



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

IMPORTANCIA DE LA TINCIÓN DE GRAM EN LA IDENTIFICACIÓN
DE PATÓGENOS PRESENTES EN EL CULTIVO DE *LITOPENAEUS*
VANNAMEI

MONCADA MONCADA ALEX XAVIER
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

IMPORTANCIA DE LA TINCIÓN DE GRAM EN LA
IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS PRESENTES EN EL CULTIVO
DE *LITOPENAEUS VANNAMEI*

MONCADA MONCADA ALEX XAVIER
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA
2022



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

EXAMEN COMPLEXIVO

IMPORTANCIA DE LA TINCIÓN DE GRAM EN LA IDENTIFICACIÓN DE
PATÓGENOS PRESENTES EN EL CULTIVO DE *LITOPENAEUS VANNAMEI*

MONCADA MONCADA ALEX XAVIER
INGENIERO ACUÍCULTOR

RIVERA INTRIAGO LEONOR MARGARITA

MACHALA, 14 DE FEBRERO DE 2022

MACHALA
14 de febrero de 2022

IMPORTANCIA DE LA TINCIÓN DE GRAM EN LA IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS PRESENTES EN EL CULTIVO DE LITOPENAEUS VANNAMEI

por Alex Moncada

Fecha de entrega: 07-feb-2022 10:51a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1756910426

Nombre del archivo: TRABAJO_DE_TITULACION_DEL_SEOR_ALEX_MONCADA_MONCADA.docx (1.78M)

Total de palabras: 2891

Total de caracteres: 15953

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, MONCADA MONCADA ALEX XAVIER, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Importancia de la tinción de gram en la identificación de patógenos presentes en el cultivo de *Litopenaeus vannamei*, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

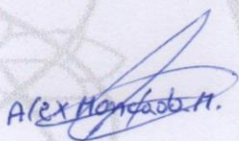
El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 14 de febrero de 2022



Alex Moncada M.

MONCADA MONCADA ALEX XAVIER
0706500311

Resumen

El desarrollo de la acuicultura requiere herramientas que proporcionen al productor una manera más eficaz de controlar la presencia de patógenos en los cultivos de camarón, por esta razón este documento recopila información bibliográfica acerca de la importancia que tiene para el sector acuícola la utilización de técnicas que permitan la identificación de bacterias que comprometen seriamente la supervivencia en los estanques acuícolas. La tinción de gram es una herramienta para la identificación de bacterias gram negativas y gram positivas mediante la utilización de colorantes que según la composición de la pared celular de las bacterias determinará a que grupo pertenecen. Esta técnica se efectúa colocándose cristal violeta en la muestra, el cual es un colorante que tiñe las bacterias gram positivas de un color azul-violeta, mientras que para la identificación de bacterias gram negativas se añade safranina a la muestra y esta se encarga de teñirlas en un color rojo-rosa. Este proceso se realiza gracias al contenido de peptidoglicanos que posee la bacteria es su pared celular, las bacterias gram positivas al contener una mayor cantidad de peptidoglicanos son capaces de retener una mayor proporción del colorante inicial, mientras que las bacterias gram negativas al poseer una capa fina de peptidoglicanos no retienen el colorante inicial y se tiñen con la safranina colocada al final del proceso, lo que al observar al microscopio permite identificarlas con una mayor facilidad.

Palabras claves: Tinción de gram, bacteria, peptidoglicanos, pared celular, camarón, microscopio, estanques.

Abstrac

The development of aquaculture requires tools that provide the producer with a more effective way to control the presence of pathogens in shrimp farms. For this reason, this document compiles bibliographic information about the importance for the aquaculture sector of using techniques that allow the identification of bacteria that seriously compromise the survival of aquaculture ponds. Gram staining is a tool for the identification of gram-negative and gram-positive bacteria through the use of dyes that, according to the composition of the cell wall of the bacteria, will determine to which group they belong. This technique is performed by placing crystal violet in the sample, which is a dye that stains gram-positive bacteria in a blue-violet color, while for the identification of gram-negative bacteria safranin is added to the sample and this is responsible for staining them in a red-pink color. This process is carried out thanks to the content of peptidoglycans that the bacteria have in their cell wall, gram-positive bacteria by containing a greater amount of peptidoglycans are able to retain a greater proportion of the initial dye, while gram-negative bacteria by having a thin layer of peptidoglycans do not retain the initial dye and are stained with safranin placed at the end of the process, which when observed under the microscope allows identifying them more easily.

