

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL  
MAR

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA



Identificación genómica y bioquímica de *Vibrio* spp. asociados al  
cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero

Autor: Carlos Emilio Flores Aguilar

Tumbes, 2024

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

### ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA



Identificación genómica y bioquímica de *Vibrio* spp. asociados al cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra

Presidente

Dr. Marco Antonio Zapata Cruz

Secretario

Dra. Tessy Peralta Ortiz

Vocal

Tumbes, 2024

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## FACULTAD DE INGENIERIA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

### ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA



Identificación genómica y bioquímica de *Vibrio* spp. asociados al cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Carlos Emilio Flores Aguilar

Autor

Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña

Asesora

Dr. Alberto Ordinola Zapata

Co-asesor

Tumbes, 2024

# Acta de sustentación



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
VICERRECTORADO ACADEMICO  
FACULTAD DE INGENIERIA PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

*“Año del Bicentenario, de la Consolidación de nuestra Independencia, y de la  
Commemoración de las Heroicas Batallas de Junín y Ayacucho”*

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Puerto Pizarro, el día tres del mes de junio del dos mil veinticuatro, siendo las dieciséis horas, en el aula A-6 de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la UNTUMBES, se reunió el Jurado Calificador, designado con Resolución N° 050-2017/UNTUMBES-FIPCM, Dr. OSCAR AUGUSTO NENDOZA NEYRA (Presidente), Dr. MARCO ANTONIO ZAPATA CRUZ (Secretario) y Dra. TESSY PERALTA ORTIZ (Vocal), reconociendo en la misma resolución a la Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña como asesora (CODIGO ORCID N° 0000-0001-6541-7075), con Resolución N° 018-2023/UNTUMBES-FIPCM-D se reconoce al Dr. Alberto Ordinola Zapata como Co-asesor (CODIGO ORCID N° 0000-0002-9644-0531); asimismo, con Resolución N° 0007-2020/UNTUMBES-FIPCM-CF, se modifica el nombre del proyecto. Luego de la presentación, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: **“Identificación genómica y bioquímica de Vibrio spp asociados al cultivo de Litopenaeus vannamei”**, para optar el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO, presentado por el:

**Br. CARLOS EMILIO FLORES AGUILAR**

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado, según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al Bachiller **CARLOS EMILIO FLORES AGUILAR, APROBADO**, con calificativo:

BUENO

Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el Jurado le indica.

En consecuencia, queda APTO para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Pesquero, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento general de la UNTUMBES, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 16 horas y 55 minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta de sustentación.

Tumbes, 03 de junio 2024

  
Dr. OSCAR A. MENDOZA NEYRA  
CODIGO ORCID N° 0000-0002-9637-6250  
DNI. N° 00201986  
Presidente

  
Dr. MARCO A. ZAPATA CRUZ  
CODIGO ORCID N° 0000-0002-9018-280X  
DNI. N° 00219827  
Secretario

  
Dra. TESSY PERALTA ORTIZ  
CODIGO ORCID N° 0000-0001-5907-7713  
DNI. N° 00239540  
Vocal

c.c.:  
- Jurado (03)  
- Interesado

- Asesora: Dra. ENEDIA G. VIEYRA P. Co-asesor: Dr. ALBERTO ORDINOLA Z.  
- Archivo Decanato.

Los Ceibos S/N. Puerto Pizarro. Tumbes – Perú

# Informe resumido de Turnitin

2024.06.05. Tesis Carlos Emilio Flores Aguilar

## INFORME DE ORIGINALIDAD


<b>16%</b>	<b>17%</b>	<b>7%</b>	<b>8%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>7%</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Universidad Nacional de Tumbes</b> Trabajo del estudiante	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>repositorio.concytec.gob.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>repositorio.urp.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>erp.untumbes.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>msptm.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	<b>ri.conicet.gov.ar</b> Fuente de Internet	

  
Dra. Encelia Graciela Viegza Peña  
<https://orcid.org/0000-0001-6541-7075>  
Docente Asesora

		<1 %
10	<b>kupdf.net</b> Fuente de Internet	<1 %
11	<b>repositorio.unal.edu.co</b> Fuente de Internet	<1 %
12	<b>vital.seals.ac.za:8080</b> Fuente de Internet	<1 %
13	<b>J. J. Farmer. "The Genera Vibrio and Photobacterium", The Prokaryotes, 2006</b> Publicación	<1 %
14	<b>Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS</b> Trabajo del estudiante	<1 %
15	<b>doku.pub</b> Fuente de Internet	<1 %
16	<b>www.revespcardiol.org</b> Fuente de Internet	<1 %
17	<b>oceanrep.geomar.de</b> Fuente de Internet	<1 %
18	<b>eprints.ucm.es</b> Fuente de Internet	<1 %

  
 Dra. Eneda Graciela Noya Peña  
<https://orcid.org/0000-0001-6541-7075>  
 Docente Asesora

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 15 words

## **Dedicatoria**

A Dios por guiarme y acompañarme en el transcurso de mis estudios, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles que me tocó vivir.

A mis padres Pedro Augusto y Nimia por inculcarme valores y hacer de mí una persona de bien para la sociedad.

## **Agradecimiento**

A la Universidad Nacional de Tumbes por haberme permitido desarrollar mi trabajo de investigación en los ambientes de los Laboratorios de Microcultivos y Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar.

A mi asesora Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña y coasesor Dr. Alberto Ordinola Zapata, por su valioso apoyo en la elaboración, ejecución y redacción del informe final de la tesis.

A los miembros de mi jurado: Dra. Tessy Peralta Ortiz, Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra, y Dr. Marco Antonio Zapata Cruz, por sus aportes y sugerencias que me permitieron mejorar la presente tesis.

A los colaboradores de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar por el apoyo prestado en el desarrollo de la investigación.



## Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	15
II.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	17
2.1.	Descripción del género <i>Vibrio</i> .....	17
2.2.	Enfermedad originada por <i>Vibrio</i> spp.....	18
2.3.	Métodos de detección de <i>Vibrio</i> .....	18
2.4.	Antecedentes .....	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1.	Obtención de la muestra .....	23
3.2.	Cultivo bacteriano .....	23
3.3.	Identificación bioquímica de las cepas aisladas.....	23
3.4.	Obtención del ADN de las cepas aisladas .....	24
3.5.	Amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr .....	24
3.6.	Secuenciación de los productos amplificados del gen 16S ARNr.....	26
3.7.	Procesamiento de datos.....	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
4.1.	Caracterización de cepas presuntivas de <i>Vibrio</i> spp.....	27
4.2.	Identificación bioquímica de las cepas de <i>Vibrio</i> spp.....	28
4.3.	Amplificación de fragmento del gen 16S ARNr .....	29
4.4.	Identificación genómica de las cepas bacterianas .....	30
4.5.	Comparación de la eficiencia de la identificación a nivel genómico y bioquímico del <i>Vibrio</i> .....	31
V.	CONCLUSIONES.....	35
VI.	RECOMENDACIONES .....	36
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
	ANEXOS .....	43

## Índice de tablas

Tabla 1. Reactivos para preparar mix de PCR para una reacción. ....	25
Tabla 2. Características morfológicas de las colonias bacterianas en medio TCBS.....	27
Tabla 3. Identificación bioquímica de las cepas presuntivas de <i>Vibrio</i> .....	29
Tabla 4. Identificación genómica de las cepas bacterianas aisladas utilizando la base de datos de GenBank. ....	31
Tabla 5. Comparación genómica y bioquímica de las cepas presuntivas aisladas de <i>Vibrio</i> . ....	32
Tabla 6. Resumen de la eficiencia de la identificación bioquímica y molecular.....	34

## Índice de figuras

Figura 1. Programación del termociclador.....	25
Figura 2. Migración de amplicones de un fragmento del gen 16S ARNr.....	30

## Índice de anexos

Anexo 1 .....	44
Anexo 2 .....	45
Anexo 3 .....	47

Identificación genómica y bioquímica de *Vibrio* spp. asociados al cultivo de  
*Litopenaeus vannamei*

Br. Carlos Emilio Flores Aguilar<sup>1</sup>

Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña<sup>2</sup>

Dr. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

## RESUMEN

Esta investigación tuvo como finalidad identificar cepas de *Vibrio* spp. obtenidas de cultivos de *Litopenaeus vannamei* en la región Tumbes usando técnica genómica (secuenciamiento del gen 16S ARNr) y técnica bioquímica (pruebas que evalúan características metabólicas). Los ejemplares de langostino se recolectaron de tres zonas de cultivo en Zarumilla, Tumbes y Contralmirante Villar (7 langostinos de cada zona), a cada ejemplar se le extrajo el hepatopáncreas, y con éste se preparó diluciones ( $10^0$  a  $10^4$ ) que se sembraron en el medio de cultivo TCBS, las cepas aisladas fueron purificadas en medio TSA. La identificación bioquímica se realizó mediante un conjunto de pruebas bioquímicas que incluyeron: Crecimiento en agar hierro tres azúcares (TSI), producción de gas, sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ , prueba de indol, citrato, urea, motilidad, lisina, ornitina y glucosa) mientras que la para la identificación genómica se obtuvo el ADN de las cepas, con el que se realizó PCR con los *primers*: *forward*: 8F y *reverse*: 1510R, los amplicones fueron enviados a secuenciación y con las secuencias nucleótidas obtenidas se realizó búsqueda en la base de datos GenBank utilizando el software en línea BLAST. Como resultado se logró aislar 21 cepas bacterianas presuntivas de *Vibrio* spp. de las cuales se identificó bioquímicamente 14,3%, mientras que mediante técnica genómica se identificó a 71,4% de las cepas; con lo que se evidenció la superioridad de la identificación genómica sobre la bioquímica.

