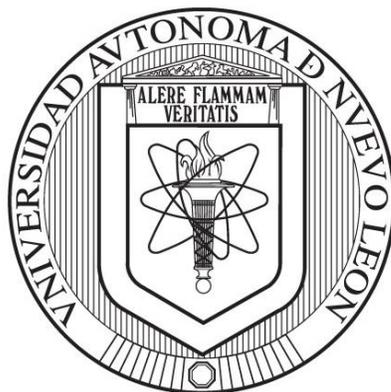


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE BACTERIAS MARINAS Y SU POTENCIAL USO COMO
ADITIVO EN ALIMENTO Y/O AGENTE PROBIÓTICO CONTRA *Vibrio
parahaemolyticus*, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND) EN CAMARÓN BLANCO
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)**

POR

M.C. RICARDO SÁNCHEZ DÍAZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS PARA ORGANISMOS ACUÁTICOS.**

MAYO, 2018

EVALUACIÓN DE BACTERIAS MARINAS Y SU POTENCIAL USO COMO
ADITIVO EN ALIMENTO Y/O AGENTE PROBIÓTICO CONTRA *Vibrio*
parahaemolyticus, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND) EN CAMARÓN BLANCO
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)

Comité de Tesis

Dr. Lucio Galavíz Silva
Presidente

Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez
Secretario

Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Vocal

Dr. Denis Ricque Marie
Vocal

Dr. David Alonso Villareal Cavazos
Vocal

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Asesor Externo

Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gámez
Asesor Externo

EVALUACIÓN DE BACTERIAS MARINAS Y SU POTENCIAL USO COMO
ADITIVO EN ALIMENTO Y/O AGENTE PROBIÓTICO CONTRA *Vibrio*
parahaemolyticus, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND) EN CAMARÓN BLANCO
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)

Dirección de Tesis

Dr. Lucio Galavíz Silva
Director

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado **a mis padres**, Sergio Sánchez Rodríguez y Margarita T. Díaz Márquez, **a mis hermanos** Sergio y Verónica; que han estado siempre conmigo, apoyándome en todo momento, brindándome su amor, cariño y comprensión.

A mis abuelos Fortunato Sánchez Cruz (†) y Rosa Rodríguez Delgado, Fernando Díaz Campos (†) e Isabel Márquez Reyna, por ser pilares de la familia y compartir con nosotros sus valores y cariño.

A mis tíos Fernando O. Díaz Márquez y Gloria Sánchez Rodríguez, que me han guiado y apoyado en mi formación personal y profesional, nunca acabaré de agradecerles.

A Sharon E. Hernández Rodríguez por ser una mujer maravillosa y especial, te amo.

“Forman parte del motor de mi vida y sin ustedes esta etapa nunca hubiera podido ser completada”.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la oportunidad de vivir y darme las fuerzas para salir adelante en cada tropiezo.

A **toda mi Familia**, que me inspira a seguir adelante y superar obstáculos con trabajo y unión. A la **Familia Hernández Rodríguez** por demostrarme tantas muestras de cariño sin merecerlo, y por contribuir a la culminación de este trabajo.

Al **Dr. Lucio Galaviz Silva y la Dra. Zinnia Judith Molina Garza** por su amistad, enseñanzas y apoyo incondicional para la realización de este proyecto; que a pesar de las dificultades pudimos salir adelante. Gracias por creer en nuestro trabajo.

Al **Dr. José Cuauhtémoc Ibarra**, por brindarme su amistad, confianza y apoyo durante el desarrollo del trabajo realizado. Queda mucho por aprender Temo, pero te agradezco el haber participado en mi formación personal y profesional.

Al equipo de trabajo de Laboratorio de Patología Molecular de la FCB UANL, Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola de ITSON.

Agradecimiento a **CONACYT** por proporcionar la beca doctoral; y apoyo en el Proyecto de Problemas Nacionales, FOINS/CONACyT 3157 “Evaluación de la actividad antagónica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos contra *Vibrio parahaemolyticus*, agente causal de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en cultivos de camarón”

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	x
RESÚMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	59
PERSPECTIVAS	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
RESUMEN BIOGRÁFICO	77
PUBLICACIÓN	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macrolocalización del área de muestreo en Sonora, México	19
Figura 2. Ubicación de los puntos de colecta al sur del estado.....	20
Figura 3. Diagrama de proceso bioinformático para el análisis genómico.....	30
Figura 4. Cosecha de biomasa y preparación de dietas experimentales... ..	31
Figura 5. Colecta de algas y sedimento salino.....	36
Figura 6. Endosporas de cepa 36R, colonias de cepa 13L y 36Y, respectivamente	37
Figura 7. Curva de crecimiento de cepas en TSB (2% NaCl), absorbancia a 600 nm....	39
Figura 8. Curva de crecimiento de cepas con potencial probionte en MB, absorbancia a 600 nm.....	40
Figura 9. En las lecturas, las cepas 42, 13L, 36Y y 02Y presentan actividad moderada; ANOVA (p<0.05)	40
Figura 10. Promedio de zonas de inhibición en mm entre cepas.	41
Figura 11. Promedio de halos de inhibición a <i>V. parahaemolyticus</i> después de 24 h	42
Figura 12. Carga de <i>V. parahaemolyticus</i> después de 12 h de incubación en co-cultivo; ANOVA (p<0.05)... ..	42
Figura 13. Carga de <i>V. parahaemolyticus</i> después de 12 y 24 h de incubación en co-cultivo de agua marina; ANOVA (p<0.05).....	43
Figura 14. Visualización microscópica (40X) de la actividad antibiofilm de los extractos contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i> MTCC451.....	44
Figura 15. Resultados de Quorum Quenching con los extractos crudos de 36R, 13L y 36Y.....	45
Figura 16. Patrón de bandas amplificado (GTG) ₅ por las cepas de estudio en agarosa 1.5%.. ..	45
Figura 17. El análisis molecular filogenético de las cepas 36Y y 02Y (<i>P. piscicida</i>) se realizó por el método de Maximum Likelihood (ML), 1,000 Bootstrap (Kumar <i>et al.</i> , 2016).....	46
Figura 18. El análisis molecular filogenético de las cepas 36R, 42 y 13L (<i>Bacillus</i>) se realizó por el método Maximum Likelihood (ML), 1,000 Bootstrap (Kumar <i>et al.</i> , 2016).....	46
Figura 19. Amplificación del gen PKS positivo para 36Y, 36R y 13L resultaron negativas.....	47

Figura 20. El análisis filogenético del gen PKS-I de cepa 36Y por el método de Neighbor-Joining	47
Figura 21. Anotación funcional de genes predichos para el genoma de <i>Bacillus pumilus</i> (36R)..	50
Figura 22. Anotación funcional de genes para el genoma de <i>Bacillus safensis</i> (13L)...51	
Figura 23. Anotación funcional de genes para el genoma de <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> (36Y)..	51
Figura 24. Comparativo de la anotación realizada por RAST de secuencias codificantes en los diferentes subsistemas analizados de las cepas con potencial probiótico.....	52
Figura 25. En la biomasa inicial y final de los tratamientos no se observan diferencias significativas, ANOVA ($p>0.05$).....	55
Figura 26. En recuento de hemocitos no hay diferencia significativa ANOVA ($p>0.05$)..	56
Figura 27. Después de 48 de desafío se muestra el gráfico de sobrevivencia por Kaplan Meier.	56
Figura 28. Los tratamientos con aditivo bacteriano presentaron diferencia significativa ANOVA ($p<0.05$), con respecto a los grupos control.	57
Figura 29. Lesiones en túbulos hepatopancreáticos, deterioro de células e infiltración hemocítica (A) D1 y (B) C+. En contraste con ausencia de lesiones en hepatopáncreas (C y D) C-..	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de cepas de trabajo y referencia utilizadas en el estudio..	22
Tabla 2. Relación de dietas utilizadas para el bioensayo de camarones juveniles.	32
Tabla 3. Relación de tratamientos del bioensayo de desafío.	33
Tabla 4. Relación e identificación de especímenes colectados en diferentes localidades.	36
Tabla 5. Cepas seleccionadas con potencial antagonico.	37
Tabla 6. Caracterización microbiológica y fisiológica de las bacterias antagonistas.	38
Tabla 7. Resultados de identificación mediante perfil bioquímico.	39
Tabla 8. Relación de identificación mediante secuencia parcial del gen 16S	47
Tabla 9. Características de los archivos crudos generados tras la secuenciación de ADN genómico de 36R <i>Bacillus pumilus</i> , 13L <i>Bacillus safensis</i> y 36Y <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> .	48
Tabla 10. Características de los archivos generados por Newbler tras la secuenciación de ADN genómico.	48
Tabla 11. Relación de datos obtenidos en la anotación de RAST por cada cepa.	49
Tabla 12. Relación de grupos de genes biosintéticos encontrados por AntiSMASH en los genomas.	53
Tabla 13. Información sobre dietas, parámetros zootécnicos y calidad del agua durante el bioensayo.	54
Tabla 14. Promedio (\pm S.E.) de conteo de hemocitos hialinos, granulares y total (CTH), y porcentaje relativo de células hialinas y granulares en camarón blanco después de alimentarse por 28 días.	55
Tabla 15. Relación de muestras analizadas por PCR tiempo real.	57