Key words: gram stain, bacteria, peptidoglycan, cell wall, shrimp, microscopy, ponds.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. DESARROLLO.....	6
2.1. Enfermedades bacterianas en camarones (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	6
2.1.1. Enfermedades bacterianas en larvicultura	6
2.1.1.1. Bacterias luminiscentes	6
2.1.1.2. Bolitas blancas.....	6
2.1.1.3. Epibiontes bacterianos.....	7
2.1.2. Enfermedades bacterianas en la fase de engorde	7
2.1.2.1. Síndrome del Camarón Manchado	7
2.1.2.2. Síndrome de la gaviota	7
2.1.2.3. Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND).....	8
2.1.2.4. Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)	8
2.1.2.5. Estreptococosis	8
2.2. Técnicas de diagnóstico	9
2.2.1. Anamnesis.....	9
2.2.2. Examen clínico	9
2.2.3. Microscopía Directa (Análisis en fresco)	10
2.2.4. Bacteriología.....	10
2.2.5. Histología.....	10
2.3. Tinción de Gram	11
2.3.1. Bacterias Gram positivas	11
2.3.2. Bacterias Gram negativas	12
2.3.3. Procedimiento de la tinción de Gram	13
3. CONCLUSIÓN	16
4. BIBLIOGRAFÍA	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Examen clínico en <i>Litopenaeus vannamei</i>	9
Figura 2. Análisis en fresco Hepatopáncreas y branquias	10
Figura 3. Pared celular de bacteria gram positiva	12
Figura 4. Pared celular de bacteria gram negativa	12
Figura 5. Aplicación de cristal violeta	13
Figura 6. Lavado con agua destilada	13
Figura 7. Aplicación de lugol como fijador	14
Figura 8. mezcla de alcohol y acetona como deshidratante.....	14
Figura 9. Aplicación de safranina	15
Figura 10. <i>Bacillus anthracis</i> (Gram positivo)	15
Figura 11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram negativo)	15

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es un sector de crecimiento continuo a lo largo de los años, significando un pilar fundamental en el desarrollo económico de diversos países, entre los cuales destaca Ecuador, el cultivo de organismos acuáticos requiere técnicas y protocolos que ayuden a preservar la salud de los animales durante toda la cadena productiva, de esta forma poder asegurar que el producto pueda cumplir con todos los estándares de calidad obteniendo una mayor rentabilidad al final de cada ciclo.

Asociado al crecimiento del sector acuícola, también surgen una variedad de enfermedades que amenazan seriamente con la producción, es por este motivo que la detección temprana de agentes patógenos en los cultivos se torna un punto importante para mantener la salud de los organismos. Desde los inicios de la acuicultura se destacó el rol que juegan las enfermedades para el sector camaronero, considerándose una amenaza biológica que diezma los cultivos y que causan importantes pérdidas económicas para toda la industria (Lightner & Redman, 1998).

Para lograr una oportuna detección de patógenos se cuenta con una variedad de técnicas para el diagnóstico y cada una de ellas posee su respectivo grado de confiabilidad y aplicabilidad en los cultivos. En la aplicación de cada técnica se necesita una adecuada preparación, además de poder contar con todos los equipos e implementos necesarios para un correcto diagnóstico. La elección de una técnica en concreto va a depender de cada situación, las posibilidades y los recursos con los que se disponga en los laboratorios, además del tiempo que requieran las muestras para procesarlas (Varela & Choc-Martínez, 2020).

Este trabajo bibliográfico destaca la importancia de la tinción de Gram para la detección de agentes infecciosos en camarones, según (Rodríguez & Arenas, 2018) en la actualidad esta técnica continúa siendo importante y eficaz en los laboratorios ya que permite una detección rápida de patógenos, además de ser económica en comparación a otras técnicas utilizadas con los mismo fines.

2. DESARROLLO

2.1. Enfermedades bacterianas en camarones (*Litopenaeus vannamei*)

Se ha logrado demostrar que la aparición de enfermedades en camarones está estrechamente relacionada con la condición fisiológica de los organismos, la misma que depende del ambiente en el cual se desarrollan (Muñoz *et al.*, 2000). El mal manejo de los cultivos es la causa principal del estrés que se produce en los organismos, esto debido a la fluctuación de factores químicos, físicos o biológicos lo cual podría derivar en una reducida respuesta inmune ante la aparición de patógenos en los cultivos, que atacan y generan enfermedades (Perazzolo *et al.*, 2002).