**Palabras clave:** *Vibrio* spp., *Photobacterium*, identificación bacteriana, pruebas bioquímicas, 16S ARNr

---

<sup>1</sup> Bachiller de la Escuela de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes.

<sup>2</sup> Profesores principales de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes.

Genomic and biochemical identification of *Vibrio* spp. associated with the culture of *Litopenaeus vannamei*

Br. Carlos Emilio Flores Aguilar<sup>1</sup>

Dra. Eneida Graciela Vieyra Peña<sup>2</sup>

Dr. Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

### ABSTRACT

This research aimed to identify strains of *Vibrio* spp. obtained from *Litopenaeus vannamei* cultures in the Tumbes region using genomic technique (sequencing of the 16S rRNA gene) and biochemical technique (tests that evaluated metabolic characteristics). The shrimp specimens were collected from three farming areas in Zarumilla, Tumbes and Contralmirante Villar (7 shrimps from each area), the hepatopancreas was extracted from each specimen, and dilutions ( $10^0$  to  $10^4$ ) were prepared with this and were sown in TCBS culture medium, the isolated strains were purified in TSA medium. Biochemical identification was performed through a set of biochemical tests that included: Growth on three sugar iron (TSI) agar, gas production, hydrogen sulfide ( $H_2S$ ), indole test, citrate, urea, motility, lysine, ornithine and glucose) while for genomic identification, the DNA of the strains was obtained, PCR was performed with the primers: forward: 8F and reverse: 1510R, the amplicons were sent for sequencing and with the nucleotide sequences obtained, a search was carried out in the database of GenBank data using the online BLAST software. As a result, 21 presumptive bacterial strains of *Vibrio* spp. were isolated, of which 14.3% were biochemically identified, while 71.4% of the strains were identified by genomic technique; with which demonstrated the superiority of genomic identification over biochemistry.

**Keywords:** *Vibrio* spp., *Photobacterium*, bacterial identification, biochemical tests, 16S rRNA

---

<sup>1</sup> Bachelor of the School of Fisheries Engineering of the National University of Tumbes.

<sup>2</sup> Full professors of the Faculty of Fisheries Engineering and Marine Sciences of the National University of Tumbes.

## I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias de la familia *Vibrionaceae* son muy comunes en las aguas marinas y de estuario e incluyen al género *Vibrio*, algunas de cuyas especies son altamente patógenas para el langostino (*Litopenaeus vannamei*) pues originan vibriosis así como la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), enfermedad que ha originado importantes pérdidas (entre US\$ 43 000 millones y US\$ 44 000 millones) en los cultivos de los países asiáticos y México (de Souza & Wan, 2021; Kumar et al., 2016).

La detección de la especie bacteriana que origina la enfermedad, es el primer paso para el control de la misma, es por ello que existe la necesidad de desarrollar métodos rápidos y confiables para detectar e identificar las bacterias *Vibrio* spp. que originan una patología en particular en una empresa de cultivo de langostino.

La microbiología tradicional, si bien es un método muy extendido para la detección de diferentes agentes bacterianos, requiere de una batería de pruebas bioquímicas para poder identificar la especie, lo cual consume mucho tiempo, es tediosa y no está exenta de problemas respecto a especies que son difíciles de distinguir bioquímicamente, más aún en el caso del género *Vibrio* que posee numerosas especies muy emparentadas (Sabir et al., 2013; Thillaichidambaram et al., 2022). La discriminación entre especies estrechamente relacionadas, como *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* a menudo ha resultado difícil, por lo que se han desarrollado pruebas genómicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la determinación de las especies mediante secuenciación de regiones variables de genes conservados, en este caso un fragmento del gen 16S ARNr (Ki et al., 2009).

La identificación rutinaria que se realiza en los campos de cultivo de langostino involucra la determinación de *Vibrio* spp.; sin embargo, se basa en una técnica muy rudimentaria que es la observación de la coloración que toman las colonias bacterianas al crecer en medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) (Gómez-Gil et al., 2015) y en base a ello se toman decisiones cruciales como es la de medicar el alimento. Es necesario tener una identificación más precisa de las cepas de

*Vibrio* spp. presentes en la zona, para lo cual se pueden utilizar métodos más precisos como son la identificación mediante un conjunto de pruebas bioquímicas (Arévalo et al., 2003) y la realizada mediante el secuenciamiento de un fragmento del gen 16S ARNr (Dulanto, 2013).

El trabajo de investigación tuvo como objetivo: Identificar cepas de *Vibrio* spp. usando técnica genómica (secuenciamiento del gen 16S ARNr) o técnica bioquímica (conjunto de pruebas bioquímicas) obtenidos de cultivos de *Litopenaeus vannamei* en la región Tumbes



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Descripción del género *Vibrio*

Las bacterias denominadas comúnmente vibrios, pertenecen al género *Vibrio*, conjuntamente con los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium* constituyen la familia Vibrionaceae (Farmer & Hickman-Brenner, 2006; Serrano, 2014).

Los vibrios son habitantes habituales de cuerpos de agua salinos tales como el mar y estuarios en los que se cultiva el langostino, estas bacterias están asociadas con infecciones bacterianas, actuando principalmente como patógenos oportunistas cuando el langostino está debilitado o estresado (Gomez-Gil et al., 1998); esto debido a que el estrés provoca una reducción de la respuesta inmune del langostino haciéndolo más propenso a la infección (Morales-Covarrubias, 2008).

Se han reportado que *Vibrio* spp. son responsables de la muerte de hasta el 100% de los langostinos en cultivo, ocurriendo esto más frecuentemente en su fase larvaria (Gómez et al., 2001; Lomelí, 2011).

El género *Vibrio* está formado por 76 especies, 12 de las cuales son patógenas para los humanos (Jadeja et al., 2015), incluyendo *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela* (o *Photobacterium damsela*), *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metshnikovii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Serrano, 2014).

*Vibrio* spp. son un conjunto de especies gramnegativas aeróbicas o anaeróbicas facultativas no formadoras de esporas, que se caracterizan por que sus células son bacilares con forma de coma (cuando se aíslan de muestras ambientales) o con forma de bastones rectos (en medios de cultivo), cuentan con un flagelo polar monotrico, el cual puede convertirse en multitricono en cultivos líquidos; en cuanto a sus características bioquímicas, necesitan de sodio (suministrado como NaCl), la mayoría producen reacción positiva a la prueba de la oxidasa y catalasa, así como metabolizan nitrato a nitrito; también aprovechan la glucosa pero sin llegar a generar gas (Rosado, 2018; Serrano, 2014; Silva et al., 2008).

## **2.2. Enfermedad originada por *Vibrio* spp.**

El término vibriosis designa a una enfermedad provocada por *Vibrio* spp. que afecta a crustáceos en todo el mundo y es responsable por grandes mortalidades en el cultivo de langostino. Los brotes más preocupantes de vibriosis se han producido en diversos langostinos de cultivo, por ejemplo en *L. vannamei* en Sud y Centro América; en *Penaeus japonicus* en Japón (Zúniga et al., 2022) y en *Penaeus monodon* en Asia (Ghosh et al., 2021). La vibriosis puede presentarse en forma oral, entérica, en los apéndices y cuticular, en heridas, sistémica, hepatopancreática entre otras (Cuéllar-Anjel, 2013).

La vibriosis origina mortalidades más altas en langostinos estresados, lo que puede producirse por agua de cultivo inadecuada, densidades muy altas, temperaturas excesivas, bajos tenores de oxígeno en agua y recambios de agua deficientes (Peña & Cuéllar-Anjel, 2019).

## **2.3. Métodos de detección de *Vibrio***

La detección de vibrios se realiza mediante varias técnicas, la más básica implica el cultivo de éstos en medio selectivo como el agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS); en éste las colonias de *Vibrio* pueden tomar color verde o amarillo, tomándose como criterio que las colonias verdes son presuntamente patógenas y las amarillas inocuas (González et al., 2003; Moi et al., 2017).

Dulanto (2013); sin embargo, ha señalado tres problemas respecto a esta interpretación tan sencilla en la identificación de vibrios basada en las características de su crecimiento en medio TCBS; primero, el medio TCBS no permite solamente el crecimiento de *Vibrio* sino que pueden crecer algunos otros géneros bacterianos los cuales incluso pueden crecer en mayor proporción que los vibrios; segundo, las características morfológicas de las colonias de *Vibrio* en TCBS, son tales que son similares entre un amplio número de especies de dicho género; tercero, ha habido regularmente cambios respecto a las especies que constituyen dicho género, con especies que se incorporaron al mismo, así como otras que fueron reclasificadas en otro género.