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABW	Peso corporal promedio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHL	acil-homoserina lactona
AHPND	Enfermedad de la necrosis hepato pancreática aguda
ARNr	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
CDS	secuencias codificantes
cel	células
CMC	Carboximetilcelulosa
CSM	Método de estría cruzada
°C	grados centígrados
dH ₂ O	agua bidestilada
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfatados
EMS	Síndrome de la mortalidad temprana
g	gramos
GC	Guanina y Citocina (%)
h	<i>hora</i>
ha	hectárea
hpi	Hora post infección
L	litro
MA	Agar Marino
Mbp	Mega pares de bases
MB	Caldo Marino
MBC	Concentración bactericida mínima
mg	miligramos
µg	microgramos
MIC	Concentración mínima inhibitoria
ml	mililitro
µl	microlitros
mm	milímetros
mM	milimolar
µM	micromolar

MTCC	Microbial Type Culture Collection
<i>min</i>	<i>minutos</i>
N	Norte
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	nanómetros
ng	nanogramos
NRPS	Sintasa de péptidos no ribosomales
OD	Densidad Óptica
pb	pares de bases
PEG	Gen codificador de proteína
PBS	Buffer de fosfato salino
PKS	Policétido sintasa
QQ	Quorum quenching
QS	Quorum sensing
RPM	Revoluciones por minuto
reads	lecturas
<i>seg</i>	<i>segundos</i>
TBE	Buffer tris borato EDTA
TCBS	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
TSA	Agar Soya Trypticaseína
TSB	Caldo Soya Trypticaseína
TSI	Agar Triple Azúcar Hierro
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
W	Oeste

RESÚMEN

La acuicultura continuamente se enfrenta a patologías virales y bacterianas, causando enormes pérdidas económicas a nivel mundial. La Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) causa mortalidades del 80-100% en cultivos de camarón (*Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*). AHPND se reportó primero en China, y se diseminó a Vietnam, Malasia y Tailandia. El agente causal *Vibrio parahaemolyticus* coloniza el estómago y produce una toxina letal para el hepatopáncreas del camarón. Durante 2013, en México la enfermedad devastó el 60-80% de granjas camaroneras de Sonora, Sinaloa y Nayarit. El uso de antibióticos en la acuicultura ocasiona problemas en la salud humana, los ecosistemas y la resistencia bacteriana, por lo tanto se han buscado nuevas alternativas. Este estudio se enfoca en identificar bacterias marinas capaces de producir metabolitos antimicrobianos contra el agente causal de AHPND; y evaluar su posible uso como aditivo en alimento para camarón. Las bacterias se aislaron de fuentes y organismos marinos, y se seleccionaron por su capacidad antagónica frente a *V. parahaemolyticus* (AHPND) mediante ensayos *in vitro*. Las cepas con antagonismo potencial se identificaron como: 36R *Bacillus pumilus*, 42 *Bacillus sp.*, 13L *B. safensis*, 36Y *Pseudoalteromonas piscicida* y 02Y *P. piscicida*. Los metabolitos activos extraídos de caldos de cultivo de 36R, 13L y 36Y, demostraron actividad antimicrobiana (25 µg/ml MIC y 50 µg/ml MBC) y ruptura de biofilm contra *V. parahaemolyticus* MTCC 451; además mostraron inhibición en la expresión del Quorum Sensing de la cepa reportera *Chromobacterium violaceum*. Se generó un borrador de genoma de las cepas 36R, 13L y 36Y; con la anotación funcional de genes biosintéticos que codifican para metabolitos secundarios se detectaron lantipéptidos, bacteriocinas, bacitracinas, péptidos antimicrobianos ribosomales, cumarinas, entre otros. Se alimentaron camarones (3.2 g ABW) con dietas recubiertas de bacterias por 28 días, e incrementaron la resistencia hacia *V. parahaemolyticus* AHPND (6.5×10^5 UFC/ml), mejorando la sobrevivencia en un bioensayo de desafío (D1-36R 54.2%; D2-13L 45.9%; D3-36Y 45.9%; D4-36R:13L MIX 75%; C+ 12.5%; y C- 96%). Las cepas de *Bacillus* y *Pseudoalteromonas* (36R, 13L y 36Y) demostraron su potencial probiótico contra bacterias patógenas en la camaronicultura.

ABSTRACT

Aquaculture continuously confronts viral and bacterial pathologies, which cause huge economic losses worldwide. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) provoke mortalities from 80-100% in cultured shrimp (*Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*). AHPND was first reported in China, and spread to Vietnam, Malaysia and Thailand. The causal agent *Vibrio parahaemolyticus*, colonize the stomach and produce a lethal toxin for shrimp hepatopancreas. During 2013, in Mexico this disease devastated 60-80% of the shrimp farms of Sonora, Sinaloa and Nayarit. To avoid the use of antibiotics in aquaculture, which cause problems in human health, ecosystems and bacterial resistance, new alternatives have been searched. This study is focused in identify marine bacteria capable of producing antimicrobial metabolites against the causative agent of AHPND; and to evaluate their potential use as feed additive for shrimp. Bacteria were isolated from marine sources and organisms, and selected for their antagonistic capacity against *V. parahaemolyticus* (AHPND) by *in vitro* assays. The strains with potential antagonism were identified as: 36R *Bacillus pumilus*, 42 *Bacillus sp.*, 13L *B. safensis*, 36Y *Pseudoalteromonas piscicida*, and 02Y *P. piscicida*. The active metabolites extracted from 36R, 13L and 36Y broth cultures, demonstrated antimicrobial (25 µg/ml MIC and 50 µg/ml MBC) and biofilm disruption activity against *V. parahaemolyticus* MTCC 451; and also showed inhibition of Quorum Sensing expression of the biosensor strain *Chromobacterium violaceum*. A draft genome assembly of strains 36R, 13L and 36Y was produced; functional annotation of biosynthetic genes that encode for secondary metabolites allowed the detection of lantipeptides, bacteriocins, bacitracins, ribosomal antimicrobial peptides, coumarins and other. Shrimp (3.2 g ABW) fed with bacteria coated diets for 28 days, increased the resistance against pathogenic *V. parahaemolyticus* AHPND (6.5×10^5 CFU/ml), improving the survival in challenge bioassay (D1-36R 54.2%; D2-13L 45.9%; D3-36Y 45.9%; D4-36R:13L MIX 75%; C+ 12.5%; and C- 96%). *Bacillus* and *Pseudoalteromonas* strains (36R, 13L and 36Y) demonstrated their probiotic potential against harmful bacteria in shrimp aquaculture.

INTRODUCCIÓN

La producción de crustáceos ha tenido un crecimiento anual promedio de 18% durante el período de 1970-2008, el cual supera por mucho el crecimiento de las demás especies acuícolas (FAO, 2010). A nivel mundial la camaronicultura produce casi 4 millones de toneladas (Valderrama, 2011). La mayor producción se centra en 12 países entre el sudeste de Asia y América Latina. Sin embargo, el mayor problema de esta actividad se debe al gran impacto de las enfermedades.

La patología viral más devastadora en acuicultura es el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV= White Spot Syndrome Virus), debido a las altas mortalidades y persistencia en cultivos camaroneros de 1999 al 2013 (Galaviz-Silva *et al.*, 2004; Molina-Garza *et al.*, 2008; González-Galaviz *et al.*, 2013). Sin embargo las enfermedades bacterianas también denotan gran interés; la vibriosis es una de ellas, ampliamente distribuida y responsable de mortalidades en los cultivos de camarón (Lightner *et al.*, 1996). Los vibrios son difíciles de erradicar del ambiente natural de producción, por tanto requieren de un enfoque de bioseguridad diferente en los cultivos.

En 2009, se reportó en Asia una enfermedad emergente, el Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS= Early Mortality Syndrome), hoy designada como AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease), la cual ha causado pérdidas en los principales países productores, valuadas en más de mil millones de dólares (Flegel, 2012; Tran *et al.*, 2013). Es causada por varias cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, las cuales producen una potente toxina que afecta a los organismos (Lightner, 2013).

En México, en 2013 se presentaron grandes mortalidades atípicas en granjas camaroneras del Noroeste, causando pérdidas de hasta 80 % en la producción (FAO, 2013).

El presente trabajo está enfocado a encontrar bacterias que antagonicen con este patógeno, pues el uso de probióticos o compuestos antimicrobianos se perfilan como una

herramienta alternativa para la prevención y control de patologías acuícolas. Las bacterias que habitan ambientes marinos, son capaces de producir agentes bactericidas potenciales (Kamat y Kerkar, 2011); incluso se han reportado otros que poseen propiedades antivirales, antimicóticas, anticoagulantes y antitumorales (Molinski, 1993). Los alimentos funcionales que contienen aditivos liberan activos antimicrobianos en el tracto de los organismos cada vez que son alimentados, esto puede ser una importante estrategia para prevenir enfermedades bacterianas como el EMS (Coutteau y Goossens, 2013).