Las enfermedades producidas por bacterias pueden generar una significativa mortalidad en los cultivos, también son causantes del lento o reducido crecimiento de los camarones. El género de bacterias más importante y que produce grandes mortalidades si no se logra controlar son los *Vibrios*, ya que pueden atacar durante la fase larvaria como también en la fase de engorde, este género además puede estar presente tanto en aguas dulces, salobres o marinas (Otta *et al.*, 1999).

2.1.1. Enfermedades bacterianas en larvicultura

2.1.1.1. Bacterias luminiscentes

Estas bacterias son denominadas de esta forma debido a que en las noches las larvas presentan una apariencia brillante. Estos patógenos pueden colonizar el tracto digestivo, los apéndices y afectar considerablemente el hepatopáncreas; el desarrollo de esta enfermedad provoca una septicemia que finalmente lleva a la muerte de los camarones. Es producida por el *Vibrio harveyi*, mayormente se asocia su aparición a los meses de verano, la forma en que logra ingresar a los camarones es a través del agua o el alimento donde pueden colonizar el tracto digestivo (Paucar *et al.*, 2018).

Para obtener un diagnóstico se necesita aislar estas bacterias mediante la obtención de especímenes que presentan los signos característicos de la enfermedad. Para el aislamiento del patógeno se procede a sembrar en agar TCBS mediante un previo macerado de las larvas afectadas, al observarse considerables colonias verdes son tomadas como un indicativo de la presencia de esta enfermedad (Gómez *et al.*, 2001).

2.1.1.2. Bolitas blancas

Esta enfermedad se caracteriza porque se puede observar pequeñas formaciones de color blanco en el hepatopáncreas, también conocidas como “Bolitas blancas”. Son

descamaciones celulares que se producen en el hepatopáncreas y que al observarse tienen una forma esférica, también se las puede observar en el tracto digestivo. El origen de esta enfermedad está asociada a la reacción de los organismos ante la presencia de toxinas bacterianas (*Vibrio spp.*), también en menor proporción puede estar ligada al efecto de metales pesados presentes en el ambiente. Esta enfermedad también se la conoce como el síndrome de Zoea II y el principal patógeno al que se ha asociado esta enfermedad es el *V. harveyi*, entre los principales signos clínicos podemos destacar una baja alimentación, nado errático y altas mortalidades en los cultivos (Gómez *et al.*, 2001).

2.1.1.3. Epibiontes bacterianos

Esta enfermedad es originada por la bacteria *Leucothrix Mucor*. También se la conoce como enfermedad de las branquias del camarón, se puede observar una coloración que varía entre amarillo verdoso a café. La causa de muerte de los organismos es producida por asfixia ante la invasión del patógeno en las lamelas branquiales del camarón, generando un obstáculo para el intercambio gaseoso. La presencia de esta bacteria se asocia a una alta concentración de nutrientes en los estanques (Gómez *et al.*, 2001).

2.1.2. Enfermedades bacterianas en la fase de engorde

2.1.2.1. Síndrome del Camarón Manchado

Esta patología se asocia a la presencia de *Vibrios sp.*, también está relacionada con otras bacterias oportunistas como *Flavobacterium sp.*, *Aeromonas sp.* y *Spirillum sp.* Entre las características que podemos observar en los organismos tenemos la presencia de lesiones de color café a negro en el exoesqueleto, branquias o apéndices, esto cuando los organismos se encuentran considerablemente estresados. Esta patología si no es controlada puede agravar su condición originando la formación de “Astillas negras”, la cual también llega a desarrollarse como una “vibriosis sistémica” (Paucar *et al.*, 2018).

2.1.2.2. Síndrome de la gaviota

Esta patología debe su nombre a la presencia de camarones moribundos que se puede observar en la superficie de los estanques, lo que atrae a las gaviotas que se alimentan fácilmente de los camarones enfermos, puede causar una mortalidad de hasta el 90% de la producción. Según diversos estudios los síntomas que se pueden observar son similares a los producidos por una “vibriosis sistémica”, conocida también con ese nombre en varias regiones de América latina. El desarrollo de esta patología se asocia a alteraciones

en el ambiente como altos niveles de nitrógeno, elevadas temperaturas y cambios bruscos de salinidad (Gómez *et al.*, 2001).

