

# IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* spp EN AGUA DE PISCINAS CAMARONERAS DEL MUNICIPIO DE REPELÓN- ATLÁNTICO.

Laura Margarita Movilla Castro  
CC 1193479439,  
Código estudiantil: 201812291955  
Correo: laura.movilla@unisimon.edu.co

Lina Marcela Osorio Herrera  
CC 1192768625,  
Código estudiantil: 201812292399  
Correo: lina.osorio@unisimon.edu.co

Ivan Jesús Sánchez Reinoso  
CC 1045748032,  
Código estudiantil: 201511663320  
Correo: lsanchez9@unisimon.edu.co

Trabajo de Investigación del Programa de Microbiología

Tutor:

Germán Lozano Beltrán

Zamira Soto Varela

## RESUMEN

El presente proyecto tiene como objetivo identificar la presencia de *Salmonella* spp en muestras de agua de piscinas camaroneras ubicadas en el municipio de Repelón-Atlántico y analizar aquellos factores internos relativos al sistema de producción que podrían estar contribuyendo

a su propagación. Se hizo el análisis de muestras de agua para el aislamiento de *Salmonella* spp bajo el método tradicional, seguido de una confirmación mediante PCR Colony. Se obtuvo presencia de *Salmonella* spp en un 6,6% del total de las muestras analizadas, lo cual corresponde a una muestra en el punto de captación. Así mismo se determinó que la camaronera cumple con el 67% de los requisitos básicos de bioseguridad, sanidad y buenas prácticas acuícolas. Los anteriores son resultados preliminares y es recomendable realizar más estudios y monitoreos que verifiquen la calidad microbiológica del agua utilizada en estas piscinas camaroneras.

#### **Antecedentes:**

Gómez.L, Bermúdez.J. (2012) encontraron la presencia de *Salmonella* spp en el reservorio y canal de drenaje en un 27,3% y 33,3% respectivamente (Gomez , 2012). Patel. A, et. al. (2020) en su estudio indicaron que el 28,7% de los aislados de agua y el 25,5% de los sedimentos eran *Salmonella* spp. (Patel. A, et. al, 2020). Masri. M, et. al (2021) hallaron *Salmonella* spp en el estanque de agua de la aldea de Cilellang (Masri, 2021). Khalefa. H, et. al (2021) detectaron a *Salmonella* spp en un 58,3 % de las muestras de agua del lago Qarun, 13,3 % de las aves acuáticas migratorias, 6,6 % de los pollos y en un 4,3 % de pescado y camarones en salmuera (Khalefa, 2021).

#### **Objetivos:**

- Identificar la presencia de *Salmonella* spp en muestras de aguas de piscinas camaroneras de la finca Acuacultivos los gallitos.
- Analizar factores internos de la finca Acuacultivos los gallitos que repercuten en la propagación de *Salmonella* spp.

#### **Materiales y Métodos:**

##### **1. Lugar de estudio**

El presente proyecto se llevó a cabo en una finca llamada Acuacultivos los gallitos ubicada en el municipio de Repelón - Atlántico, encargada del cultivo y comercialización de camarones.

##### **2. Caracterización de la camaronera.**

Se hizo un recorrido por el lugar para analizar las condiciones en las que se encontraban las piscinas y de qué manera el agua llegaba a estas. Se diligenciaron dos formatos; uno de verificación de registro de fincas ante el ICA con base a la resolución 1414:2006 y otro de

condiciones sanitarias y de bioseguridad para establecimientos de acuicultura en base a la resolución 20186:2016.

Todo esto se hizo con la finalidad de conocer si la finca implementa las medidas básicas de bioseguridad, sanidad y buenas prácticas acuícolas.

### **3. Toma de muestras**

Se tuvieron en cuenta 5 puntos de muestreo; captación del agua, piscinas P2, P4, P6 y descarga y por cada punto se tomaron 3 muestras para obtener finalmente un total de 15 muestras, las cuales fueron guardadas bajo refrigeración para ser transportadas al laboratorio de microbiología ubicado en el centro de investigaciones en ciencias de la vida - CICV de la Universidad Simón Bolívar y realizar su posterior análisis.