En México existen reportes sobre AHPND, una patología de gran importancia económica para el sector acuícola (SENASICA, 2013; Reantaso y Gómez-Gil, 2013; Gómez-Gil *et al.*, 2014, Soto-Rodríguez *et al.*, 2015); lo cual justifica el desarrollo y originalidad de este proyecto, aunado a investigar la presencia de bacterias asociadas a sustratos marinos (camarón, bivalvos, algas y minas de sal) que produzcan sustancias antimicrobianas, y las cuales puedan aplicarse en alimento como tratamiento profiláctico en el control de enfermedades de los cultivos de camarón. La actividad acuícola en el país es de gran importancia debido al desarrollo económico que genera, por tal motivo, el conocimiento sobre herramientas para el control de patógenos en la acuicultura, debe ser considerado como una estrategia más para poder alcanzar el desarrollo y sustentabilidad de esta actividad.

ANTECEDENTES

Panorama mundial de la acuicultura

Actualmente la acuicultura es la actividad agroindustrial de mayor desarrollo a nivel mundial, con un volumen global superior a los 141.6 millones de toneladas y un valor de 70 mil millones de dólares, alcanzado más del 40% de la producción de organismos acuáticos. La producción mundial de organismos acuáticos por captura no presenta un incremento significativo en los últimos diez años; sin embargo, la acuicultura creció de 30 millones de toneladas en 1998 a más de 60 millones de toneladas en 2004, es decir un crecimiento de 100 % en sólo seis años (FAO, 2004). Esta actividad tiene actualmente y continuará teniendo una enorme participación en el abastecimiento de peces y mariscos en el mundo (Naylor y Burke, 2005).

La producción mundial de camarón estimada en 2008 fue de 6.5 millones de toneladas, de las cuales 55% fueron de captura (3.6 millones de toneladas) y 45% provenían de la acuicultura (2.9 millones de toneladas). El valor estimado de la producción mundial camaronera es de 29,639 millones de dólares. La tasa media de crecimiento anual por captura de camarón creció solo 2.90%; mientras que la tasa de crecimiento en acuicultura fue de 11.40%, al pasar de 1 a 2.9 millones de toneladas. Esto significa que la producción acuícola casi se ha triplicado en tan solo 10 años.

Los principales productores de camarón son China, India, Indonesia y Tailandia, generan 43%, 10%, 9% y 8% respectivamente (FIRA, 2009). Países como Ecuador, México y Brasil han logrado niveles sobresalientes de desarrollo y con grandes posibilidades de incrementarlos, debido a que el potencial de estas zonas es muy promisorio (Sabatini y O'Sullivan, 2004).

Camaronicultura en México

En México esta actividad productiva ha mostrado un aumento sostenido desde 1990. Siendo el cultivo de camarón, el que presenta una tasa media de crecimiento anual de 1990 a 2008 del 6.81%, al pasar de 60,310 a 197,535 toneladas; es decir, que la

producción se triplicó en los últimos 19 años (FIRA, 2009). En el país existen 592 granjas, con un área total de 45,000 hectáreas destinadas al cultivo de camarón; esta actividad es el sustento de miles de habitantes de las costas de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Baja California Sur y Tamaulipas, lugares donde se concentra la producción.

Problemáticas en la acuicultura

La producción de camarones peneidos enfrenta retos importantes y de diversa índole, que ponen en riesgo esta actividad, especialmente desde que ésta se ha convertido en una actividad industrial masiva (Naylor y Burke, 2005). La amenaza latente más grave es representada por infecciones bacterianas y virales, las cuales han causado enormes pérdidas económicas en la industria y en muchos casos colapsos (Lightner, 1996; Lightner y Redman, 1998; Bilio *et al.*, 1999). Cada vez aparecen nuevos agentes causantes de nuevas enfermedades (Unzueta-Bustamante *et al.*, 2004).

Para que se desarrolle una patología en los organismos se deben reunir ciertas características en el medio. El estrés que las condiciones ambientales sub-óptimas ejercen en los organismos, extiende sus respuestas adaptativas más allá de sus posibilidades, provocando un desgaste excesivo del organismo, alcanzando un pobre desarrollo, llegando a sufrir una enfermedad o incluso mortalidad. Del mismo modo, el sistema inmunológico del camarón es comprometido. El estrés se hace sentir inicialmente a niveles bioquímicos y moleculares, induciendo una serie de respuestas funcionales y estructurales en la regulación hormonal, metabolismo, osmoregulación y regulación inmunológica, afectando la capacidad de sobrevivencia, crecimiento y reproducción de los organismos (Gómez *et al.*, 1998).

Después de un periodo de estrés, un brote de enfermedad puede causar mortalidad crónica en la población. Muchos de estos organismos pueden ser portadores asintomáticos de un patógeno y en condiciones normales están protegidos por los mecanismos de defensa. Cuando el sistema de defensa es debilitado o suprimido debido al estrés, el patógeno puede multiplicarse, rebasar los mecanismos de defensa y en ocasiones matar al hospedero (Morales y Cuellar-Anjel, 2008).

En México la aparición de enfermedades infecciosas en la acuicultura ha provocado reducciones significativas en la producción del crustáceo. Por lo que la prevención y el control son de gran importancia en este problema (Berger, 2000).

Historial de enfermedades en la camaronicultura

Las enfermedades que mayormente han afectado a la acuicultura mundial de camarón cronológicamente son: 1) El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHNV= Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) detectado en 1990 en la camaronicultura mexicana en el camarón azul, *L. stylirostris* (Lightner 1996, Jiménez *et al.*, 1999), causando mortalidades masivas. 2) El virus del síndrome de Taura (TSV= Taura Syndrome Virus), causante de 60 % de pérdidas en la producción de camarón en 1992 en granjas ubicadas cerca del Río Taura en el Golfo de Guayaquil, Ecuador (Pinheiro *et al.*, 2007), estuvo presente con infecciones severas en granjas mexicanas de 1996 a 1998; pero a partir de 2003 y 2004 se presentaron de nuevo mortalidades considerables en algunas granjas de Sinaloa y Sonora, las principales entidades productoras. 3) El WSSV, detectado en Norteamérica, Centroamérica y México en 1999. Algunas regiones han sido impactadas con pérdidas del 100 % de la producción de camarón de cultivo. Este virus ha sido considerado el patógeno número uno debido a la severidad de la infección, que provoca mortalidades masivas (dentro de 7-10 días de cultivo), especialmente cuando hay cambios ambientales repentinos. 4) Las bacterias intracelulares tipo NHP-B (Necrosis Hepatopancreática), clasificadas como una α -proteobacteria, que han causado mortalidades de hasta 95 % en Norte y Sudamérica (Vincent and Lotz, 2007). 5) El virus cabeza amarilla (YHV= Yellow Head Virus), el cual ha estado presente en la camaronicultura asiática (Flegel *et al.*, 2006), (*P. monodon*), siendo esporádicamente reportado en México sin causar pérdidas notables. 6) El virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV= Infectious Myonecrosis Virus), encontrado en granjas camaronícolas de Brasil, (Andrade *et al.*, 2007) y 7) en el último ciclo de cultivo (2013) en granjas del Pacífico (Sonora, Sinaloa y Nayarit), las bacterias tipo *Vibrio* causaron pérdidas severas en granjas de camarón.

Enfermedades bacterianas en cultivos de camarón

Los patógenos en el medio acuático se encuentran de forma natural, muchos son oportunistas, es decir que se mantienen entre las poblaciones sin causar problemas, de modo que su presencia no significa que los camarones estén enfermos (García, 2001).

Un estanque de camarón es un sistema altamente dinámico en donde interactúan estrechamente, diversos factores como: salinidad, pH, temperatura, oxígeno disuelto, así como nutrientes orgánicos e inorgánicos. Las comunidades microbianas presentes en los estanques, son susceptibles a las fluctuaciones e interacciones que se dan entre estos factores, debido a ello, pueden modificar su composición y número. El rol de las bacterias en un estanque de camarón no sólo debe ser enfocado desde el punto de vista patogénico, pues también cumplen un papel importante en el reciclamiento de nutrientes y la degradación del detritus en el estanque; por tanto contribuyen a mantener la calidad del agua (Gómez *et al.*, 1998). Sin embargo se pueden presentar condiciones propicias para una proliferación microbiana lo cual traerá como consecuencia una enfermedad o epizootia.

Las enfermedades de origen bacteriano son una de las principales afecciones en los cultivos de camarón del continente americano; pueden causar desde un crecimiento retardado hasta mortalidades esporádicas y masivas (Otta *et al.*, 2001). Las bacterias Gram negativas son las de mayor interés en esta práctica, ya que predominan en el ambiente marino y constituyen la mayoría de bacterias que normalmente se presenta en la microflora asociada al camarón silvestre y de cultivo.