La identificación de las especies de *Vibrio* puede ser más precisa si se usan una serie de pruebas bioquímicas, así (Amaral et al., 2014), emplearon las pruebas de ornitina descarboxilasa, reacción de Voges-Proskauer, producción de indol, arginina dihidrolasa; utilización de mio-inositol, L-leucina y D-galactosa; fermentación de sucrosa, D-mannosa, L-arabinosa, celobiosa, d-manitol, D-sorbitol, trehalosa; por otro lado, Choopun et al. (2002) usaron las pruebas de agar hierro kligler, oxidasa, arginina, lisina, ornitina, crecimiento en 0%, 6% y 8% de NaCl, manitol, arabinosa, rojo metilo, reacción de Voges-Proskauer y esculina para diferenciar *V. cholerae* de otras cepas de *Vibrio*.

Por otra parte, Schirmeister et al. (2014), diferenciaron bioquímicamente a *Vibrio fluvialis* de *Vibrio furnissii*; mediante las pruebas de crecimiento en TCBS, en agua peptonada (0,1%) con 0, 1, 3, 6 y 8% de NaCl, motilidad, oxidasa, sensibilidad a 10 µg y 150 µg del agente vibriostático O/129, lisina-descarboxilasa, arginina-dihidrolasa, ornitina-descarboxilasa, nitrato-reductasa (todas las pruebas suplementadas con 1% de NaCl) y utilización de varios carbohidratos; así como la producción de gas como producto de la fermentación de la glucosa con o sin NaCl a diferentes temperaturas y tiempos (hasta 1 semana).

Sin embargo, como lo reconocen Gomez-Gil et al. (1998), a pesar de las numerosas pruebas utilizadas para la identificación bioquímica, ésta no es capaz de identificar adecuadamente algunas cepas bacterianas.

Por ello, las técnicas moleculares son las preferidas en la investigación para la identificación de bacterias debido a su alto nivel de precisión y eficacia, por lo que se les considera el patrón de oro, contra las cuales se comparan los otros métodos de identificación (Wieser et al., 2012). La identificación más precisa siempre se lograría al comparar la secuencia completa de ADN de las bacterias, a través de una hibridación ADN – ADN; pero esto no siempre es posible por su elevado precio y el excesivo trabajo y tiempo que requiere, por lo que no puede usarse como una técnica de identificación habitual (Amaral et al., 2014; Janda & Abbott, 2007; Pascual et al., 2010), es por ello que el gen que codifica la subunidad menor de los ribosomas denominado *rrs* o también 16S ARNr es en la práctica el que se usa para discriminar entre especies de bacterias (Amaral et al., 2014; Gómez, 2013; Janda & Abbott, 2007). Sin embargo, también se sabe que, en el caso de especies muy

emparentadas, como las del *Vibrio core group* (*V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus* y *V. rotiferianus*), la identificación mediante el gen 16S ARNr puede fallar (Pascual et al., 2010).

Para realizar la identificación molecular es necesario obtener miles de millones de copias de un fragmento del gen 16S ARNr, para ello se utilizan kits de fábrica que permiten realizar la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas, PCR), en un termociclador, equipo que facilita el copiado realizado por una polimerasa termoestable a través de varios ciclos de temperatura variable, con lo que se puede obtener las copias necesarias del fragmento del gen en pocas horas (Cuéllar-Ánjel, 2008). El fragmento amplificado es secuenciado a fin de conocer la serie y orden de nucleótidos que lo constituyen, dicha secuencia se compara usando el software BLAST (Basic local alignment search tool) contra la base de datos de GenBank en la que existen secuencias de ADN incluyendo secuencias de fragmentos del gen 16S ARNr de diferentes especies bacterianas. El software permite encontrar la secuencia más similar a la de la búsqueda con lo que de existir un nivel alto de similitud se puede concluir cuál es la especie de la bacteria que se está investigando (Dulanto, 2013).

#### **2.4. Antecedentes**

En varias investigaciones se ha tratado de identificar cepas de *Vibrio* spp. usando métodos bioquímicos, así se puede mencionar:

Gomez-Gil et al. (1998) realizaron la identificación bioquímica de especies de *Vibrio* aisladas de hemolinfa, hepatopáncreas e intestino de juveniles saludables de *L. vannamei*. Las muestras de hepatopáncreas y de intestino fueron homogenizadas en solución salina (2,5% de NaCl) antes de ser sembradas en agar TCBS, en el caso de hemolinfa se sembró directamente. Las placas fueron incubadas por 24 a 48 h a 30 °C, posteriormente fueron identificadas usando un sistema comercial de identificación llamado Biolog GN basado en placas de 96 pocillos en cada uno de los cuales hubo diferentes fuentes de carbono, se evaluaron los cambios de coloración y la intensidad de la coloración en cada pocillo. Dado que algunas cepas no pudieron ser identificadas mediante dicho método, se realizaron pruebas bioquímicas adicionales para evaluar la producción de oxidasa, motilidad,

fermentación de glucosa y lactosa, producción de gas desde glucosa, reducción del nitrato; sin embargo, algunas cepas no pudieron ser identificadas adecuadamente ni siquiera con estas pruebas suplementarias. Se observó que sólo en 14,3% de los casos hubo presencia de *Vibrio* spp. en la hemolinfa en cantidades de  $2 \times 10^2$  a  $3 \times 10^3$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y que éstos fueron no fermentadores de sacarosa.

Sulca (2011) investigó la relación de integrones con la resistencia a antibióticos en *Vibrio* spp. aislados de zonas marinas polucionadas; como parte de este estudio realizó la identificación de *Vibrio* utilizando un método bioquímico tradicional que evaluó el metabolismo de sacarosa, oxidasa, lisina, ornitina, lactosa, indol, manitol; así como, el crecimiento en soluciones con 0, 1, 6, 7 y 10% de NaCl. Por otro lado, utilizó también el sistema API 20NE de Biomérieux, obteniendo buenos resultados en la identificación de especies de *Vibrio* spp.

En otras investigaciones se han empleado métodos genómicos para identificar vibrios, por ejemplo:

Dulanto (2013) identificó especies de *Vibrio* aisladas de langostinos *L. vannamei* cultivados, utilizando un fragmento del gen 16S ARNr, al cual aplicó un análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) complementado con el secuenciamiento del ADN, utilizó los *primers* universales: 27F y 1492R, para amplificar un fragmento del gen 16S ARNr de 1500 pares de bases (pb); este autor utilizó un protocolo de PCR consistente en desnaturalización por 4 min a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistió de desnaturalización por 1 min a 94 °C, hibridación por 1 min a 55 °C, extensión por 2 min a 72 °C; culminados los ciclos, se pasó a una fase de extensión final por 5 min a 72 °C y mantenimiento a 4 °C. Posteriormente digirió el ADN amplificado usando enzimas de restricción y migró electroforéticamente, obteniendo bandas marcadas que pudieron servir para distinguir las especies de *Vibrio*, dada su buena concordancia con la identificación bacteriana realizada con el secuenciamiento del ADN.

Bej et al. (1999) utilizaron una PCR multiplex para detectar *V. parahaemolyticus* tanto de cepas no hemolíticas como de aquellas productoras de hemolisina en muestras clínicas, de alimentos, de mariscos frescos y cepas de laboratorio, para

lo que analizaron tres genes codificadores de hemolisinas: *tdh* que codifica para la hemolisina directa termoestable (TDH), *trh* para la hemolisina relacionada termoestable (TRH) y *tl* para la hemolisina termolábil (TL) considerados factores de virulencia en *Vibrio*.

Por otro lado, Pascual et al. (2010), realizaron un estudio para encontrar una forma adecuada de identificar a través del análisis del genoma a las especies que conforman el llamado *Vibrio core group* (grupo nuclear de *Vibrio*), éste es un conjunto de 6 especies de *Vibrio*: *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus* y *V. rotiferianus*, cuya identificación a nivel genómico es difícil dado que presentan altas similitudes a nivel de gen 16S ARNr, por lo que optaron realizar un análisis de secuencias multilocus, utilizando 6 genes: 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* y *toxR*, encontrando que las secuencias de tres de estos genes: *rpoD*, *rctB* y *toxR* eran más útiles para la identificación de vibrios del *core group*.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Obtención de la muestra**

Los ejemplares de los langostinos *Litopenaeus vannamei* se recolectaron de estanques de empresas langostineras seleccionadas en cada una de las tres zonas: Zarumilla, Tumbes y Contralmirante Villar. Los ejemplares fueron recolectados por el personal de la empresa, luego se trasladaron en baldes de 20 litros hasta el Laboratorio de Microcultivos ubicado en la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes. Los langostinos se pesaron en una balanza analítica marca Ohaus modelo AX2202/E se desinfectaron externamente con un algodón empapado en alcohol al 70%. Luego se extrajo su hepatopáncreas con una pinza estéril, mismo que fue depositado en un microtubo de 1,5 ml esterilizado. El hepatopáncreas se trituró y con éste se preparó diluciones sucesivas de  $10^0$  a  $10^{-4}$  utilizando solución fisiológica (0,85% de NaCl).

#### **3.2. Cultivo bacteriano**

Se procedió a realizar la siembra de las diluciones en placas Petri conteniendo alrededor de 15 ml de medio TCBS. La siembra se realizó en placas separadas utilizando 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones sucesivas. La siembra se realizó con el asa de barrido, esparciendo el inóculo por la superficie completa de la placa. Éstas fueron rotuladas colocándoles el número del ejemplar de langostino del cual procedió la muestra, así como la dilución utilizada.

Luego las placas Petri fueron colocadas en la incubadora a una temperatura de 30 °C por 24 horas.