2.1.2.3. Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND)

Esta enfermedad es considerada relativamente nueva en el cultivo de peneidos ya que inicialmente se conocía como síndrome de mortalidad temprana (EMS), la misma que ha generado graves estragos en los cultivos camaroneros (Kumar *et al.*, 2021).

Según (Tran *et al.*, 2013) la AHPND es una patología que se caracteriza por generar atrofia severa en el hepatopáncreas de los camarones, a la que puede acompañar cambios histopatológicos durante la fase aguda de la enfermedad. A medida que la patología se desarrolla se logra observar un desprendimiento masivo de células epiteliales del tracto digestivo o del hepatopáncreas (R. Kumar *et al.*, 2020).

El agente causante de esta enfermedad es el *Vibrio parahaemolyticus*, el cual es un patógeno perjudicial para los camarones, pero no para los humanos, es una bacteria gram negativa con forma de bastón y que está presente en diversas regiones del planeta (Santos *et al.*, 2020).

2.1.2.4. Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)

Según Rubio *et al.*, (2012) esta es una enfermedad severa causada por varios agentes, de acuerdo a varios estudios histopatológicos y ultraestructurales. Entre los síntomas que pueden presentar los organismos afectados está la presencia de anorexia, letargia, intestino vacío, disminución en la tasa de alimentación, cutícula flácida, cromatóforos extendidos, altas tasas de conversión alimenticia, branquias sucias y una apariencia oscura tanto en los pleópodos y urópodos. También es común observar el hepatopáncreas atrofiado el cual puede presentar un color naranja pálido distintivo con secciones melanizadas (Ibarra, 2006).

2.1.2.5. Estreptococosis

Esta patología es causada por la bacteria *Streptococcus sp.*, la cual puede provocar alta mortalidad en el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* reportándose pérdidas de hasta el 80 % de la producción. Los organismos afectados presentan una coloración blanquecina en el músculo, además se puede observar opacidad en el ciego hepático posterior. Durante la fase aguda de la enfermedad es visible una coloración blanquecina total, letargia, nado errático, los organismos permanecen en el fondo del estanque y se empieza a elevar la mortalidad (Morales & Cuéllar, 2014).

2.2. Técnicas de diagnóstico

2.2.1. Anamnesis

Es una técnica básica que consiste en la recopilación de información histórica que se obtiene durante las visitas periódicas a las zonas de cultivo. Los datos que se registran están relacionados con la fluctuación de parámetros físico-químicos, calidad del alimento, cambios en los protocolos o tipos de fertilizantes suministrados, aplicación de productos químicos para tratar una determinada enfermedad y el reporte de brotes similares en zonas cercanas del cultivo. El profesional encargado de llevar el registro debe recopilar los datos durante toda la fase de cultivo y de esta manera se pueda obtener un diagnóstico confiable para poder tomar las medidas adecuadas (Morales & Cuéllar, 2014).

2.2.2. Examen clínico

Cuando tenemos problemas por el brote de una enfermedad se realiza una evaluación minuciosa en las unidades de cultivo. Para ello se realiza una captura in situ de los organismos enfermos, se procede a realizar un análisis individual y de esta forma tener una idea de la magnitud del problema; es decir, la prevalencia de la enfermedad, el grado de afectación de los camarones enfermos y el origen de la patología que puede estar provocando mortalidad en los estanques. El examen clínico tiene que evaluar manual y visualmente las condiciones externas del organismo que presenta la enfermedad, mediante esta técnica podemos contar con un diagnóstico presuntivo, el cual nos ayudará a establecer acciones que después serán confirmadas por las pruebas en el laboratorio (Morales & Cuéllar, 2014).