Las bacterias del género *Vibrio*, están presentes en los ambientes acuáticos de forma natural y se presentan comúnmente durante el cultivo de camarón (Vandenbergh *et al.*, 2003). Son consideradas como patógenas oportunistas; en presencia de otros factores puede desencadenar el desarrollo de infecciones como vibriosis, hepatopáncreas edematoso y necrótico (Gómez *et al.*, 1998).

Algunas de las especies de interés son *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. cholera*, entre otras (Noriega-Orozco *et al.*, 2007). Dentro de la sintomatología en los organismos infectados destaca una coloración café o parda en branquias, pérdida de apetito, nado errático en la superficie del estanque, enrojecimiento de apéndices (Anderson *et al.*, 1988; Nash *et al.*, 1992), luminiscencia en cuerpo y urópodos en algunos casos, lesiones en la cutícula, pérdida de apéndices, musculo opaco e infestación en tracto digestivo o hepatopáncreas (Lightner, 1993).

Por otra parte, la bacteria NHP-B ha sido designada por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), como patógeno potencial para la acuicultura. Esta α -proteobacteria, de tipo rickettsia inicialmente fue descubierta en cultivos de Texas en 1985, y su distribución se limita solo al continente Americano. Los estanques infectados con NHP-B alcanzan mortalidades de hasta el 95% (Johnson, 1990; Lightner, 1996).

Antecedentes sobre mortalidades causadas por bacterias en granjas de camarón

Hernández y Olmos (2004) analizaron 15 muestras de *Vibrio* spp. de camarones sanos y enfermos de granjas de camarón y se probó la patogenicidad. Dos cepas llamadas Z2 y Z3 fueron patógenas causando el 100 % de mortalidad. La caracterización molecular se realizó por RFLP y PCR, usando primers para diferenciar la virulencia y reguladores transcripcionales o genes “quorum sensing”. Los primers diseñados para *luxN* fueron específicos e identificaron las muestras como *V. harveyi*, *Vibrio nigripulchritudo* es otra especie reportada como causante de mortalidades en Nueva Caledonia por Goarant *et al.* (2005), asociadas las patologías llamadas “Síndromde de Verano” y “Síndrome 93”, fue identificada usando la técnica de AP-PCR (PCR arbitrariamente primado). Haldar *et al.* (2007) reportaron mortalidades masivas de *P. monodon* cultivado en Chenai, al sur de la India. Las bacterias *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* fueron identificadas como los agentes etiológicos por pruebas bioquímicas y por secuenciación de la región 16SrRNA. En retos *in vivo* con *P. monodon*, se reveló que *V. parahaemolyticus* es más virulento. En las costas de Bazar, Bangladesh, Rahman *et al.* (2010) estudiaron las mortalidades en cultivos de camarón, acompañada de signos que concuerdan con vibriosis ocurridas en

2007 y 2008. Las especies involucradas fueron *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. nereis*, *V. alginolyticus* y ocho no identificadas.

Roque *et al.* (2001) analizaron la sensibilidad de varios antibióticos comerciales en bacterias *Vibrio spp.* aisladas de camarones enfermos juveniles y adultos, colectados en 58 granjas del Noroeste de México (Sonora, Sinaloa y Nayarit) durante 1996-1998. Las bacterias que presentaron mayor incidencia fueron *V. harveyi*, *V. anguillarum* y *V. cholerae*.

Noriega-Orozco *et al.* (2007) determinó la diversidad bioquímica de especies del género *Vibrio*, encontradas en estanques de cultivo semi-intensivo en el Noroeste de México y correlacionó la presencia de especies patógenas a las condiciones ambientales de los estanques. Las especies reportadas son *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. cholerae* y *V. mimicus*; estas últimas tres en baja incidencia.

La cepa CAIM 1792 de *V. harveyi* ha causado brotes recurrentes de vibriosis, o también llamado síndrome “rojo brillante” en cultivos de camarón *L. vannamei* en el Noroeste de México desde 2005 (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010a). Espinoza-Valles *et al.* (2012) reportan la secuencia del genoma de esta cepa.

Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

La AHPND tiene como órgano blanco el hepatopáncreas, el cual se atrofia y adquiere color blanquecino con estrías. En los primeros cambios histopatológicos de este órgano se aprecia la reducción de las células grasas, pérdida de lípidos y una disminución de la actividad de las células secretoras. Al progresar la enfermedad las células grasas, basofílicas y secretoras se degeneran y redondean, desprendiéndose de los túbulos hepatopancreáticos. En el 2012 se consideraba que la etiología era causada por toxinas como aflatoxinas B1 debido a que se apoyaban en la inhibición de la mitosis observada en el hepatopáncreas (Lightner *et al.*, 2012). Por el cuadro histopatológico en los camarones afectados, se le denominó síndrome de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPNS) debido a que el hepatopáncreas es el único órgano afectado. Hasta el 2013 se

identificó a *Vibrio parahaemolyticus* asociado a un fago, como el responsable de las mortalidades, mediante bioensayos para reproducir la enfermedad, el sistema API NE y secuenciación de la región 16S rRNA (Tran *et al.*, 2013; Reantaso y Gómez-Gil, 2013).

En México se reporta el aislamiento de 300 cepas, 37 de ellas fueron *V. parahaemolyticus*, 10 confirmadas por PCR para EMS/AHPND (Reantaso y Gómez-Gil, 2013). Gómez-Gil *et al.* (2014), recientemente reportan la secuenciación del genoma de la cepa M0605 de *Vibrio parahaemolyticus*, la cual provoca signos clínicos similares al AHPND y mortalidades severas en cultivos camaroneros en México. Esta cepa fue aislada de organismos enfermos en cultivos de El Dorado, Sinaloa en Julio de 2013; y mediante desafíos se comprobó que era capaz de causar mortalidades en organismos. El ADN de esta bacteria fue analizado mediante una plataforma de secuenciación y se identificaron diferentes mecanismos de patogenicidad en ambos cromosomas: sistemas de adquisición de hierro (hemina, enterobactina, vibrioferrina y dos TonB), sistemas de secreción (T2S, T3S, T2/4S y T6SS); se encontraron 14 genes, diferentes toxinas, dos de las cuales son repeticiones grandes de la toxina (RTX), así como nueve hemolisinas, varias proteasas, quitinasas, un regulador de metabolismo de quitina, se identificó un sistema de adherencia y un sistema antifagocitosis, además de dos sistemas de quorum sensing (LuxPQ y LuxMN).

Antecedentes sobre compuestos antibacterianos

En bacterias, se han reportado péptidos con estructuras únicas, una actividad antimicrobiana sin precedente, y cuyas secuencias no tienen homólogos en las bases de datos (Faye *et al.*, 2011). A estos péptidos se les da el nombre de bacteriocinas, probablemente para defenderse de otras bacterias y también actúan como reguladores de su propia expresión, como moléculas señal que interactúan con sus hospederos o como agentes hemolíticos que incrementan la patogenicidad (Dykes y Hastings, 1997). Las propionicinas, son un tipo de bacteriocinas con un amplio espectro, incluso intra-específico, lo que muestra el papel que juegan dentro del antagonismo en las comunidades bacterianas (Faye *et al.*, 2011). Una de las bacteriocinas más comunes, llamada lantibiótico, es producida por las bacterias ácido lácticas (Cotter *et al.*, 2005).

Se estima que existen muchos factores que influyen en la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*, dentro de los que se incluye a los asociados con la hemólisis beta, factores de adherencia, enzimas, y los productos de los genes *tdh*, *trh* y *ure* en las cepas patógenas para humanos, más en las patógenas de camarón no se ha encontrado asociación con estos. Históricamente en los casos de salud humana, la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* se ha asociado con el llamado fenómeno de Kanagawa (KP), el cual se observa como una hemólisis beta cuando se crece sobre agar Wagatsuma (Matsuda *et al.*, 2010). Prácticamente todas las cepas de *V. parahaemolyticus* de aislados clínicos son KP positivas, mientras que solo entre el 1 y el 2% de las cepas ambientales son KP positivas. La reacción de Kanagawa es causada por la proteína directa termoestable (TDH), porque tolera temperaturas de hasta 100°C, y su actividad se dirige sobre los eritrocitos (Drake *et al.*, 2007). Estudios posteriores demostraron que algunas cepas de *V. parahaemolyticus* eran patógenas aun en ausencia del factor Kanagawa y de la proteína TDH, encontrándose en su lugar la proteína denominada TRH (hemolisina relacionada con la TDH), la cual posee un 67% de similitud con la primera (Drake *et al.*, 2007). Sin embargo, otras cepas *V. parahaemolyticus* son patógenas aun en ausencia de estas 2 hemolisinas termoestables, lo cual indica que existen otros factores de virulencia, descritos como los factores T3SS1 (sistema de secreción tipo 3 en el cromosoma 1) y T3SS2 (Meador *et al.*, 2007), aun así faltan estudios para comprender los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* (Mahoney *et al.*, 2010) y más aún en los patógenos de organismos acuáticos, pues *V. parahaemolyticus* también se le asocia con problemas en cultivos de peces y camarones.