### **4. Aislamiento de *Salmonella* spp**

El aislamiento de *Salmonella* spp se hizo según la Norma ISO 6579:2002 con algunas modificaciones. Para el pre enriquecimiento, se hizo filtración, donde se filtró 1 litro de agua, para luego introducir los filtros en 250 ml de agua peptonada bufferada y se incubó a 37°C por 18h. En el enriquecimiento selectivo se tomó 1 ml del agua peptonada buferada y se transfirió a cada uno de los tubos que contienen 10 ml de caldo Rappaport Vasiliadis y 10 ml de caldo tetratonato por muestra y se incubó a 41.5°C y por 24 h respectivamente. Para el aislamiento selectivo se sembró por agotamiento en agar XLD y agar entérico hektoen, con un asa en aro y se incubó a 37°C por 24h.

### **5. Confirmación de *Salmonella* spp por PCR**

Se seleccionaron colonias presuntivas, las cuales se sometieron a confirmación por PCR.

Se preparó la Master Mix, de acuerdo al protocolo. Luego se añadieron 20 µL de la Master Mix y 5 µL de agua de grado biología molecular para completar un volumen total de 25 µL. Seguidamente se tomó un poco de las colonias presuntivas, con la punta de la micropipeta para luego añadirlas en los microtubos con los 25 µL de la Master Mix. Se usó un control positivo (ADN *Salmonella* spp) y un control negativo (Agua). Finalmente, los microtubos fueron introducidos en el termociclador.

Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

### **Resultados:**

## 1. Caracterización de la camaronera

En la inspección del lugar se observó que el agua es tomada del embalse del Guajaro por el distrito de riego que se encuentra aledaño a la finca y esta es pasada por canales hasta llegar a las piscinas.

También se halló que la finca cuenta con un programa para descontaminar el terreno donde se cultivan los camarones, previo al ingreso del agua proveniente de la captación; se agrega cloro, cal, cal carbonato y Ficosilic.

Otros aspectos observados fue la presencia de animales ajenos a la producción, los cuales tenían contacto directo con el agua utilizada en las piscinas.

La finca cumple con el 67% de los requisitos básicos de bioseguridad, sanidad y buenas prácticas acuícolas; sin embargo hubo un 33% de incumplimiento, siendo en este donde abarcan los aspectos de mayor relevancia.

## 2. Aislamiento de *Salmonella* spp

Se obtuvieron un total de 9 colonias presuntivas de *Salmonella* spp. En el medio XLD se apreciaron colonias con halo rojo y un centro negro, en el medio entérico hektoen colonias con halo verde y centro negro.

## 3. Confirmación de *Salmonella* spp por PCR

De las nueve colonias positivas, solo una fue confirmada como *Salmonella* spp, lo que corresponde a un 6,6% del total de muestras analizadas y esta fue determinada en el punto de muestreo captación.

### Conclusiones:

Se identificó la presencia de *Salmonella* spp en el punto de muestreo captación, lo cual puede obedecer a la incidencia presuntiva de factores externos que normalmente son potenciales portadores de este microorganismo, como lo son la presencia de patos y la fuente de agua del sistema. Lo anterior demuestra que la vigilancia y monitoreo permanente de cultivo de camarones le permite a los productores tener una alerta temprana ante la presencia de algún contaminante y poder así tomar las medidas correspondientes.

**Palabras clave:** Acuicultura, Calidad del agua, PCR, Piscinas camaroneras, *Salmonella* spp.

## SUMMARY

The objective of this project is to identify the presence of *Salmonella* spp in water samples from shrimp ponds located in the municipality of Repelón-Atlántico and to analyze those internal factors related to the production system that could be contributing to its propagation. Water samples were analyzed for isolation of *Salmonella* spp using the traditional method, followed by confirmation by Colony PCR. The presence of *Salmonella* spp was obtained in 6.6% of the total samples analyzed, which corresponds to one sample at the catchment point. It was also determined that the shrimp farm complies with 67% of the basic biosafety, health and good aquaculture practices requirements. The above are preliminary results and it is advisable to conduct further studies and monitoring to verify the microbiological quality of the water used in these shrimp ponds.