#### **3.3. Identificación bioquímica de las cepas aisladas.**

Debido a que en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, no se pudo realizar las pruebas bioquímicas. Se contrató el servicio de una empresa especializada (PezBiotec) para realizarlas, la misma que empleó una

batería de pruebas que incluyeron: Crecimiento en agar hierro tres azúcares (TSI), producción de gas, sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S, prueba de indol, citrato, urea, motilidad, lisina, ornitina y glucosa.

### **3.4. Obtención del ADN de las cepas aisladas**

El procedimiento de extracción se basó en el método de ebullición con buffer de fosfato salino (PBS), como se indica en Peng et al. (2013) con modificaciones; se procedió a centrifugar a 10 000 rpm por un tiempo de 2 minutos los microtubos que contuvieron el caldo en el que se cultivó la bacteria a ser identificada, se descartó el sobrenadante y el sedimento (*pellet*) se resuspendió en 500 µl de PBS 1X utilizando un vórtex. Los microtubos con el ADN resuspendido se centrifugaron a 10 000 rpm por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió nuevamente en 200 µl de TE 1X (tris 10 mM y EDTA 1 mM); Las muestras se llevaron a ebullición por 10 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 minutos; luego fueron centrifugados a 10 000 rpm por 2 minutos; el sobrenadante (100 µl aproximadamente) se transfirió a un microtubo nuevo, se le añadió 1 µl de ARNasa y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

### **3.5. Amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr**

La amplificación se realizó utilizando los *primers* utilizados por Dulanto (2013) que produce un amplicón de 1500 pb, los cuales son:

*Primer* directo: 8F (Secuencia nucleótida: 5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3')

*Primer* reverso: 1510R (Secuencia nucleótida: 5'-ggc tac ctt gtt acg a-3').

La amplificación se realizó como sigue:

La solución *mix* de la reacción de PCR se preparó teniendo en cuenta el número de cepas de *Vibrio* de las que se extrajo el ADN. Se añadió una reacción más para el control negativo y otra más para el control positivo. El volumen de *mix* necesario para realizar la amplificación se obtuvo multiplicando el número de reacciones calculado anteriormente por los volúmenes de reactivos definidos en la tabla 1.



Tabla 1. Reactivos para preparar *mix* de PCR para una reacción.

Reactivo	Volumen( $\mu$ l)
Agua ultra pura	17,75
Solución buffer 10X PCR RXn (no incluye cloruro de magnesio)	2,50
Solución 10 mM de cloruro de magnesio	2,50
Solución 10 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato(dNTPs)	0,50
<i>Primer</i> directo	0,50
<i>Primer</i> inverso	0,50
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l marca Invitrogen)	0,25
Total	24,50

Para la ampliación del ADN se utilizó un termociclador el cual se programó según el protocolo como se aprecia en la figura 1:

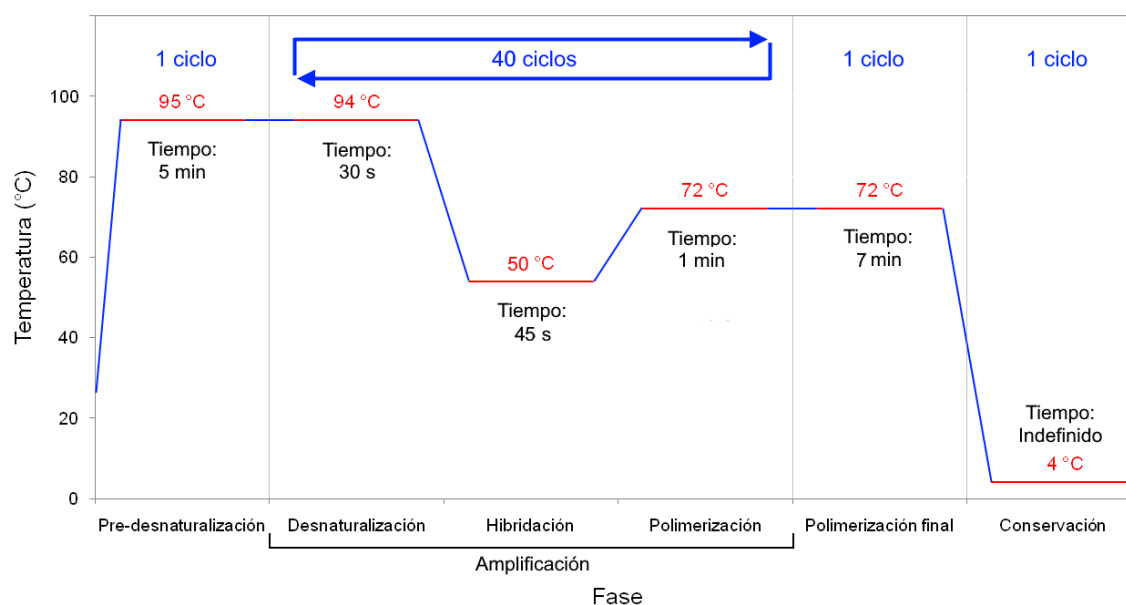


Figura 1. Programación del termociclador

Una vez completada la fase de amplificación, se retiraron del termociclador los microtubos de 0,2 ml.

Se preparó un gel de agarosa al 2%, añadiendo 2 g de agarosa a 100 ml de tampón de tris, ácido acético y EDTA (TAE) a una concentración 1X (24,2 g de tris, 5,71 ml ácido glacial acético y 3,72 g de EDTA en 100 ml de agua ultra pura), se añadieron

5 µl de bromuro de etidio a esta mezcla.

El gel de agarosa se colocó en la cubeta del equipo de electroforesis que contenía 120 ml de TAE 1X.

Los amplicones se prepararon para la migración mezclando 1 µl de tampón de depósito y 9 µl de cada amplicón. La mezcla se colocó en cada uno de los pocillos del gel. También se colocó un marcador de peso molecular de 1000 pb en uno de los pocillos.

Se encendió el equipo de electroforesis y se permitió que el ADN migrará a 98 V durante 30 min.

Después de este periodo, los geles se colocaron en un transiluminador UV y se tomaron fotografías digitales para determinar si el fragmento del gen de interés se amplificó con éxito.

### **3.6. Secuenciación de los productos amplificados del gen 16S ARNr.**

Se retiraron 10 µl de los productos obtenidos por amplificación en la PCR y de los *primers* correspondientes. Éstos fueron colocados en microtubos de 0,2 ml adecuadamente etiquetados y enviados a la empresa MacroGen (Maryland, USA) para la secuenciación del ADN.

Las secuencias nucleótidas se alinearon usando el software Mega 6 y después de ser depuradas, se buscaron en la base de datos GenBank del National Center of Biotechnology Institute (NCBI) usando el software Blast (Basic Local Alignment Search Tools), que está disponible gratuitamente en el sitio web del NCBI. Se declaró identidad a nivel de especie cuando el porcentaje de identidad fue  $\geq 99\%$  y a nivel de género cuando fue  $\geq 97\%$ .

### **3.7. Procesamiento de datos**

Los datos fueron organizados usando tablas y figuras, se empleó también medidas de estadística descriptiva básica como la frecuencia porcentual.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de cepas presuntivas de *Vibrio* spp.

Se lograron aislar en medio TCBS, 21 cepas bacterianas presuntivas de *Vibrio* spp.; que provinieron de manera proporcional de cada una de las zonas (7 de cada zona). Las cepas produjeron colonias que fueron todas ellas circulares y con superficie lisas, el tamaño y color de las mismas se observan en la tabla 2. Adicionalmente las cepas al ser caracterizadas fueron en su totalidad bacilos Gramnegativos y oxidasa positiva.

Tabla 2. Características morfológicas de las colonias bacterianas en medio TCBS.

Nº	Zona	Cepa	Tamaño (mm)	Color-característica	Textura
1	Zarumilla	1Px	1,5	Verde	Pastosa
2		2Px	2,0	Amarillo pastoso	Pastosa
3		3Px	1,5	Amarillo pastoso	Pastosa
4		6Px	2,0	Verde	Pastosa
5		11Px	2,0	Amarillo pastoso	Pastosa
6		14Px	4,0	Amarillo pastoso	Pastosa
7		16Px	0,5	Amarillo pastoso	Pastosa
8	Tumbes	2Z -3 (1)	1,5	Verde	Cremosa
9		3Z -2 (2)	5,0	Amarillo	Cremosa
10		5Z -3 (2)	2,5	Amarillo	Cremosa
11		6Z -2 (1)	4,5	Amarillo	Cremosa
12		6Z -2 (2)	2,0	Amarillo	Cremosa
13		6Z -2 (3)	1,5	Amarillo	Cremosa
14		6Z -3 (2)	1,0	Verde	Cremosa
15	Contralmirante Villar	1ZT	1,5	Verde	Pastosa
16		6ZT	4,0	Verde	Pastosa
17		8ZT	2,0	Amarillo pastoso	Pastosa
18		10ZT	4,5	Verde	Pastosa
19		12ZT	4,0	Amarillo pastoso	Pastosa
20		14ZT	3,5	Amarillo pastoso	Pastosa
21		16ZT	5,0	Verde	Pastosa

Respecto a las características observadas, éstas fueron compatibles con las que mostrarían cepas de *Vibrio* spp. al crecer en medio TCBS, que según Sabir et al. (2013) deben ser circulares de bordes lisos, superficie lisa, con colores que varían entre amarillos y verdes de acuerdo a la especie de *Vibrio*. Asimismo, las cepas de *Vibrio* son siempre Gramnegativas y pueden ser oxidasas positivas (Rosado, 2018).