Los surgimientos de *V. parahaemolyticus* en estas granjas han conducido a altas mortalidades y severas pérdidas económicas en los países productores (Mahoney *et al.*, 2010), por lo que es realmente importante monitorear y tratar de controlar estas patologías. Estudios recientes han revelado la presencia de un alto índice de resistencia de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* contra antibióticos de uso común, como lo son el bacitracina, vancomicina, tetraciclina, furazididona, cefalotina y la eritromicina (Noorlis

et al., 2011), lo cual parece ser un dato alarmante si se toma en cuenta el incremento de su incidencia y la aparición de estas cepas resistentes a los tratamientos disponibles.

Ramírez (2013) caracterizó y analizó el genoma del fago VPMS1, efectuando diversos análisis bioinformáticos en la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana, como una alternativa al uso de antibióticos convencionales. Se encontró que el genoma está constituido por 53 genes codificantes con 8 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para péptidos que presentaron actividad antimicrobiana. El péptido P19850 de 12 residuos de aminoácidos mostró capacidad de inhibir de manera irreversible el crecimiento de *V. parahaemolyticus*.

Leyton y Riquelme (2010) evaluaron bacterias con actividad inhibitoria, colectadas de las cápsulas ovíferas de *Concholepas concholepas*, contra *V. parahaemolyticus*. Secuenciaron el fragmento 16S rRNA de cada cepa aislada para identificarla usando los datos del GenBank, y las evaluaron para conocer si producen sustancias antibacteriales. Aislaron 45 morfotipos de colonias, de las cuales ocho presentaron actividad inhibitoria. Con la secuencia de rRNA y análisis filogenético, fueron identificadas como *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis*. Leyton *et al.* (2012) investigaron durante 4 años dos activos antibacteriales, el ácido oleico de *Vibrio sp.*, y dicetopiperazinas de *B. pumilus*. Estos metabolitos fueron obtenidos a partir de bacterias en sistemas de cultivo de *Agropecten purpuratus* y en cápsulas de huevo de *C. concholepas*. En base a su actividad inhibitoria contra el patógeno *V. parahaemolyticus*, fueron evaluados en organismos de importancia comercial.

Velmugran *et al.* (2013) analiza los metabolitos secundarios antimicrobianos debido a su estabilidad y fuerte actividad para su aplicación en el tratamiento de infecciones microbianas. De unas minas de sal aislaron la bacteria *Halomonas salifodina* en la India, extrajeron los metabolitos secundarios y probaron la actividad antimicrobiana contra patógenos acuáticos como *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*, aislados de peces y camarones infectados. Los metabolitos fueron purificados en columnas de cromatografía y se comprobó su actividad antiviral

contra WSSV. Los camarones *Fenneropenaeus indicus*, desafiados con un inóculo de WSSV incubado con la fracción III, sobrevivieron casi el doble en comparación al control. La cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS) reveló que la fracción antiviral contenía ocho compuestos, incluyendo perfluorotributilamía, ciclopentano, 1-butil-2-etil y 1,10-bifenil-3-amina. El conteo de hemocitos totales, la actividad de la coagulasa y oxihemocianina mejoraron, así como los parámetros inmunológicos de profenol oxidasa y el anión superóxido, los cuales se incrementaron significativamente.

Es de gran interés el poder aislar y cultivar cepas de bacterias capaces de inhibir el crecimiento de agentes etiológicos como el *V. parahaemolyticus*, por su aplicación profiláctica. Los efectos antagónicos y las interacciones bacterianas, que involucran la inhibición del crecimiento de bacterias, corresponden a diversos mecanismos: competencia de nutrientes, espacio, luz, clima o se relaciona con la producción de metabolitos secundarios antibacterianos (Long y Azam, 2001, Verschuere *et al.*, 2000). La bacteria antagonista debe ser llamada “probiótica”, un término que se ha definido como “microorganismos vivos, que en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del hospedero” (Reid *et al.*, 2003). Se han propuesto distintos mecanismos para establecer como estos mejoran la salud de los organismos que los consumen, incluyendo la producción de compuestos (bacteriocina, lisozima, proteasas y peróxido de hidrógeno) que inhiben a patógenos. Los metabolitos también pueden ser aislados de algunos microorganismos, y una vez purificados, pueden ser usados para limitar la colonización de organismos indeseados (Leyton y Riquelme, 2010).

Estrategias de prevención e inclusión de aditivos en alimentos

Con la experiencia en campo y los trabajos de investigación científica, se ha demostrado que muchos factores inducen la mortalidad en sistemas de cultivo, tales como, la genética, calidad de las postlarvas, fluctuaciones climáticas, estrés ambiental, infecciones bacterianas, la calidad y estabilidad del cultivo entre otros. Estos conocimientos dan como resultado, protocolos de producción que no eliminan a los

patógenos, sino más bien reducen el riesgo de los principales detonantes de eventos de mortalidad (Coutteau y Goossens, 2013).

La bacteria *Vibrio* es difícil de erradicar de una producción pues naturalmente habita en el medio, por tanto el enfoque para mantener una bioseguridad será diferente que con los virus. El evitar contaminación en reproductores y larvas, combinado con buen manejo será crucial para controlar el AHPND en fases iniciales. Los raceways o sistemas intensivos, permiten un control sobre la nutrición y el medio ambiente, comparado con la siembra en estanquería. El uso desmedido de antibióticos es una práctica frecuente que amenaza la sustentabilidad del medio, residualidad para el humano y causa una evolución en la resistencia de las bacterias (Cabello, 2006).

La industria de camarón requiere medio alternativos para controlar la microbiota de los sistemas de producción. Los enfoques sostenibles para mejorar la flora intestinal incluyen el uso de bacterias probióticas y compuestos naturales específicos en alimentos. Estos aditivos permiten en cada alimentación, entregar una concentración adecuada de actividad antimicrobiana dentro del intestino del camarón. No obstante, el éxito de la actividad dependerá de la eficacia del compuesto o aditivo contra la bacteria patógena involucrada en AHPND (Coutteau y Goossens, 2013).

Otras investigaciones mencionan que además de efectos bactericidas y bacteriostáticos, algunos compuestos trabajan en la inhibición del quorum sensing para bloquear la acción patógena. Esto es una alternativa viable a antibióticos por su eficacia y baja posibilidad de que la bacteria desarrolle resistencia.

Los aditivos alimenticios con las propiedades mencionadas, se perfilan como alternativas interesantes para ser investigados, y contribuir potencialmente con estrategias preventivas enfocadas a AHPND.

Probióticos en acuicultura

Gatesoupe, (1994) Presenta a los probióticos como una alternativa para eliminar los riesgos de proliferación de vibrios oportunistas y mejorar la tasa de sobrevivencia y de crecimiento de las larvas de peces. En el cultivo de organismos acuáticos se requieren de alimentos altamente nutritivos, además de aditivos que beneficien el estado sanitario y el crecimiento de los organismos. Entre los aditivos más comunes encontramos hormonas, antibióticos, y algunas sales. Sin embargo, su uso inapropiado puede ocasionar efectos adversos, como el desarrollo de bacterias patógenas resistentes, y/o un desequilibrio ambiental (Kautsky *et al.*, 2000).

Los probióticos son ampliamente utilizados en la crianza de cerdos y aves, sin embargo en acuicultura se desconocen muchos aspectos. El uso de probióticos se perfila como una herramienta profiláctica alternativa en acuicultura. Existen varios contextos para el término probiótico: son células microbianas administradas como suplementos dietéticos dirigidos a mejorar la salud; Gibson y Roberfroid (1995) lo definen como un ingrediente alimenticio no digerible que afecta benéficamente al hospedero por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el tracto intestinal.

Esta alternativa biológica está siendo investigada en acuicultura, debido al enorme beneficio que juegan las bacterias probióticas para proteger a los organismos contra infecciones, ya que producen compuestos inhibidores, compiten con patógenos, o bien estimulan el sistema inmunológico de los organismos (Gibson *et al.*, 1998). La combinación de nutrición del hospedero y mejoramiento del estado sanitario de los organismos es un aspecto altamente valioso (Douillet, 1994).

Beneficios de los probióticos

Estos microorganismos pueden ser añadidos al agua o al alimento, en el manejo del sistema de cultivo para el control de enfermedades. El efecto benéfico de los probióticos se atribuye en general a tres mecanismos diferentes (Verschuere *et al.*, 2000): Mejoramiento de la calidad del agua, ya sea por metabolización de la materia orgánica o

por interacción con algunas algas. Exclusión competitiva de bacterias nocivas; competencia por nutrientes, por sitios de fijación en el intestino o fuentes de energía disponible. Aumento de la respuesta inmunológica del hospedero. Y aportes benéficos al proceso digestivo del hospedero; de macro y micronutrientes para el hospedero o aporte de enzimas digestivas y por ende se incrementa la tasa de crecimiento. Producción de componentes inhibidores como antibióticos, bacteriocinas y quelantes que disminuyen el crecimiento del patógeno.

El uso de mezclas probióticas son más efectivas que las cepas independientes en el control de patógenos, y en el mejor establecimiento de poblaciones probióticas, observándose procesos sinérgicos entre cepas que han potenciado los resultados deseados (Douillet, 2000).