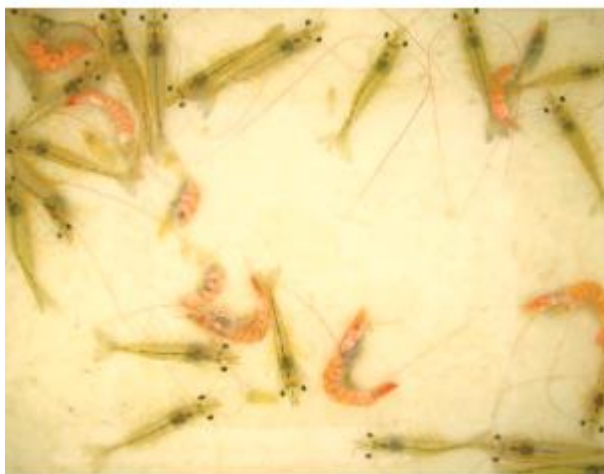


Figura 1. Examen clínico en Litopenaeus vannamei

Fuente: (Morales & Cuéllar, 2014)

2.2.3. Microscopía Directa (Análisis en fresco)

Para la aplicación de esta técnica se procede al análisis de los organismos previamente evaluados en el examen clínico, pero a diferencia de la anterior técnica en esta ocasión se realizará un análisis interno mediante el uso de un microscopio y utilizando diversos aumentos, los mismos que ayudaran a verificar si la estructura interna de los camarones presenta alguna anomalía que nos ayudaría a dilucidar o tener mayor claridad del causante de la enfermedad. Mediante el análisis al microscopio podemos observar estructuras importantes que nos aclaren el panorama como, por ejemplo; el hepatopáncreas, el tracto digestivo y las branquias que suelen ser los principales lugares donde se observa la presencia de patógenos o de características propias de la enfermedad (Peña & Varela, 2015).

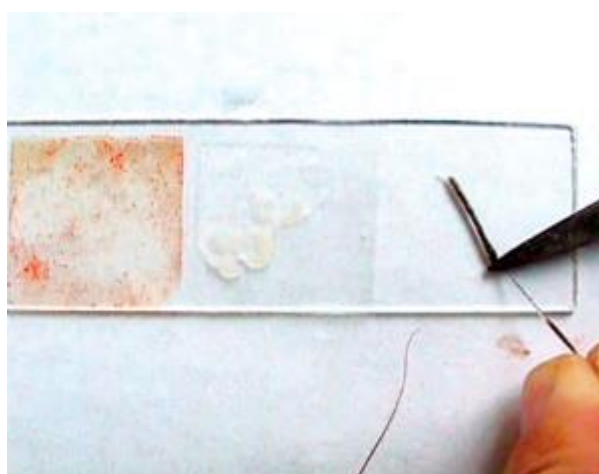


Figura 2. Análisis en fresco Hepatopáncreas y branquias

Fuente:(Morales & Cuéllar, 2014)

2.2.4. Bacteriología

Se considera a la bacteriología como un conjunto de métodos los cuales colaboran con la identificación y diagnóstico de enfermedades bacterianas, para la aplicación de esta técnica se pueden utilizar tanto muestras del agua de cultivo, como también partes internas del camarón que estuviesen afectadas. Esta técnica consiste en la utilización de medios enriquecidos con nutrientes, los mismos que permiten que se desarrollen las bacterias presentes en las muestras y de esta forma se logra establecer que tipo de patógeno es y como preparar un tratamiento adecuado (Morales & Cuéllar, 2014).

2.2.5. Histología

Esta técnica es utilizada para identificar rasgos morfológicos en los tejidos de los organismos mediante el uso de instrumentos que puedan amplificar la muestra. Se puede

definir también como la ciencia que se encarga del estudio de las modificaciones patológicas que se producen en los tejidos y células. En el sector acuícola es utilizada como una herramienta de diagnóstico mediante la cual logramos identificar variaciones a nivel celular en muestras de tejidos que han sido previamente expuestos a procesos físicos y a la aplicación de tinciones para su observación (Morales & Cuéllar, 2014).

Se usa los cortes histopatológicos para la identificación del patógeno causante de las enfermedades en los cultivos, los mismos que pueden ser bacterias o virus, esta importante técnica consiste en realizar cortes a los cuales se les administra una tinción en los tejidos con Hematoxilina, Eosina y Floxina (Peña & Varela, 2015).

2.3.Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica de gran relevancia en el análisis microbiológico. Se establece como una técnica de tinción diferencial ya que mediante la utilización de colorantes permite la agrupación de bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. Esta técnica fue desarrollada en 1884 por el científico danés Hans Christian Gram y en la actualidad es considerada una de las tinciones más utilizadas debido a su eficiencia, sencillez y bajo costo (Beveridge, 2001).