#### **4.2. Identificación bioquímica de las cepas de *Vibrio* spp.**

De las 21 cepas que se enviaron para realizar la identificación por pruebas bioquímicas (tabla 3), sólo se pudo identificar a nivel de especie a tres de ellas: las cepas 6Z-2(1) y 6Z-3(2) que fueron identificadas como *V. parahaemolyticus* y la cepa 3Z-2(2) a la enterobacteria *Pantoea agglomerans*. En el resto de casos, la identificación no pudo llegar a ser definida a nivel de especies, restringiéndose a un grupo emparentado de especies como por ejemplo en el caso de ocho cepas: 2Px, 11PX, 16PX, 6Z-2(2), 1ZT, 8ZT, 12ZT y 14ZT que fueron identificadas como correspondientes a alguna de las especies: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* o *V. mimicus*; en tanto que, la cepa 14PX pudo ser identificada como correspondiente a alguna de las especies: *V. ordalii*, *V. pelagius* o *V. splendidus*; mientras que, las cepas 6ZT y 10ZT pudieron corresponder a alguna de las especies: *V. anguillarum*, *V. pelagius* o *V. ponticus*; por último, en el caso de la cepa 3Px, solo se pudo identificar en el nivel de género: *Shigella*. No se pudieron identificar seis de cepas: 1Px, 6Px, 2Z-3(1), 5Z-3(2), 6Z-2(3) y 16ZT. Al respecto, es conocida que la identificación bioquímica de especies de *Vibrio* es problemática y que requiere de una gran cantidad de pruebas para lograr un grado de certeza adecuado respecto a la identidad de una cepa; esto ha sido reportado por Croci et al. (2007), quienes al comparar la identificación bioquímica (basada en kits bioquímicos miniaturizados o en esquemas de pruebas bioquímicas tradicionales) con la molecular para *V. parahaemolyticus*; tuvieron una baja eficiencia para identificar correctamente dicha especie empleando los métodos bioquímicos, con una sensibilidad que varió entre 59% a 74% para los kits miniaturizados y 84% para el esquema de pruebas bioquímicas más completo. Una baja eficiencia de identificación también se observa en esta investigación.

Tabla 3. Identificación bioquímica de las cepas presuntivas de *Vibrio*

Nº	Zona	Código muestra*	Cepa	Identificación presuntiva
1	Zarumilla		1Px	ND
2			2Px	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
3			3Px	<i>Shigella</i> sp. (Enterobacteria)
4			6Px	ND
5			11Px	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
6			14Px	<i>V. ordalii</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. splendidus</i>
7			16Px	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
8	Tumbes		2Z -3 (1)	ND
9			3Z -2 (2)	<i>Pantoea agglomerans</i> (Enterobacteria)
10			5Z -3 (2)	ND
11			6Z -2 (1)	<i>V. parahaemolyticus</i>
12			6Z -2 (2)	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
13			6Z -2 (3)	ND
14			6Z -3 (2)	<i>V. parahaemolyticus</i>
15	Contralmirante Villar		1ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
16			6ZT	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. ponticus</i>
17			8ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
18			10ZT	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. ponticus</i>
19			12ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
20			14ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
21			16ZT	ND

\* Código de muestra enviada al laboratorio que realizó las pruebas bioquímicas

ND = No determinada

#### 4.3. Amplificación de fragmento del gen 16S ARNr

En la figura 2 se muestra la amplificación exitosa del fragmento del gen 16S ARNr de las cepas bacterianas analizadas. En la figura se observa bandas luminosas correspondientes a amplicones con un peso molecular de alrededor de 1500 pb, que fue lo esperado de acuerdo a los *primers* utilizados según precisa (Dulanto, 2013). Además, la calidad del ADN obtenido de todas las cepas fue buena (Tabla 7 del anexo 1) con valores de  $A_{260}/A_{280}$  cercanos a 1,9; lo que están dentro del

rango óptimo de valores para la relación  $A_{260}/A_{280}$  que se halla entre 1,8 y 2,0 (Angulo et al., 2020).

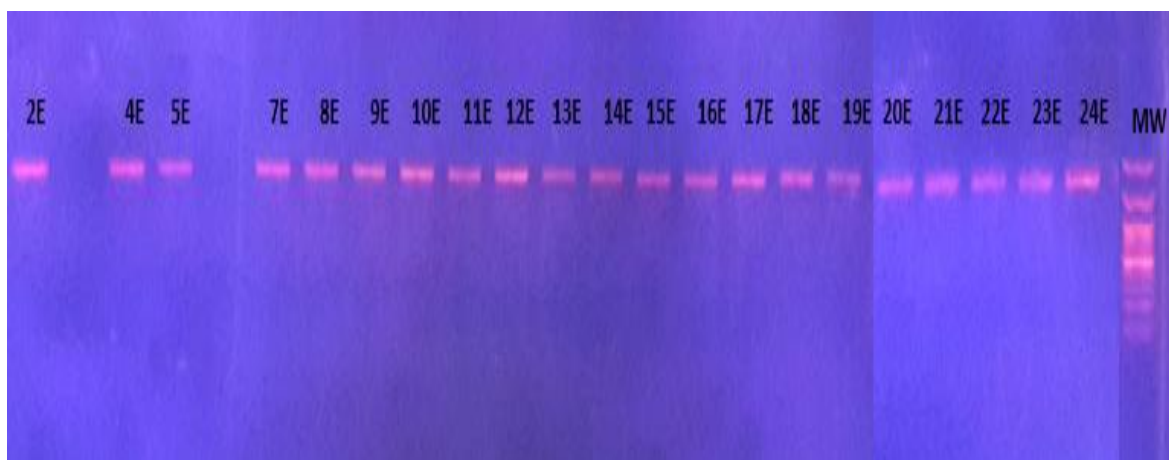


Figura 2. Migración de amplicones de un fragmento del gen 16S ARNr.

#### 4.4. Identificación genómica de las cepas bacterianas

Se pudo identificar 15 de las cepas a nivel de especies y tres a nivel de género (tabla 4); sin embargo, no se pudo identificar a tres cepas, estas últimas porque su porcentaje de identidad fue menor a 97%. En general, las bacterias aisladas correspondieron a los géneros *Vibrio* (15 de 21 cepas) y *Photobacterium* (4 de 21 cepas). Las especies de *Vibrio* identificadas fueron: *Vibrio alginolyticus*, *V. brasiliensis*, *V. campbellii*, *V. hyugaensis*, *V. mytili*, *V. owensii* y *V. rotiferianus*, así como algunas cepas fueron identificadas solo a nivel de género como: *Vibrio* sp.; algunas de estas especies coinciden con las que identificó Oviedo (2014) en el hepatopáncreas de langostinos cultivados en Tumbes, también usando identificación molecular; este autor reportó la presencia de cepas de *V. brasiliensis*, *V. communis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. shilonii*, *V. tubiashi* y *Vibrio* sp. Por otra parte, el hecho de que se halla identificado a especies del género de *Photobacterium* conjuntamente con las de *Vibrio*, se debe a que existe una estrecha relación filogenética entre ambos géneros correspondientes a la familia Vibrionaceae (Labella et al., 2017); tal es así que, la especie más representativa de *Photobacterium*, *P. damsela*, originalmente fue clasificada en el género *Vibrio* como *V. damsela* y posteriormente reclasificada en su género actual. Las especies de *Photobacterium* al estar estrechamente emparentadas con *Vibrio*, presentan similares características, son bacilos gramnegativos, catalasa y oxidasa positivas,

están presentes en ambientes acuáticos marinos o salobres, a menudo como comensales en algunos organismos acuáticos, siendo capaces de crecer en TCBS (Moi et al., 2017).

Tabla 4. Identificación genómica de las cepas bacterianas aisladas utilizando la base de datos de GenBank.

N°	Zona	Cepa	Especie	Porcentaje de identidad en Genbank
1	Zarumilla	1Px	No identificada	73,74
2		2Px	<i>Vibrio rotiferianus</i>	99,52
3		3Px	<i>Vibrio</i> sp.	98,44
4		6Px	No identificada	80,20
5		11Px	<i>Vibrio campbellii</i>	99,24
6		14Px	<i>Vibrio owensii</i>	99,86
7		16Px	<i>Vibrio brasiliensis</i>	99,85
8	Tumbes	2Z -3 (1)	<i>Vibrio brasiliensis</i>	99,66
9		3Z -2 (2)	<i>Vibrio</i> sp.	98,87
10		5Z -3 (2)	<i>Vibrio mytili</i>	99,65
11		6Z -2 (1)	<i>Photobacterium damsela</i>	99,00
12		6Z -2 (2)	<i>Photobacterium damsela</i>	100,00
13		6Z -2 (3)	<i>Photobacterium damsela</i>	100,00
14		6Z -3 (2)	No identificada	95,94
15	Contralmirante Villar	1ZT	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99,07
16		6ZT	<i>Vibrio</i> sp.	97,59
17		8ZT	<i>Vibrio campbellii</i>	99,47
18		10ZT	<i>Vibrio owensii</i>	99,69
19		12ZT	<i>Vibrio campbellii</i>	99,45
20		14ZT	<i>Vibrio hyugaensis</i>	99,73
21		16ZT	<i>Vibrio owensii</i>	99,85

#### 4.5. Comparación de la eficiencia de la identificación a nivel genómico y bioquímico del *Vibrio*

La identificación bioquímica sólo permitió conocer la especie de tres cepas, que fueron identificadas como *Vibrio parahaemolyticus* (cepas 6Z-2(1) y 6Z-3(2)) y como *Pantoea agglomerans* para la cepa 3Z-2(2); mientras que permitió establecer que 11 de las cepas pertenecía a una de entre tres a cinco posibles especies; también permitió establecer el género de una cepa: 3Px (*Shigella* sp.) (tabla 5);

mientras que usando el método genómico fue posible identificar a nivel de especie 15 cepas, que correspondieron a las especies *Vibrio rotiferanius*, *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. brasiliensis*, *V. mitili*, *Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus* y *V. hyugaensis*; en tanto se identificó a nivel de género a 4 cepas que correspondieron a *Vibrio* sp. y *Photobacterium* sp. (tabla 5).