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

México es la sexta potencia mundial en producción de camarón, siendo esta actividad la que mayor número de divisas genera entre los productos pesqueros (CONAPESCA, 2010). A nivel nacional, Sonora y Sinaloa encabezan la producción de camarón. Sonora cuenta con 157 granjas, generando 7,500 empleos directos y 35,000 indirectos. En 2009 la producción alcanzó 81,423 toneladas, y en 2013 solo 13,192 toneladas debido a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda AHPND (COESAES, 2013).

La presencia de AHPND en los cultivos camaroneros de México, implica un riesgo para la actividad acuícola. El tratamiento de enfermedades bacterianas mediante el uso de antibióticos no es recomendado debido a los efectos residuales, el desarrollo de cepas resistentes y problemas ambientales (Coutteau y Goossens, 2013); por tal motivo, el uso de probióticos o compuestos antimicrobianos se perfila como una herramienta alternativa para la prevención de patologías acuícolas.

El sector productor debe contar con estrategias que puedan contrarrestar los efectos de patologías de importancia económica.

La presente investigación brindará información sobre alternativas para el control de AHPND en cultivos de camarón, mediante el estudio de bacterias marinas con potencial probiótico.

HIPÓTESIS

A partir de microbiota marina asociada se extraerán bacterias con potencial probiótico, capaces de sintetizar metabolitos extracelulares con actividad antimicrobiana, y las cuales al ser aplicadas como aditivo en alimento generará un efecto benéfico en un cultivo experimental de camarón desafiado con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* causante de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).

OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar y evaluar bacterias marinas con potencial probiótico para su uso como aditivo en alimento; e identificar los activos antimicrobianos responsables de la inhibición de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en camarón de cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Aislar y caracterizar bacterias obtenidas de microbiota marina con potencial antagonico a *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND.
- 2) Evaluar mediante pruebas *in vitro* la capacidad antagonica de las bacterias marinas contra cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* (AHPND).
- 3) Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos crudos de las bacterias de interés sobre *Vibrio parahaemolyticus* a través de pruebas *in vitro*.
- 4) Identificar mediante análisis bioinformático la presencia de genes implicados en la biosíntesis de activos antimicrobianos en los genomas de las cepas de estudio.
- 5) Evaluar el efecto *in vivo* de dietas suplementadas con las bacterias marinas en la sobrevivencia de camarón blanco mediante un desafío experimental con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* (AHPND).

MATERIALES Y MÉTODOS

Instituciones donde se realizaron los estudios

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular del Departamento de Zoología de Invertebrados, y el Programa de Maricultura del Departamento de Ecología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León; el Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola del Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto Tecnológico de Sonora; el Laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental; y el Departamento de Microbiología de la Universidad de Pondicherry, Puducherry, India.

Localización de las áreas de estudio

Los muestreos de campo se realizaron en las siguientes regiones del Sur de Sonora: Bahía de Lobos ($27^{\circ}25'28.1''$ N; $110^{\circ}30'29.0''$ W), Mélagos ($27^{\circ}09'44.0''$ N; $110^{\circ}15'58.6''$ W), La Atanasia ($27^{\circ}8'10.1436''$ N; $110^{\circ}11'22.6998''$ W), El Riíto ($26^{\circ}47'02.6''$ N $109^{\circ}48'48.2''$ W) y Yaváros ($26^{\circ}42'33.7''$ N; $109^{\circ}34'35.2''$ W). Se visitaron distintas localidades (escolleras, esteros, depósitos salinos) para tener una diversidad de las comunidades bacterianas (Pfeffer *et al.*, 2003; Hosseini *et al.*, 2004).

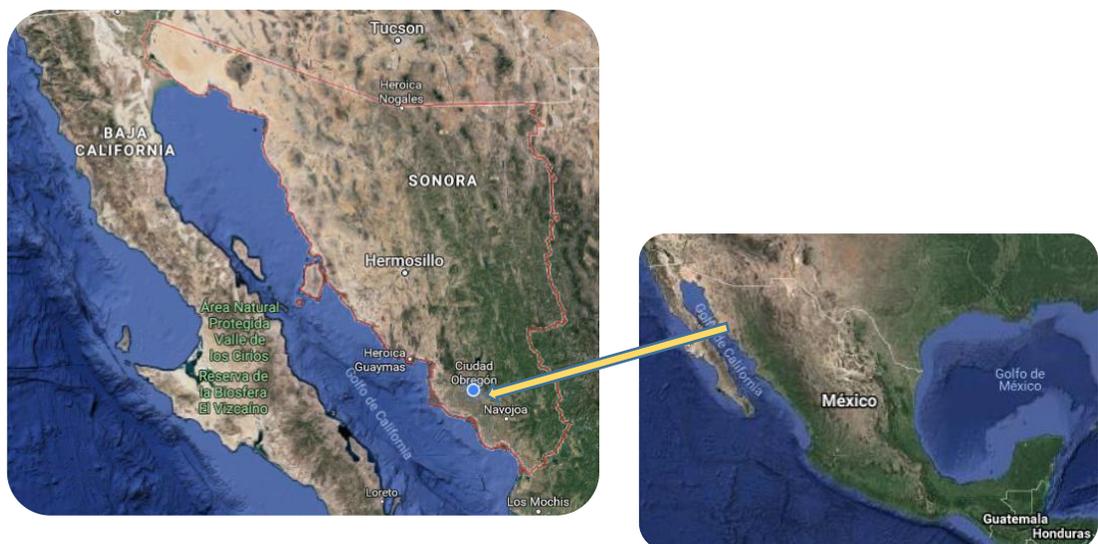


Figura 1. Macrolocalización del área de muestreo en Sonora, México.



Figura 2. Ubicación de los puntos de colecta al sur del estado.

Toma de muestra

Se colectaron los siguientes especímenes en forma aséptica: el **camarón silvestre** se capturó en esteros y canales, con una atarraya de monofilamento de 2.5 m de diámetro. Los **bivalvos** se colectaron directamente en canales de llamada durante la marea baja o en jaulas flotantes de cultivo, utilizando guantes y espátula. Las **algas** fueron removidas del sustrato donde se encontraban adheridas, en escolleras o canales de llamada. El **agua marina** se tomó directamente de los cuerpos con una bolsa de plástico estéril (Whirlpak, Nasco), a una profundidad de 15-30 cm; y el **sedimento salino** se colectó en bancos naturales de salinas con una espátula y bolsas estériles, a 20 cm de profundidad. En una bitácora se registraron los datos de campo y la relación de muestras.

Las muestras fueron empacadas, etiquetadas y transportados en hielera al LASA del Instituto Tecnológico de Sonora en Cd. Obregón Sonora, para ser procesadas. Los camarones fueron transportados vivos en cubeta con agua y con aireación.

Bacteriología de especímenes y aislamiento de cepas

Los **camarones** sanitizados con alcohol al 70% se disectaron con pinzas estériles, se extrajo el estómago, y se homogenizó en mortero de porcelana con 10 ml de solución salina (2% NaCl) (Quiroz, 2005). Los **moluscos bivalvos** se limpiaron y se enjuagaron con agua destilada, se disectaron los órganos y el tejido se homogenizó en una licuadora (Oster). Se agregó 1 g en 9 ml de solución salina para preparar la suspensión (Báez-Hidalgo, 2008). Las **algas marinas** antes de ser transportadas se enjuagaron en agua marina para remover arena y se desecaron unos minutos al sol (Selvin *et al.*, 2011). En el laboratorio el alga se enjuagó con agua destilada, y se maceró 1 g de muestra en el mortero con 9 ml de solución salina (Villarreal-Gómez *et al.*, 2010). Se agregó 1 ml de **agua marina** a un tubo con 9 ml de solución salina y se agitó; y para **sedimento**, se agregó 1 g en 9 ml de solución salina y se homogenizó en vórtex (Holt *et al.*, 1994).

De cada homogenizado se sembraron 100 µl por el método de extensión con varilla en medios sólidos no selectivos: TSA (Difco) al 2% de NaCl y Agar Marino (Difco). Para la obtención de cultivos heterótrofos las placas se incubaron en condiciones aerobias a 28-30°C (Yamato, IC403CR) y se revisaron durante 24, 48 y 72 h.

De los cultivos se seleccionaron y aislaron diferentes bacterias considerando el morfotipo colonial, coloración y origen. Los aislados se resembraron y purificaron en placas del mismo agar proveniente, hasta lograr un cultivo axénico. Las cepas fueron preservadas individualmente a -80°C en criotubos (Corning) con TSB (Difco) al 2% NaCl o MB (Difco) y glicerol al 30 %, y almacenadas en ultracongelador (Feltham *et al.* 1978; Jones *et al.*, 1991).

Cepas de trabajo y referencia

En el presente estudio para los retos de antagonismo se utilizaron cepas patógenas aisladas de epizootias de AHPND en cultivos camaroneros de Sonora durante 2013-2015, y aislados de camarón de cultivo. Las cepas de referencia se adquirieron en American Type Culture Collection (ATCC) o Microbial Type Culture Collection (MTCC).