2.3.1. Bacterias Gram positivas

Una de las características principales de las bacterias gram positivas es que poseen varias capas de peptidoglicano junto con ácidos teicoicos, cuya estructura se encuentra formada por polímeros de ribitolfosfato o glicerol-fosfato que se encuentran adheridos al ácido N-acetilmurámico, esta característica permite a la célula estabilizar su pared, además son capaces de actuar como antígenos de superficie y añadirse a receptores específicos que se encuentran en las células del huésped. Por los motivos antes mencionados es posible identificar a las bacterias gram positivas, en su estructura celular se puede observar una tinción de color violeta, esto debido a que poseen varias capas de peptidoglicano que las caracteriza (Lucana & Huanca, 2014).

Una característica que se puede utilizar para la clasificación de las bacterias gram positivas en grupos, son las diferentes cubiertas de proteínas que se encuentran junto a los ácidos teicoicos. Otro factor importante en las bacterias gram positivas son los llamados ácidos lipoteicoicos que presentan una adherencia a la membrana y a la porción visceral fosfato de la pared celular, esto debido a su porción lipídica que se une de forma hidrófoba (Lucana & Huanca, 2014).

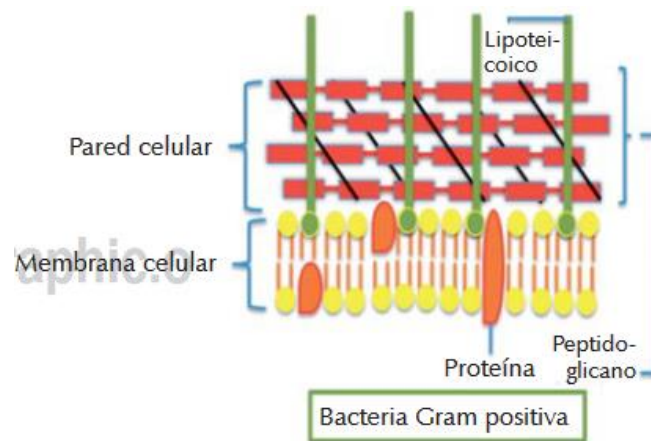


Figura 3. Pared celular de bacteria gram positiva

Fuente: (López *et al.*, 2014)

2.3.2. Bacterias Gram negativas

La diferencia de estas bacterias en comparación a las bacterias gram positivas es que son teñidas mediante safranina, colorante que se utiliza en el último paso de la tinción de gram, el cual les da una tonalidad rojiza. La principal razón por la que se tiñen de este color es porque poseen una fina capa de peptidoglicano. En su estructura la pared celular de las bacterias gram negativas se encuentran constituidas por un espacio periplasmático o periplasma, el cual cuenta con una delgada capa de peptidoglicano, una membrana citoplasmática y en la parte externa podemos encontrar una estructura que se conoce como membrana externa (Lucana & Huanca, 2014).

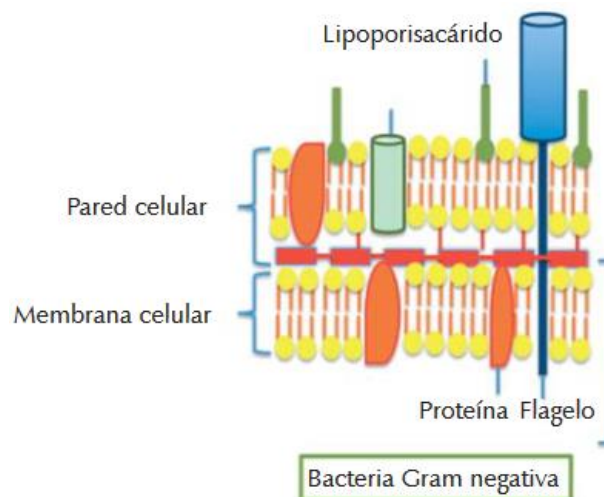


Figura 4. Pared celular de bacteria gram negativa

Fuente: (López *et al.*, 2014)

2.3.3. Procedimiento de la tinción de Gram

Esta tinción se basa en la composición y estructura que poseen las paredes celulares de las bacterias, misma estructura que concede características determinantes a cada microorganismo. Según (López-Jácome *et al.*, 2014) los pasos para realizar esta técnica son los siguientes:

1. Como base para esta técnica se coloca cristal violeta como colorante primario, la cual se adhiere a la pared celular de las bacterias ya que este colorante tiene afinidad por el peptidoglicano.