### Background:

Gomez.L, Bermudez.J. (2012) found the presence of *Salmonella* spp in the reservoir and drainage channel in 27.3% and 33.3% respectively (Gomez , 2012).Patel. A, et. al. (2020) in their study indicated that 28.7% of water isolates and 25.5% of sediments were *Salmonella* spp. (Patel. A, et. al, 2020). Masri. M, et. al (2021) found *Salmonella* spp in the water pond of Cilellang village (Masri, 2021). Khalefa. H, et. al (2021) detected *Salmonella* spp in 58.3 % of water samples from Qarun Lake, 13.3 % from migratory waterfowl, 6.6 % from chickens and 4.3 % from brine fish and shrimp (Khalefa, 2021).

### Objectives:

- To identify the presence of *Salmonella* spp in water samples from shrimp ponds of the Acuacultivos los Gallitos farm.
- To analyze internal factors of the Acuacultivos los gallitos farm that have an impact on the spread of *Salmonella* spp.

### Materials and Methods:

#### Place of study

The present project was carried out in a farm called Acuacultivos los Gallitos located in the municipality of Repelón - Atlántico, responsible for the cultivation and commercialization of shrimp.

## **Characterization of the shrimp farm.**

A tour of the place was made to analyze the conditions in which the pools were located and how the water reached them. Two forms were filled out; one for verification of farm registration with the ICA based on resolution 1414:2006 and another for sanitary and biosafety conditions for aquaculture establishments based on resolution 20186:2016.

All this was done in order to know if the farm implements basic biosecurity, sanitation and good aquaculture practices measures.

## **Sampling**

Five sampling points were taken into account; water catchment, pools P2, P4, P6 and discharge and for each point 3 samples were taken to finally obtain a total of 15 samples, which were stored under refrigeration to be transported to the microbiology laboratory located in the life sciences research center - CICV of the Simon Bolivar University and perform their subsequent analysis.

## **Isolation of Salmonella spp**

The isolation of Salmonella spp was carried out according to ISO 6579:2002 with some modifications. For pre-enrichment, 1 liter of water was filtered, and then the filters were introduced in 250 ml of buffered peptonized water and incubated at 37°C for 18h. For selective enrichment, 1 ml of the buffered peptonate water was taken and transferred to each of the tubes containing 10 ml of Rappaport Vasiliadis broth and 10 ml of tetrathionate broth per sample and incubated at 41.5°C and for 24 h, respectively. For selective isolation, it was seeded by depletion on XLD agar and hektoen enteric agar with a loop in a loop and incubated at 37°C for 24h.

## **Confirmation of Salmonella spp by PCR**

Presumptive colonies were selected and subjected to PCR confirmation.

The Master Mix was prepared according to the protocol for the determination of Salmonella spp in water by PCR. Then 20 µL of the Master Mix and 5 µL of molecular biology grade water were added to complete a total volume of 25 µL. The presumptive colonies were then picked up with a micropipette tip and added to the microtubes with the 25 µL of Master Mix. A positive control (Salmonella spp DNA) and a negative control (water) were used. Finally, the microtubes were introduced into the thermal cycler.

The amplicons were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis.

## **Results:**

### **Characterization of the shrimp farm**

During the site inspection, it was observed that water is taken from the Guajaro reservoir by the irrigation district adjacent to the farm and is passed through canals until it reaches the pools.

It was also found that the farm has a program to decontaminate the land where the shrimp are grown, prior to the entry of water from the catchment; chlorine, lime, lime carbonate, and Ficosilic are added.

Other aspects observed were the presence of animals outside the production area, which had direct contact with the water used in the pools.

The farm complies with 67% of the basic biosecurity, sanitation and good aquaculture practices requirements; however, there was a 33% non-compliance rate, which is where the most relevant aspects are found.

### **Isolation of Salmonella spp**

A total of 9 presumptive colonies of Salmonella spp. were obtained. In the XLD medium, colonies with red halo and black center were observed; in the enteric hektoen medium, colonies with green halo and black center were observed.

### **Confirmation of Salmonella spp by PCR**

Of the nine positive colonies, only one was confirmed as Salmonella spp, which corresponds to 6.6% of the total number of samples analyzed and this was determined at the point of capture sampling.