Tabla 1. Relación de cepas de trabajo y referencia utilizadas en el estudio.

Cepa	Clave	Fuente
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (AHPND)	MC32	ITSON (Instituto Tecnológico de Sonora)
	B25	
	E14V2	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11DC	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CV 2656	PU (Pondicherry University)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	MTCC 451	MTCC (Microbial Type Culture Collection)

Evaluación preliminar de la actividad antagónica *in vitro*

Para la selección inicial se evaluó el antagonismo de cada cepa por el método de estría cruzada (CSM). A partir de un cultivo de 18-24 h se preparó una suspensión de 3 ml al 1 de McFarland (3×10^8 cel/ml), en placas de Mueller-Hinton (2% NaCl) se aplicó con hisopo estéril una estría en el centro con la bacteria a evaluar, y se incubó por 48 h a 28-30°C, para la liberación de antimicrobianos en placa. Del mismo modo se preparó una suspensión con la cepa *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32), y se sembró en un ángulo de 90° atravesando la zona de la bacteria candidata. Se observó la interacción con la presencia o ausencia de inhibición (Lertcanawanichakul y Sawangnop 2008; Velho-Pereira y Kamat 2011).

Caracterización microbiológica y bioquímica

Se realizó una descripción microscópica de los aislados con potencial antagónico. Mediante la tinción de Gram y Shaeffer-Foulton, se determinó la agrupación de las bacterias y presencia de endosporas, utilizando un microscopio Axio Imager M2 (Carl Zeiss) (Doetsch 1981; Gordon *et al.*, 1973). Las pruebas bioquímicas: oxidasa (Merck), catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%) y fermentación de carbohidratos en agar Triple Azúcar Hierro (TSI, Becton Dickinson). Las pruebas fisiológicas se basaron en crecimiento en caldo TSB o MB a diferentes rangos de NaCl (2-30%) y temperaturas (15-50°C) (Holt *et al.*, 1994; Pettersson *et al.*, 1996; Vera *et al.*, 1998; Cuervo 2010).

Identificación bioquímica

Microscan: Las cepas de estudio del grupo Gram negativas, fueron procesadas con el sistema MicroScan (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.), siguiendo el protocolo del fabricante. A partir de cultivos puros (24 h) se preparó una suspensión bacteriana (1 McFarland) en solución Pluronic, utilizada para hidratar cada pozo del panel con 120 µL. La placa se incubó por 24 h a 30°C y los resultados se revelaron en el software LabPro System versión 3.01 (Siemens).

API 20E y 50 CHB: Para identificar las cepas Gram positivas, se utilizó el sistema API 20E (BioMerieux) y API 50 CHB (BioMerieux), siguiendo el protocolo del fabricante. Estas galerías se conforman de 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y 49 pruebas de carbohidratos fermentables, respectivamente. La interpretación del perfil bioquímico e identidad se reveló con el software Apiweb (BioMerieux).

Antibiogramas

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de Kirby-Bauer, con antibióticos de grado acuícola: florfenicol (30 µg), enrofloxacin (5 µg) y oxitetraciclina (30 µg) (AVIMEX, México). En placas de agar Mueller-Hinton (Difco) al 2% NaCl, se extendió una suspensión bacteriana al 0.5 McFarland (aprox. 10⁸ UFC/ml) con las cepas antagonistas y se colocaron los sensibilizadores. La prueba se realizó por triplicado y los resultados de los halos de inhibición se interpretaron (Bauer *et al.* 1966).

Actividad hemolítica

Para la prueba de hemólisis se sembró por estría cruzada una colonia aislada y fresca sobre Agar Sangre (5% sangre de cordero) (Becton Dickinson). Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h y se registró el patrón de hemólisis (Baron *et al.*, 1994).

Actividad enzimática

Se determinó la capacidad enzimática de las cepas de interés. La producción de **proteasas** se observó en placas de TSA (Difco) 2% NaCl adicionadas con 2.5% de leche descremada (Sanchez *et al.*, 2004). Para determinar **amilasas** se sembraron placas de

Mueller-Hinton (Difco) (1.5% almidón), y el halo de degradación se reveló al agregar lugol a la placa después de la incubación por 24 h (Lealem y Gashe, 1994). La actividad de **quitinasas y celulasas** se realizó en Medio Mínimo adicionando quitina coloidal al 0.5% y carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma) al 2%, respectivamente. La actividad de celulasas se reveló con rojo Congo (Sánchez *et al.*, 2004). La capacidad hidrolítica de las cepas se observó mediante la formación de halos alrededor de las colonias.

Curvas de crecimiento

La curva se determinó con dos medios. De un cultivo fresco se inoculó una colonia a cada matraz con 200 ml de caldo TSB (Difco) (2% NaCl) o MB (Difco) y se incubaron a 30°C por 26 h en un agitador orbital (SOU-300, Yamato) a 150 RPM. El crecimiento bacteriano se monitoreó cada dos horas midiendo la absorbancia a 600 nm con el equipo Pharo 300 Spectroquant (Merck). El caldo estéril fue el blanco, y para analizar las fases de la curva se graficaron las lecturas de la OD a través del tiempo (Ramesh, 2014).

Formación de biofilm

Se evaluó esta propiedad en las cepas probióntes, cultivando cada una en 10 ml de TSB (Difco) o MB (Difco) por una noche a 30°C; se preparó una dilución 1:100 de cada aislado con caldo estéril y se inocularon 200 µL en cada pozo (por cuadruplicado) de la microplaca (fondo redondo). Después de incubar por 24 h a 30°C, la placa se vació y enjuagó con PBS. El biofilm se fijó con 100 µL de alcohol 95% y fué teñido con 100 µL de cristal violeta. La placa se enjuagó con agua destilada y secó por 15 min. Se registró la OD a 595 nm en un lector (UV340, ASYS). La adhesión del biofilm se consideró: fuerte ($OD \geq 1$), moderada ($0.1 \leq OD < 1$) o débil ($OD < 0.1$) (Bekir *et al.*, 2011).

Pruebas de actividad antagónica

Se realizaron pruebas para evaluar la capacidad antagónica de las cepas seleccionadas en matrices sólidas y líquidas.

Método de doble capa Dopazo

Para esta prueba se inocularon 10 µL de la cepa probionte, cultivada por 12 h en TSB o MB, en el centro perforado de una placa de Mueller-Hinton (Difco) al 2% NaCl, y se incubó por 72 h a 30°C. Posteriormente el crecimiento bacteriano se sometió a vapores de cloroformo por 30 minutos, y se agregó una segunda capa de 10 ml de agar Mueller-Hinton semisólido inoculada con 100 µL de cada cepa patógena *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32, B25 y E14V2) y *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802). Después de 24 h de cultivo a 30°C, se observó un halo de inhibición al centro de la placa y se consideró una inhibición fuerte con valores >5 mm de diámetro. La prueba se realizó por triplicado, y como control negativo se evaluó el efecto del cloroformo y la bacteria patógena sin bacteria probionte (Dopazo *et al.*, 1988; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005).

Método de co-cultivo en suspensión

Mediante esta prueba se evaluó el efecto competitivo y antagónico entre las cepas probióntes y *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32). Cada bacteria se cultivó individualmente en 50 ml de TSB (Difco) al 2% NaCl o MB (Difco) a 30°C y 130 RPM, Incu-Shaker (Benchmark), hasta al alcanzar una OD (600 nm) de 1 (10⁸ UFC/ml). Posteriormente, en un tubo con 10 ml de TSB al 2% NaCl, se añadió 1 ml de la cepa probiónte y 1 ml de la cepa patógena para incubarse a 30°C y 150 RPM. A las 12 h se analizó la carga de *Vibrio* en cada co-cultivo, sembrando 100 µl en agar TCBS por triplicado. Como control positivo se utilizó solo la cepa patógena y como control negativo caldo TSB estéril (Purivirojkul, 2013).

Evaluación de co-cultivo en agua marina

Se observó el efecto antagónico en agua marina entre probióntes y *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32). El cultivo de cada cepa se realizó en 10 ml de TSB (Difco) al 2% NaCl o MB (Difco) siguiendo el mismo procedimiento que el ensayo anterior. En matraces con 150 ml de agua marina estéril (35 ppm) se agregó 1.5 ml del probiónte y la cepa patógena (10⁸ UFC/ml), incubándose a 30°C y 150 RPM. Se realizaron conteos por triplicado de la carga de *Vibrio* en TCBS a las 12 y 24 h. En el control positivo se utilizó un cultivo del patógeno y en el control negativo caldo estéril (Sugathan *et al.*, 2014).

Producción y extracción de compuestos antimicrobianos

Para la producción de bioactivos se cultivó individualmente la cepa 36R y 13L en 500 ml de TSB (HiMedia) (2% NaCl), y la cepa 36Y en 500 ml de Zobell MB (HiMedia), en un agitador orbital a 130 RPM durante 48 hr a 30 °C. Posteriormente, la biomasa del cultivo fue separada por centrifugación a 10,000 RPM por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue extraído con acetato de etilo a una proporción de 1:1 (v/v), la mezcla se agitó a 150 RPM por una noche. La fase orgánica se separó utilizando un embudo de separación y el extracto se concentró mediante un rotavapor (Caframo). El extracto crudo se resuspendió en metanol para confirmar la actividad antimicrobiana y el mismo solvente se utilizó como control (Sruthy *et al.*, 2015; Kannahi y Eshwari, 2016).