Sólo una especie fue identificada de igual manera tanto a nivel bioquímico como molecular, la cepa 1ZT que correspondió a *V. alginolyticus*; aunque, a nivel bioquímico sólo se logró precisar que podría pertenecer a una de entre cinco especies, entre las cuales se señaló a *V. alginolyticus*.

Tabla 5. Comparación genómica y bioquímica de las cepas presuntivas aisladas de *Vibrio*.

N°	Zona	Cepa	Especie identificada	
			Pruebas bioquímicas	Método genómico
1	Zarumilla	1PX	ND	No identificada
2		2Px	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Vibrio rotiferanius</i>
3		3Px	<i>Shigella</i> sp. (Enterobacteria)	<i>Vibrio</i> sp.
4		6Px	ND	No identificada
5		11Px	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Vibrio campbellii</i>
6		14Px	<i>V. ordalii</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. splendidus</i>	<i>Vibrio owensii</i>
7		16Px	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Vibrio brasiliensis</i>
8	Tumbes	2Z-3 (1)	ND	<i>Vibrio brasiliensis</i>
9		3Z -2 (2)	<i>Pantoea agglomerans</i> (enterobacteria presuntiva)	<i>Vibrio</i> sp.
10		5Z-3 (2)	ND	<i>Vibrio mytili</i>
11		6Z -2 (1)	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Photobacterium damsela</i>
12		6Z -2 (2)	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Photobacterium damsela</i>
13		6Z-2 (3)	ND	<i>Photobacterium damsela</i>
14		6Z -3 (2)	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Photobacterium</i> sp.
15	Contralmirante Villar	1ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
16		6ZT	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. ponticus</i>	<i>Vibrio</i> sp.
17		8ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Vibrio campbellii</i>
18		10ZT	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. ponticus</i>	<i>Vibrio owensii</i>
19		12ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Vibrio campbellii</i>
20		14ZT	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>	<i>Vibrio hyugaensis</i>
21		16ZT	ND	<i>Vibrio owensii</i>



En la tabla 6 se observa que la identificación molecular fue capaz de declarar identidad a nivel de especie en 15 de las 21 cepas; incluyendo a cuatro de las cepas en las que la identificación bioquímica no pudo identificar ni siquiera el género.

Tabla 6. Resumen de la eficiencia de la identificación bioquímica y molecular

Nivel de identificación	Identificación bioquímica		Identificación molecular	
	Nº	%	Nº	%
Especie	3	14,3	15	71,4
Grupo de especies	11	52,4	0	0,0
Género	1	4,8	4	19,0
No identificadas	6	28,6	2	9,6

Por otra parte, hubieron cepas en las cuales la identificación bioquímica y la molecular no coincidieron ni siquiera a nivel de género; por ejemplo, la cepa 3PX, fue identificada como *Shigella* sp. a nivel bioquímico pero como *Vibrio* sp. a nivel molecular; mientras que, la cepa 3Z -2 (2) fue identificada bioquímicamente como *Pantoea agglomerans*, pero molecularmente fue identificada como *Vibrio* sp.; además las cepas 6Z-2(1) y 6Z-2(2) fueron identificadas bioquímicamente como *V. parahaemolyticus* o como alguna otra especie de *Vibrio*, en tanto que fueron identificadas molecularmente como *P. damsela*.

Al comparar los resultados resumidos de ambas identificaciones como se observa en la tabla 6, se evidencia la superioridad de la identificación molecular sobre la bioquímica; puesto que, mediante la primera se identificó al 71,4% de las cepas a nivel de especie; mientras que, con la segunda solo a 14,3%. Asimismo, la identificación molecular superó a la bioquímica al momento de identificar cepas a nivel de género, pues fue capaz de asignar el género a 19,0% de las cepas, frente a 4,8% de las cepas que se identificaron bioquímicamente. Por último, mientras que la identificación bioquímica no fue capaz de identificar a 28,6% de las cepas, la identificación molecular no pudo identificar sólo a 9,6%. Estos datos muestran el mayor poder de identificación que se logra al emplear el método molecular; al respecto autores como Bou et al. (2011) y Croci et al. (2007) han precisado que las pruebas bioquímicas a menudo no permiten establecer con certeza una especie sino solo pronosticar cuál es la más probable, esto porque las características fenotípicas y morfológicas de una cepa pueden, sin embargo, también han afirmado que las características genéticas al ser más estables que las fenotípicas tienen una

mayor probabilidad de identificar a una especie bacteriana, tal como se ha observado en este caso.

## V. CONCLUSIONES

1. Se aislaron en medio TCBS 21 cepas presuntivas de *Vibrio* spp., las cuales al ser caracterizadas fenotípicamente fueron bacilos Gramnegativos oxidasa positivos
2. Se pudo identificar bioquímicamente tres cepas a nivel de especie siendo dos de ellas *Vibrio parahaemolyticus* y una *Pantoea agglomerans*. En el caso de 11 cepas sólo se pudo reducir la incertidumbre de su identificación a nivel de un conjunto de entre tres y cinco especies de *Vibrio*,
3. Mediante identificación molecular se pudo identificar a 15 cepas que correspondieron a las especies *Vibrio rotiferanius*, *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. brasiliensis*, *V. mitili*, *Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus* y *V. hyugaensis*; en tanto, también se logró identificar a nivel de género a 4 cepas que correspondieron a *Vibrio* y *Photobacterium*.
4. La identificación molecular superó a la bioquímica, pues con la identificación bioquímica fue posible identificar a nivel de especie sólo al 14,3% de las cepas bacterianas, en tanto que con la identificación molecular se logró identificar al 71,4%; asimismo, la identificación molecular superó a la bioquímica al momento de identificar cepas a nivel de género, pues fue capaz de asignar el género a 19,0% de las cepas, frente a 4,8% de las cepas que se identificaron bioquímicamente.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Comparar la identificación genómica con la proteómica, mediante espectrometría de masas, puesto que esta última técnica podría proporcionar una vía de identificación que sea similar en eficiencia con la genómica.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, G. R. S., Dias, G. M., Wellington-Oguri, M., Chimetto, L., Campeão, M. E., Thompson, F. L., & Thompson, C. C. (2014). Genotype to phenotype: Identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt\_2), 357-365. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.057927-0>
- Angulo, L., Perichi, G. A., Castro, L. D., & Figueroa, R. (2020). Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN genómico en babosas plagas (Mollusca: Gasterópoda). *Revista Científica Ecociencia*, 7(4), 35-49. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.74.380>
- Arévalo, Z., Clavijo, A. M., Rolo, M., Álvarez, M., Conroy, D., Infante, D., & Santander, J. (2003). Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de lisas y tilapias en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(2), 127-130.
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C. L., Jones, D. D., & Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods*, 36(3), 215-225. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00037-8)
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Choopun, N., Louis, V., Huq, A., & Colwell, R. R. (2002). Simple procedure for rapid identification of *Vibrio cholerae* from the aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 995-998. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.995-998.2002>
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., Toti, L., Ottaviani, D., Pruzzo, C., Serratore, P., Fischetti, R., Goffredo, E., Loffredo, G., Mioni, R., & the *Vibrio parahaemolyticus* Working Group. (2007). Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio*

- parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 229-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03046.x>
- Cuéllar-Ánjel, J. (2008). Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo. En V. Morales Q. & J. Cuéllar-Anjel (Eds.), *Guía técnica— Patología e inmunología de camarones penaeidos* (1ra edición, pp. 1-52). Programa CYTED Red II-D Vannamei. [http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA %20E%20INMUNOLOGIA.pdf](http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA%20E%20INMUNOLOGIA.pdf)
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). *Vibriosis*. The Center for Food Security & Public Health - Institute for International Cooperation in Animal Biologics. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- de Souza, C., & Wan, A. H. L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181, 107527. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>
- Dulanto, J. R. (2013). *Identificación rápida de especies del género Vibrio asociados con el cultivo de «langostino blanco» Litopenaeus vannamei por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)* [Tesis de Biólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. [http://200.62.146.130/bitstream/handle/cybertesis/3432/Dulanto\\_gj.pdf;jsessionid=E77FC1DFC76C5D229B353D0425B67DEE?sequence=3](http://200.62.146.130/bitstream/handle/cybertesis/3432/Dulanto_gj.pdf;jsessionid=E77FC1DFC76C5D229B353D0425B67DEE?sequence=3)
- Farmer, J. J., & Hickman-Brenner, F. W. (2006). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 508-563). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X\\_18](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_18)
- Ghosh, A. K., Panda, S. K., & Luyten, W. (2021). Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 192-210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.006>
- Gómez, B., Roque, A., & Guerra, A. L. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto en el uso de antibióticos. En F. Páez-Osuna (Ed.), *Camaronicultura y medio ambiente* (pp. 315-346). UNAM. [http://www.researchgate.net/profile/Bruno\\_Gomez-Gil/publication/229150678\\_Las\\_Enfermedades\\_en\\_la\\_Camaronicultura/file/79e41509bd22371a4b.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Bruno_Gomez-Gil/publication/229150678_Las_Enfermedades_en_la_Camaronicultura/file/79e41509bd22371a4b.pdf).

