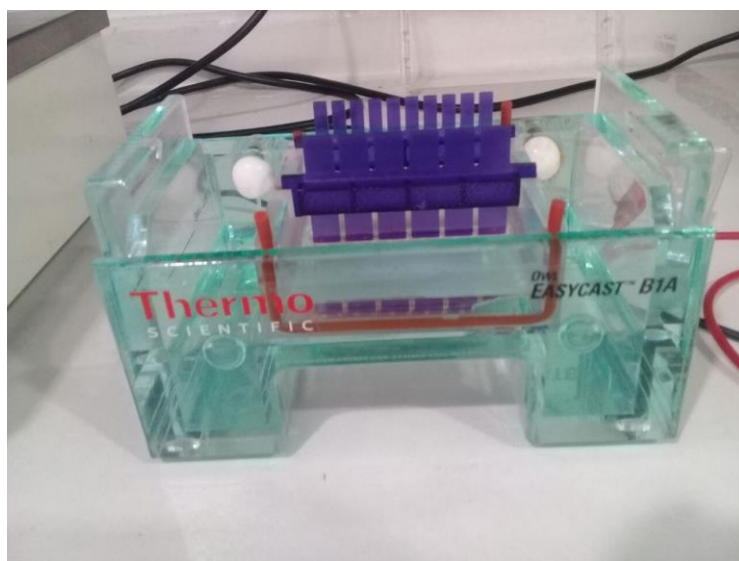


FIGURA 27. GEL DE AGAROSA

Fuente: (Marco, 2017)

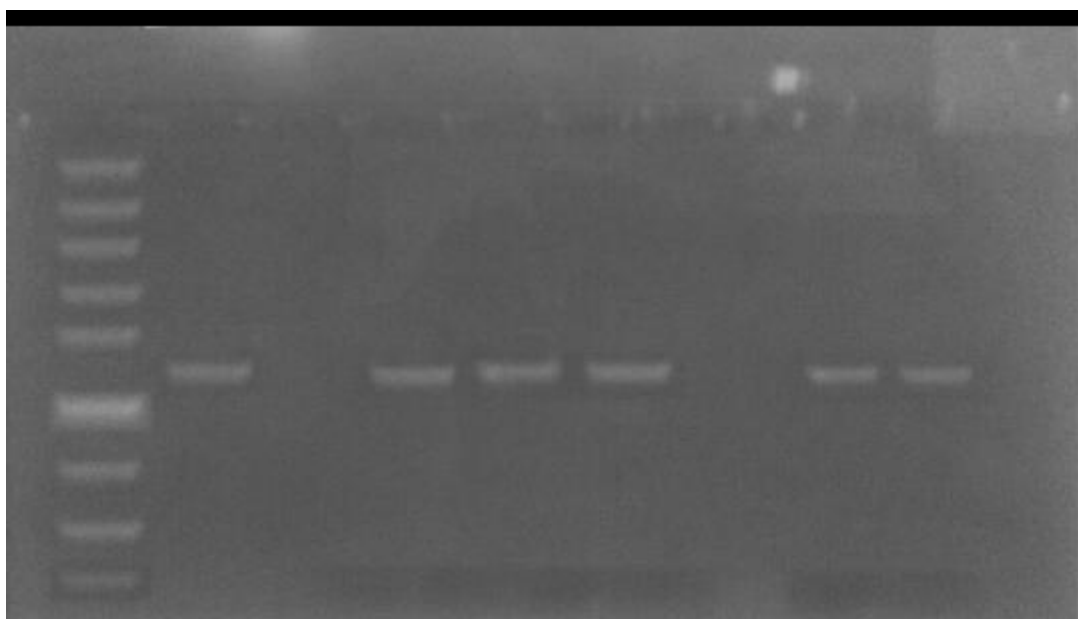


FIGURA 28. ELECTROFORESIS

Fuente: (Marco, 2017)





FIGURA 29. ELECTROFORESIS

Fuente: (Marco, 2017)