Figura 5. Aplicación de cristal violeta

Fuente: (KapitalInteligente, 2020)

2. Al transcurrir un minuto se procede a lavar con agua destilada.

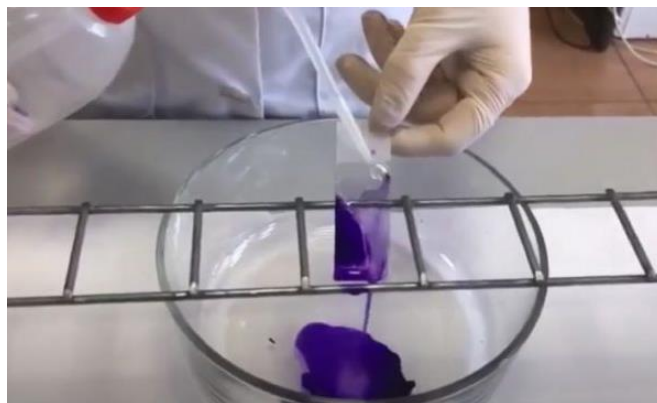


Figura 6. Lavado con agua destilada

Fuente: (KapitalInteligente, 2020)

3. Luego se coloca lugol para poder mantener el cristal violeta en la estructura de la bacteria, es decir funciona como un fijador y esperamos otro minuto.



Figura 7. Aplicación de Lugol como fijador

Fuente: (KapitalInteligente, 2020)

4. Posterior a esto se adhiere durante 15 segundos una mezcla de alcohol y acetona, la cual funciona como un deshidratante de las paredes bacterianas y también degrada la membrana externa que poseen las bacterias gram negativas.



Figura 8. mezcla de alcohol y acetona como deshidratante

Fuente: (KapitalInteligente, 2020)

5. Antes de aplicar el último colorante se procede a lavar con agua destilada para que las bacterias no continúen decolorándose de forma excesiva. Luego se coloca safranina, que tiene las funciones de un colorante secundario y que teñirá de color rojo-rosa las bacterias gram negativas y de esta manera lograr su identificación.

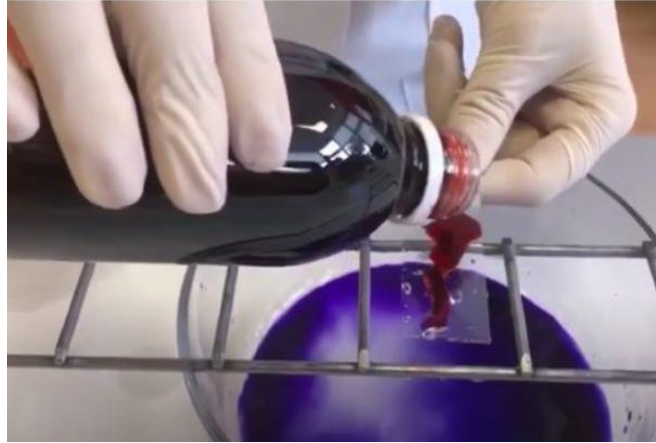


Figura 9. Aplicación de safranina

Fuente: (KapitalInteligente, 2020)

6. Un dato importante es que las bacterias gram positivas al contener gran cantidad de peptidoglicanos son capaces de retener el colorante inicial mientras que las bacterias gram negativas se decoloran. Finalmente se procede a observar al microscopio para su identificación.

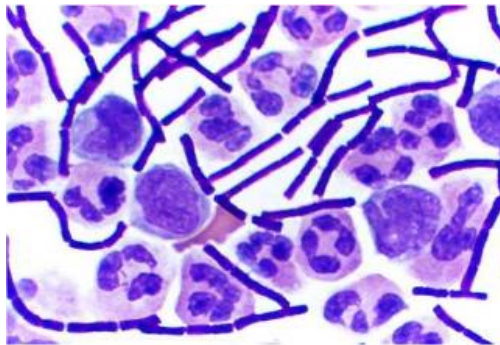


Figura 10. Bacillus anthracis (Gram positivo)

Fuente: (Santambrosio *et al.*, 2009)