- Gómez-Gil, B., Roque, A., & Soto-Rodríguez, S. (2015). Vibriosis en camarones y su diagnóstico. En A. Ruiz-Luna, C. A. Berlanga-Robles, & M. Betancourt Lozano (Eds.), *Avances en acuicultura y manejo ambiental* (pp. 137-150). Editorial Trillas: CIAD. [https://www.researchgate.net/profile/Bruno-Gomez-Gil/publication/235636525\\_Vibriosis\\_en\\_camarones\\_y\\_su\\_diagnostico\\_vibriosis\\_in\\_shrimp\\_and\\_its\\_diagnosis/links/0fcfd51224b70b98a0000000/Vibriosis-en-camarones-y-su-diagnostico-vibriosis-in-shrimp-and-its-diagnosis.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Bruno-Gomez-Gil/publication/235636525_Vibriosis_en_camarones_y_su_diagnostico_vibriosis_in_shrimp_and_its_diagnosis/links/0fcfd51224b70b98a0000000/Vibriosis-en-camarones-y-su-diagnostico-vibriosis-in-shrimp-and-its-diagnosis.pdf)
- Gomez-Gil, B., Tron-Mayén, L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V., & Guerra-Flores, A. L. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 163(1-2), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00162-8)
- González, J., Prado, P., & Quiñonez, D. (2003). Bacteriología en sedimentos, agua y organismos. En *Técnicas de bacteriología, análisis en fresco, calidad de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas camaroneras* (1ra edición, pp. 5-33). Cesasin. <http://www.cesasin.com.mx/ManualCapacitacion.pdf>
- Jadeja, R., Jaroni, D., Vijayakumar, P., & Chintagari, S. (2015). Immunoassays for *Vibrio vulnificus*: A mini review. *AASCIT Journal of Biology*, 1(4), 48-54.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Ki, J.-S., Zhang, W., & Qian, P.-Y. (2009). Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.003>
- Kumar, V., Roy, S., Meena, D. K., & Sarkar, U. K. (2016). Application of probiotics in shrimp aquaculture: Importance, mechanisms of action, and methods of administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4), 342-368. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1193841>
- Labella, A. M., Arahal, D. R., & Castro, D. (2017). Revisiting the genus *Photobacterium*: Taxonomy, ecology and pathogenesis. *International Microbiology*, 20, 1-10. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.280>

- Lomelí, C. O. (2011). *La fagoterapia como estrategia para reducir la mortalidad por vibriosis en larvas de camarón blanco Litopenaeus vannamei* [Tesis de Maestro en Manejo de Recursos Marinos, Instituto Politécnico Nacional]. <http://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/15452/1/lomelio1.pdf>
- Moi, I. M., Roslan, N. N., Leow, A. T. C., Ali, M. S. M., Rahman, R. N. Z. R. Abd., Rahimpour, A., & Sabri, S. (2017). The biology and the importance of *Photobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(11), 4371-4385. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8300-y>
- Morales-Covarrubias, M. S. (2008). Enfermedades bacterianas. En V. Morales & J. Cuéllar-Anjel (Eds.), *Enfermedades bacterianas Guía técnica—Patología e inmunología de camarones penaeidos* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 117-134). Programa CYTED Red II-D Vannamei. <http://www.rr-americas.oie.int/documentos/PATOLOGIA%20E%20INMUNOLOGIA.pdf>
- Oviedo, J. X. (2014). *Identificación y caracterización molecular del genero Vibrio en la hemolinfa y hepatopancreas de Litopenaeus vannamei en cultivo semi-insentivo en Tumbes, 2014* [Tesis de Ingeniero Pesquero, Universidad Nacional de Tumbes]. <https://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/206>
- Pascual, J., Macián, M. C., Arahall, D. R., Garay, E., & Pujalte, M. J. (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 154-165. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010702-0>
- Peng, X., Yu, K.-Q., Deng, G.-H., Jiang, Y.-X., Wang, Y., Zhang, G.-X., & Zhou, H.-W. (2013). Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 455-462. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.015>
- Peña, L. J., & Cuéllar-Anjel, J. (2019). *Vibriosis en camarón blanco del Pacífico Penaeus vannamei*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/2755/CASO%20CL%c3%8dNICO%20LEIDY%20PE%c3%91A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rosado, A. A. (2018). *Resistencia antimicrobiana de bacterias del género Vibrio en langostino blanco (Litopenaeus vannamei) en centros de cultivo de la región*



- Tumbes* [Tesis de Médico Veterinario, Universidad Ricardo Palma]. [http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1686/Rosado\\_a.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1686/Rosado_a.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Sabir, M., Ennaji, M. M., & Cohen, N. (2013). *Vibrio Alginolyticus*: An emerging pathogen of foodborne diseases. *International Journal of Science and Technology*, 2(4), 302-309.
- Schirmeister, F., Wieczorek, A., Dieckmann, R., Taureck, K., & Strauch, E. (2014). Evaluation of molecular methods to discriminate the closely related species *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 851-857. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.001>
- Serrano, L. V. (2014). *Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelo de la Antártida* [Tesis de Ingeniero en Acuicultura, Escuela Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25086/1/Tesis%20Lizette%20Serrano.pdf>
- Silva, W., Olea, A., Cachicas, V., Fernández, J., Ibáñez, D., Hormazábal, J. C., García, J., & Maldonado, A. (2008). *Manual de procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de Vibrio parahaemolyticus* (1ra edición). Ministerio de Salud - Instituto de Salud Pública. [https://www.medicatec.com/arg/files/Manual%20de%20Procedim.%20Chrom.Vibrio%20-%20Chile\[1\].pdf](https://www.medicatec.com/arg/files/Manual%20de%20Procedim.%20Chrom.Vibrio%20-%20Chile[1].pdf)
- Sulca, M. A. (2011). *Identificación y caracterización de integrones y su asociación con la resistencia a antibióticos en cepas de Vibrio spp. aisladas de ambientes marinos contaminados de Lima-Perú* [Tesis de Magister en Biología Molecular, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3326>
- Thillaichidambaram, M., Narayanan, K., Selvaraj, S., Sundararaju, S., Chockalingam Muthiah, R., & Figge, M. J. (2022). Isolation and characterization of *Vibrio owensii* from Palk Bay and its infection study against post larvae of *Litopenaeus vannamei*. *Microbial Pathogenesis*, 172, 105751. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105751>
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—Identification of microorganisms and beyond

(mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 965-974.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>

Zúniga, S. E., Martínez, Y. L., & Carrasco, L. A. (2022). *Incidencia de colonias amarillas y verdes del género Vibrio encontradas en los hepatopáncreas de camarones Litopenaeus vannamei presentes en dos granjas de cultivos en las zonas de León y Chinandega* [Tesis de Ingeniero Acuícola, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/9461/1/250666.pdf>

## **ANEXOS**


## Anexo 1

Tabla 7. Parámetros de calidad del ADN extraído, evaluado mediante espectrofotometría

Código de cepa	A260/280nm	A260/230nm
2E	1,324	0,342
4E	1,444	0,424
5E	1,464	0,433
7E	1,523	0,508
8E	1,328	0,343
9E	1,501	0,567
10E	1,522	0,418
11E	1,448	0,459
12E	1,487	0,459
13E	1,161	0,245
14E	1,345	0,344
15E	1,456	0,462
16E	1,305	0,333
17E	1,336	0,374
18E	1,383	0,407
19E	1,493	0,493
20E	1,253	0,278
21E	1,194	0,275
22E	1,995	0,528
23E	1,902	0,478
24E	1,854	0,845

Anexo 2.

Pruebas bioquímicas para la identificación de *Vibrio* spp.



RUC: 20604409986  
www.pezbiotec.com

INFORME DE RESULTADOS 001-M-2023					
Fecha de ingreso	06/04/2023	Fecha de proceso	06/04/2023	Fecha de reporte	08/04/2023
Solicitante	Carlos Emilio Flores Aguilar			DNIRUC	
Procedencia Ciudad / Región	Tumbes				
Método de ensayo	Microbiológico – Bateria Bioquímica				
Presentación de la muestra	Tubos cónicos con agar inclinado				

RESULTADOS DE BATERIA BIOQUÍMICA											
N°	Código de la muestra	TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	IND	CIT	URE	MOT	LIS	ORN	Enterobacteria presuntiva
1	IV	K/K	-	-	-	-	-	-	-	-	Shigella grupo A, B y C
2	IA	A/A	+	-	-	+	-	+	-	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
3	IP	A/A	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
4	IS	A/A	-	+	+	-	-	+	-	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
5	IN	A/A	-	+	+	-	-	+	-	-	<i>Pantoea agglomerans</i>

TSI: triple sugar iron agar, H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrógeno, IND: indol, CIT: citrato, URE: ureasa, MOT: motilidad, LIS: lisina, ORN: ornitina, K/K: alcalino/alcalino, A/A: ácido/ácido, + : positivo, - : negativo, \*+ : positivo leve.