### **Conclusions:**

The presence of Salmonella spp was identified at the collection sampling point, which may be due to the presumptive incidence of external factors that are normally potential carriers of this microorganism, such as the presence of ducks and the water source of the system. This shows that the permanent surveillance and monitoring of shrimp culture allows producers to have an early warning of the presence of any contaminant and thus be able to take the corresponding measures.

**Key words:** Aquaculture, Water quality, PCR, Shrimp pools, Salmonella spp.

## REFERENCIAS

1. Ariza. R, Avedaño. A.(2017). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las aguas superficiales del embalse del guájaro y distrito de riego del municipio de Repelón-Atlántico. Universidad de la costa, CUC.
2. Boyd, C., (2001). Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. Universidad de Auburn, Alabama.
3. Delgado, Romel, Gutiérrez, Carmen J, Hurtado, Ángel. (2003). Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de origen marino en nueva esparta: ii. características clínicas y etiológicas. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, 34(2), 11-16. Recuperado en 19 de septiembre de 2022, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772003000200003&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772003000200003&lng=es&tlng=es).
4. El Productor. (2017). Sistemas y modos de producción acuícola. [en línea] <https://elproductor.com/2017/05/sistemas-y-modos-de-produccion-acuicola/>
5. Gómez-Gamboa, L., Bermúdez-González, J., Medina, Z., López, M., Navarro, J. and Morales, E., 2022. *Diversidad de serotipos de Salmonella en camarones de cultivo crudos congelados (Litopenaeus vannamei) de Venezuela*. [en línea] Ve.scielo.org. Disponible en: <[http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562012000100006&script=sci\\_arttext](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562012000100006&script=sci_arttext)> [Consultado el 2 de septiembre de 2022].
6. IPNI. (2014). Cal Carbonato de Calcio Fuentes denutrientes específicos. No.18. Disponible en: [http://www.ipni.net/publication/nss-es.nsf/0/0248CCB8DFC442E985257BBA0059D03A/\\$FILE/NSS-ES-18.pdf](http://www.ipni.net/publication/nss-es.nsf/0/0248CCB8DFC442E985257BBA0059D03A/$FILE/NSS-ES-18.pdf)
7. Ortega Tudela, M., 2022. *Prevalencia de Salmonella spp. en cerdas reproductoras en España*. [en línea] Hdl.handle.net. Disponible en: <<http://hdl.handle.net/20.500.12466/79>> [Consultado el 2 de septiembre de 2022].
8. Rojas, I.. 2017. *La acuicultura frente a los impactos de la actividad agrícola en la calidad de los servicios ambientales de la cuenca del río Mayo. Una propuesta para su abordaje desde la economía ecológica*. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/estsoc/v28n51/0188-4557-estsoc-28-51-00009.pdf>
9. Sarmiento, r., 2022. *Embalse del Guájaro, una fuente en el Atlántico | Drupal*. [en línea] Corporacionpba.org. Disponible en: <<http://corporacionpba.org/portal/historias/embalse-del-guajaro-una-fuente-en-el-atlantico>> [Consultado el 2 de septiembre de 2022].
10. Solano, I., 2022. [en línea] Repositorio.cuc.edu.co. Disponible en: <<https://repositorio.cuc.edu.co/bitstream/handle/11323/6344/C%20c3%b3mo%20se%20mide%20a%20calidad%20del%20agua%20del%20Embalse%20del%20Gu%20a1jaro.pdf?sequence=2&isAllowed=y>> [Consultado el 2 de septiembre de 2022].