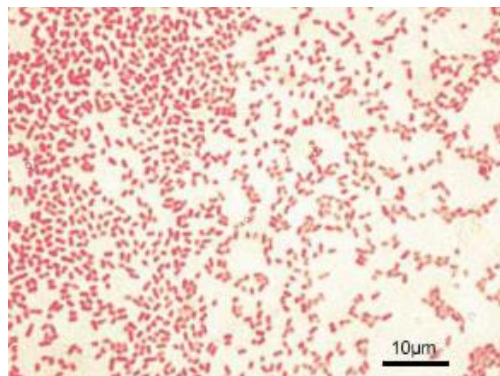


Figura 11. Pseudomonas aeruginosa (Gram negativo)

Fuente: (Santambrosio *et al.*, 2009)

3. CONCLUSIÓN

En virtud de lo expuesto se puede destacar a la tinción de gram como una herramienta importante en el sector acuícola ya que nos permite obtener información rápida que ayude de manera efectiva al diagnóstico de patologías que se presentan en los estanques, de esta manera se pueda establecer tratamientos oportunos y eficaces para disminuir mortalidades.

En la actualidad esta técnica sigue siendo considerada relevante en los laboratorios por lo que se debe tener criterios más estandarizados para así evitar errores en la interpretación, además es importante destacar que la tinción de gram es un método de identificación primaria, no reemplaza los cultivos bacterianos.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Gómez, B., Roque, A., & Guerra, A. (2001). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. *Universidad Autónoma de Sinaloa*, 32.
- Ibarra Gámez, J. C. (2006). *Caracterización del agente etiológico de la necrosis hepatopancreatica (nhp) y su impacto en cultivos de camarón Litopenaeus vannamei en Sonora, México* [Phd, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/20746/>
- KapitalInteligente. (2020, abril 27). Tinción de Gram. Procedimiento, materiales y vídeo explicativo. *Kapital Inteligente*. <https://www.kapitalinteligente.es/tincion-de-gram/>
- Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H.-C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1867-1880. <https://doi.org/10.1111/raq.12414>
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins*, 13(8), 524. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1), 201-220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. 9.
- Lucana, M., & Huanca, R. (2014). *Estructura Bacterina*. https://scholar.google.es/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=z2NmxIYAAAAJ&alert_preview_top_rm=2&citation_for_view=z2NmxIYAAAAJ:u5HHmVD_uO8C
- Morales, V., & Cuéllar-Anjel, J. (2014). Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones. *OIRSA, Panamá, República de Panamá*.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W. P. W., Mialhe, E., & Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in

- haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1), 89-107. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00420-8)
- Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (1999). Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Penaeus monodon* in India. *Journal of Aquaculture in the Tropics*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Bacterial+flora+associated+with+shrimp+culture+ponds+growing+Penaeus+monodon+in+India&author=Ott+2C+S.K.&publication_year=1999
- Paucar, R. T., Pezo, J. M., & Macías, S. C. A. (2018). Enfermedades, tratamientos y recomendaciones en el cultivo del camarón. *Espirales Revista Multidisciplinaria de investigación*, 2(22), Article 22. <https://doi.org/10.31876/re.v2i22.379>
- Peña-Navarro, N., & Varela-Mejías, A. (2015). Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 44-53.
- Perazzolo, L. M., Gargioni, R., Ogliari, P., & Barracco, M. A. A. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214(1), 19-33. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00137-0)
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167.
- Rubio, M., Artilles, A., Silveira, R., García, O., & González, N. (2012). *Hepatopancreatitis necrotizante (NHP). Identificación etiológica por métodos histopatológicos y moleculares en el camarón de cultivo Litopenaeus vannamei*. <https://aquadocs.org/handle/1834/4657>
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). Tinción y observación de microorganismos. *Trabajo práctico. Universidad Tecnológica Nacional, Departamento De Ingeniería Química*.
- Santos, H. M., Tsai, C.-Y., Maquiling, K. R. A., Tayo, L. L., Mariatulqabtiah, A. R., Lee, C.-W., & Chuang, K. P. (2020). Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): A review. *Aquaculture International*, 28(1), 169-185. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00451-w>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute

hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45-55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>

Varela, A., & Choc-Martínez, L. F. (2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones: Usos, alcances y limitaciones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3), e18165-e18165. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18165>