N°	Código de la muestra	GLU	IND	MOT	LIS	Limitado para bacterias del género <i>Vibrio</i>
1	IV	-	-	-	-	Sin concordancia
2	IA	+	-	+	-	<i>V. ordalii</i> , <i>V. parvulus</i> , <i>V. splendidus</i>
3	IP	+	-	-	-	Sin concordancia
4	IS	+	+	+	-	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. parvulus</i> , <i>V. parvulus</i>
5	IN	+	+	+	-	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. parvulus</i> , <i>V. parvulus</i>



GLU: fermentación de la glucosa, IND: indol, MOT: motilidad, LIS: lisina, + : positivo, - : negativo

**Alcance:** Este resultado sólo aplica a las muestras procesadas en el laboratorio.

Atentamente,

Urb. Hermanos Cárcamo Mz. D Lote 24, Piura – Perú  
Telf: 942247434/993454232  
e-mail: contacto@pezbiotec.com

Página 1 de 2

ANEXOS

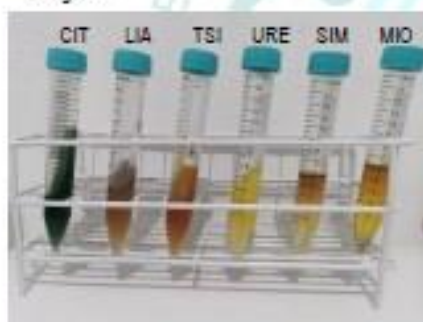
Código: IN



Código: IS



Código: IP



Código: IA



Código: IV



### Anexo 3

Determinación de especie de *Vibrio* usando las pruebas de lisina, ornitina, ureasa y triple sugar iron agar



RUC: 20604409986  
www.pezbiotec.com

PEZBIOTEC

#### INFORME DE RESULTADOS 001-M-2024

Fecha de ingreso	01/01/2024	Fecha de proceso	15/01/2024	Fecha de reporte	23/01/2024
Solicitante	Carlos Emilio Flores Aguilar			DNI/RUC	
Procedencia Ciudad / Región	Tumbes				
Método de ensayo	Microbiológico – Batería Bioquímica				
Presentación de la muestra	Placa de Petri				

#### RESULTADOS DE BATERIA BIOQUÍMICA

N°	Código de muestra	TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	IND	CIT	URE	MOT	LIS	ORN	GLU	Limitado para Vibrio según LIS, ORN, URE, TSI
1	60	A/K	-	-	-	-	-	+	K/K	+	-	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>
2	27	K/A	-	-	-	-	-	+	K/K	+	+	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>
3	44	K/K	-	-	-	-	-	-	K/K	+	-	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>
4	72	K/K	-	-	-	-	+	-	K/K	+	-	<i>V. parahaemoliticus</i>
5	61	A/K	-	-	-	-	-	+	K/K	+	-	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>
6	73	A/K	-	-	-	-	+	+	K/K	+	-	<i>V. parahaemoliticus</i>
7	45	K/K	-	-	-	-	-	-	K/K	+	-	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>
8	28	A/A	-	-	-	-	-	+	K/K	+	+	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>
9	62	K/K	-	-	-	-	-	+	K/K	+	-	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>
10	82	A/A	+	-	-	+	-	+	K/K	+	+	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemoliticus</i> / <i>V. vulnificus</i> / <i>V. alginolyticus</i> / <i>V. mimicus</i>

TSI: triple sugar iron agar, H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrógeno, IND: indol, CIT: citrato, URE: ureasa, MOT: motilidad, LIS: lisina hierro agar, ORN: ornitina, GLU: fermentación de la glucosa  
K: alcalino, A: ácido, +: positivo, -: negativo,

**Alcance:** Este resultado sólo aplica a las muestras procesadas en el laboratorio.

Atentamente,

Miguel Alberto Flores Aguilar  
Biólogo  
C.B.P. 16044



Urb. Hermanos Cárcamo Mz. D Lote 24, Piura – Perú  
Telf: 942247434/993454232  
e-mail: contacto@pezbiotec.com



ANEXOS

\*ORDEN: CITRATO, LIA, TSI, UREA, SIM, MIO

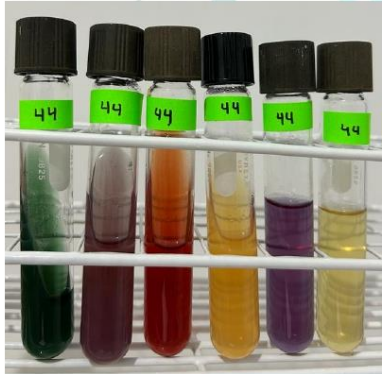
Muestra: 60



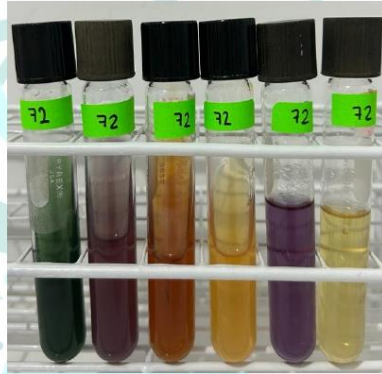
Muestra: 27



Muestra: 44



Muestra: 72



Muestra: 61



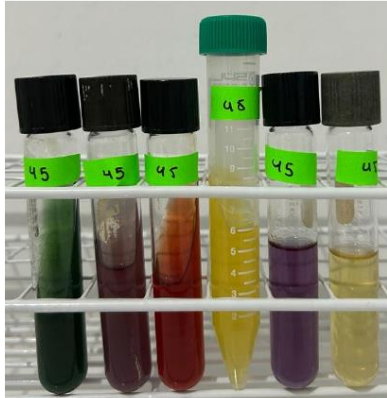
Muestra: 73



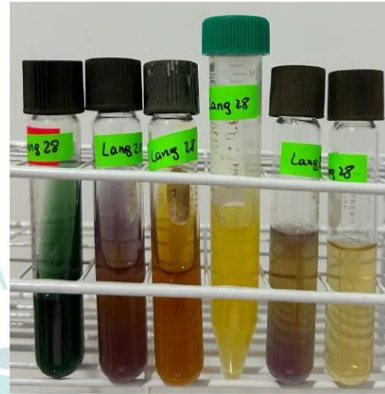
Urb. Hermanos Cárcamo Mz. D Lote 24, Piura – Perú  
Telf: 942247434/993454232  
e-mail: contacto@pezbiotec.com



Muestra: 45



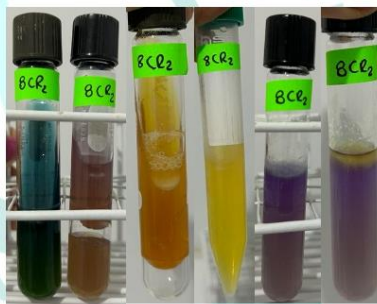
Muestra: 28



Muestra: 62



Muestra: 82



Caption	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. fischerii</i>	<i>V. furnisii</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metchnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>
TCBC agar	YLW	GRN	YLW	YLW	GRE	YLW	YLW	GRE	ABS	GRE	GRE
mCPC agar	Purple	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	NOTD	ABS	ABS	ABS	ABS
AGS	AKa	AKa	AKAK	AKAK	AKa	AKa	NOTD	NAD	Aka	AKAK	AKa
Grth. NaCl (0%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grth. NaCl (3%)	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+
Grth. NaCl (6%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grth. NaCl (8%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grth. NaCl (10%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Grth at 42 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CA	NOTD	+	-	NOTD	+	+	NOTD	NOTD	NOTD	NOTD	NOTD
VP	NOTD	+	-	NOTD	+	+	NOTD	NOTD	NOTD	NOTD	NOTD
SU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CE	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MA	+	+	+	+	Va	+	+	+	+	+	+
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ld	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oj	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S 0/129 (10 µg)	SNITIVE	REST	REST	REST	SNITIVE	REST	SNITIVE	SNITIVE	NAD	SNITIVE	SNITIVE
S 0/129 (50 µg)	SNITIVE	SNITIVE	SNITIVE	SNITIVE	SNITIVE	SNITIVE	SNITIVE	SNITIVE	NAD	SNITIVE	SNITIVE
GE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UR	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Note: AGS—arginine-glucose slant; Grth—Growth; CA—Capsule; VP—Voges-Proskauer; SU—Sucrose; CE—Cellulose; LA—Lactose; AB—Arabinose; MA—Mannitol; OX—Oxidase; Ad—Arginine dihydrolase; Ld—Lysine decarboxylase; Od—Ornithine decarboxylase; GE—Gelatinase; UR—Urease; AC—Acid; AK—Alkaline; Va—Variable reaction; a—slight acid; ABS—Absence of growth; GRE—green; YEL—yellow; NOTD—Not determined; SNITIVE—Sensitive; REST—Resistant. Adapted from [40,41].