11. Hernández. J. (2014). Desempeño ambiental de los productos de camarón originados en pesquería industrial y acuicultura continental en la región caribe de Colombia desde una perspectiva del análisis del ciclo de vida. Universidad Nacional de Colombia.
12. Ruiz. M, et. al. (2018). Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella* spp. en canales porcinas. Rev. Colomb. Biotecnol.
13. Gómez.L, Bermúdez.J. (2012). Diversidad de serotipos de *Salmonella* en camarones de cultivo crudos congelados (*Litopenaeus vannamei*) de Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2012; 32:22-28
14. Shabarinath. S, et.at. (2007). Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. International Journal of Food Microbiology.
15. Semana. (2020). Se recupera la industria del camarón en Colombia. Rev semana.com. Tomado de: <https://www.semana.com/contenidos-editoriales/el-campo-nos-fortalece/articulo/se-recupera-la-industria-del-camaron-en-colombia/665652/>
16. Suzzi. Alessandra L, et. al. (2022). Legacy metal contamination is reflected in the fish gut microbiome in an urbanised estuary. Environmental Pollution.
17. Kumar. Prosanto, et. al. (2022). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium y Enteritidis aislados de camarones crudos en Bangladesh: una investigación Basado en las características moleculares, la supervivencia, la virulencia, la resistencia a los antibióticos y los atributos de formación de biopelículas", *Journal of Food Quality*.
18. Moya. R, et. al (2013). Supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de cuatro distritos de Trujillo (Perú). REBIOLEST Universidad Nacional de Trujillo.
19. Aparicio. S. (2022). Informe de evento Fiebre tifoidea y paratifoidea. INS - Minsalud.
20. Agudelo. C, et. al. (2018). Factores asociados con *Salmonella spp* en etapas de recepción y salida de chiller, en una planta de beneficio de aves. UNIVERSIDAD DEL ROSARIO.
21. Atwill. E, Jeamsripong. S. (2021). Bacterial diversity and potential risk factors associated with *Salmonella* contamination of seafood products sold in retail markets in Bangkok, Thailand. PeerJ.
22. Khalefa. H, et. al. (2021). Sequencing and phylogenetic analysis of the *stn* gene of *Salmonella* species isolated from different environmental sources at Lake Qarun protectorate: The role of migratory birds and public health importance. Veterinary World.
23. Caltek. (2019). Beneficios de la Cal hidratada en el mercado acuícola. [En línea]. Disponible en: <https://caltek.com.co/mercado-acuicola/>

24. Río claro. (2021). Ficosilic, un gran aliado para los cultivadores de camarón. Tecnología en agricultura. [En línea]. Disponible en: <https://www.rioclaro.com.co/el-ficosilic-shr--un-gran-aliado-para-los-cultivadores-de-camaron-content-88.html>
25. Carbajal Hernández, JJ, Sánchez Fernández, LP (2013). Diagnóstico y predicción del hábitat en la camaronicultura. *Computación y Sistemas*, 17 (3),435-455.[fecha de Consulta 4 de Noviembre de 2022]. ISSN: 1405-5546. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=6152831601>.
26. Patel. A, et. al. (2020). Prevalence of antibiotic resistant Salmonella spp. strains in shrimp farm source waters of Nagapattinam region in South India. *Marine Pollution Bulletin*.
27. Masri. M, et. al. (2021). BACTERIAL CONTAMINATION AT WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) IN AQUACULTURE. *Jurnal Biodjati*.
28. Faridullah. M, et. al. (2016). Prevalence of Salmonella and Escherichia coli contamination in shrimp (*Penaeus monodon*) farms, depots and processing plants in different areas of Bangladesh. *Asian Journal of Medical and Biological Research*.
29. Moreno, M, et al. (2022). Supervivencia de Escherichia coli y Salmonella typhimurium en agua recreativa de río. Ra Ximhai. Vol. 18 Núm. 4, Especial jul – dic 2022. Universidad Autónoma Indígena de México
30. EPA. (2022). Información sobre la protección de las fuentes de agua. Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos. Tomado de: <https://espanol.epa.gov/espanol/informacion-sobre-la-proteccion-de-las-fuentes-de-agua>
31. Reilly, P., Twiddy, D. (2002). Salmonella and Vibrio cholerae in brackishwater cultured tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 16, Issue 4, August 1992, Pages 293-301, [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90031-W](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90031-W).
32. Castañeda. G & Jiménez. M. (2018). EVALUACIÓN DE RÍOS DEL VALLE DE CULIACÁN, MÉXICO, COMO RESERVORIOS DE EROTIPOS DE Salmonella RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS. *Rev. Int. Contam. Ambie*.
33. Levantesi C., Bonadonna L., E., et. al. (2012). Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Res*.
34. Zamora, et. al. (2020). Incidencia de bacterias patógenas en muestras de camarón fresco extraído en la Laguna de Bluefelds. *REVISTA CIENCIA E INTERCULTURALIDAD*