Concentración mínima inhibitoria (MIC) y bactericida mínima (MBC)

Para evaluar la MIC y la MBC de los extractos bacterianos se utilizó la cepa *V. parahaemolyticus* MTCC451. El extracto crudo disuelto en metanol (1000 µg/ml) se diluyó a la mitad de manera seriada en cada pozo de la microplaca, por triplicado. Cada pozo contenía 20 µl de suspensión bacteriana ($1-2 \times 10^5$ UFC/ml) y 10 µl de cloruro de tetrazolio (Merck) (0.5 mM). Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C; como control positivo se utilizó cloranfenicol (1 mg/ml), y como control negativo metanol (Perumal *et al.*, 2012). El crecimiento microbiano en placa se observó al presentar color rosa. La MBC se determinó como la menor concentración del extracto que erradicó el 99.9 % de la suspensión bacteriana después de 24 h de incubación (Tukappa y Londonkar, 2013).

Ensayo de ruptura del biofilm

Como la producción de biofilm y la patogenicidad se relacionan, se determinó el efecto del extracto crudo en la ruptura del biofilm, la cepa *V. parahaemolyticus* MTCC451 se incubó una noche y fue inoculada en 5 ml de TSB (HiMedia) con 25 µg/ml del extracto crudo en un contenedor con un cubreobjeto (22 x 22 mm). La muestra se incubó por 48 h a 30°C, los cubreobjetos se secaron y tiñeron con cristal violeta (0.1 %). En el control negativo se agregó metanol en vez de extracto. Para observar el biofilm se utilizó un microscopio óptico (Olympus CH20i, Japan) (Shumi *et al.*, 2014).

Ensayo de quorum quenching (QQ)

La comunicación bacteriana (QS, quorum sensing) juega un papel importante en las funciones fisiológicas relacionadas con la patogenicidad, por ello se determinó si los extractos crudos son capaces de inactivar el sistema de QS de la cepa reportera *Chromobacterium violaceum* (CV2656); la cual genera un pigmento violeta en presencia de autoinductores (AHL, acil-homoserina lactona). La cepa se extendió en placas de agar Luria Bertani (HiMedia), después se hicieron pozos equidistantes y se agregó el extracto bacteriano diluido en metanol. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C, y la inhibición del pigmento violeta se consideró como positivo para la inactivación de AHL o quenching de la cepa reportera (Chen *et al.*, 2013; Chu *et al.*, 2014).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. A partir de un cultivo en caldo de cada bacteria incubada por una noche, se centrifugaron 2 ml a 6,000 RPM (4°C) por 1 min para utilizar el pellet celular en extracción. La calidad y cantidad del ADN se verificó con NanoDrop 2000c (Thermo Fisher) y mediante un gel de agarosa al 0.8% (Sigma-Aldrich) en electroforesis a 50 V durante 45 min (Bowman *et al.*, 2016).

Análisis por PCR (GTG)₅

Para discriminar entre cepas seleccionadas se utilizó la técnica de PCR (GTG)₅, la cual se basa en la amplificación de secuencias repetidas intercaladas en el ADN. Se preparó una mezcla de 25 µl para PCR con 5X Taq Green buffer (Promega), 25 mM MgCl₂, 25 mM desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), 25 µM (GTG)₅ primer (5' - GTGGTGGTGGTGGTG - 3'), agua bidestilada (dH₂O), ADN (100 ng/µl) y ADN polimerasa (GoTaq, Promega). La amplificación comienza con desnaturalización a 95°C (7 min), seguido por 4 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95°C (2 min), 36°C (2 min) y 72°C (2 min), respectivamente, más 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95°C (1 min), 50°C (1 min) y 72°C (1 min), respectivamente. La elongación final fue a 72°C por 5 min. Las muestras se analizaron visualmente en geles de agarosa al 1.5%, corridos en cámara de electroforesis con 1X buffer TBE (Tris

Borato EDTA), a 100 V por 1 h y 30 min. Se seleccionaron las cepas con perfiles o patrones de bandas diferentes (Versalovic *et al.*, 1994; Matsheka *et al.*, 2005).

Identificación molecular por amplificación del gen 16S ARNr

Con el ADN de las bacterias marinas se amplificó el gen 16S ARNr. Los primers utilizados fueron: U1F (5' - CTYAAAKRAATTGRCGGRRRSSC - 3') y U1R (5' - CGGGCGGTGTGTRCAARRSSC - 3') (Rivas *et al.*, 2004). La mezcla de 25 µl contenía 5X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer, ADN (100 ng/µl), 1 U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega) y agua bidestilada (dH₂O). Se utilizó el termociclador iCycler (Bio-Rad) con un programa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, alineamiento de 55°C por 2 min y extensión a 72°C durante 1 min, una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1%, se purificaron con el kit QIAquick PCR (Qiagen) y fueron enviados a secuenciación en Servicios Genómicos de CINVESTAV-LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato.

Amplificación de genes PKS-I y NRPS

Para determinar la presencia de fragmentos del gen PKS (policétido sintetasa) y regiones de NRPS (sintetasa de péptidos no ribosomales), se utilizaron las siguientes condiciones y primers: cada reacción de 50 µl se preparó con 1X buffer de reacción (GeNei), 4.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0.5 µM de cada primer, ADN genómico (100-200 ng/µl), 1 U de Taq polimerasa (GeNei) y agua bidestilada (dH₂O). Para PKS, degKS2F 5' - GCIATGGAYCCICARCARMGIVT - 3' y degKS2R 5' - GTICCI GTICCRTGISCYTCIAC - 3', 3 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C y una elongación final de 10 min a 72°C; y para NRPS, A3F 5' - GCSTACSYSATSTACACSTCSGG - 3' y A7R 5' - SASGTCVCCSGTSCGGTAS - 3', 5 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 59°C, 90 seg a 72°C y una extensión de 5 min a 72°C (Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005; Schirmer *et al.*, 2005). Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1% mediante electroforesis a 100 V por 45 min; fueron purificados y mandados a secuenciar a Eurofins Genomics, Bangalore, India.

Análisis de secuencias

Las secuencias se analizaron con el programa BioEdit (versión 7.2.6), Clustal X (versión 2.1) para el alineamiento de secuencias, y MEGA (versión 7.0.14) para la construcción de árboles filogenéticos, por el método Neighbor-Joining (Hall, 1999; Larkin *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 2007). Las secuencias se compararon en GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), y se depositaron en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) para generar números de acceso.

Secuenciación de genoma completo

Las cepas 36R, 13L y 36Y fueron seleccionadas para un análisis de genoma completo mediante la secuenciación ADN, a través de las plataformas Ion Torrent PGM (Thermo Fisher) y Miniseq System (Illumina). Este proceso se realizó en el Laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, en Mazatlán, Sinaloa. A partir de cultivos puros se realizó la extracción de ADN genómico con el kit Wizard Genomic DNA (Promega). La calidad y concentración del material genético se analizó en el fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher). Antes de la construcción de librerías, el ADN se fragmentó con el sonicador Bioruptor (Diagenode), después se colocaron adaptadores y se generaron los templados para secuenciación.

Procesamiento y ensamblaje de genomas

El control de calidad de las secuencias crudas se realizó con FastQC (versión 0.11.4), y se fue verificando la calidad durante el tratamiento de las lecturas procesadas. Con el software PRINSEQ (versión 0.20.4) se filtraron y cortaron bases y secuencias con un índice de calidad Phred menor a 20. La calidad de secuenciación se valora según la escala de Phred o Q, el cual representa la probabilidad de que una base determinada haya sido asignada erróneamente. El ensamblaje *de novo* de los genomas se realizó con Newbler (versión 2.6). Esta reconstrucción se basa en un proceso de unión y superposición de secuencias contiguas (OLC, overlap layout consensus); generando a partir de las bibliotecas preprocesadas un ensamble a nivel de *contigs* y *scaffolds* (superestructuras compuestas por unión de *contigs* ordenados). El ordenamiento de *contigs* y la

sintonía del genoma se realizó con el programa Mauve Genome Alignment (version 2.4.0) (Ewing y Green, 1998; Darling *et al.*, 2004; Andrews, 2010; Schmieder y Edwards, 2011; Li *et al.*, 2012).

Anotación de genomas e identificación de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios

La anotación de genomas se realizó mediante RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, versión 2.0). Este procedimiento nos revela la predicción de genes que codifican proteínas, carbohidratos, lípidos, y otras unidades funcionales del genoma de las bacterias (ARNs estructurales, pseudogenes, plásmidos, transposones y elementos móviles). Con la plataforma antiSMASH (version 3.0.5) se identificaron, mediante anotación funcional, genes biosintéticos relacionados con la producción de metabolitos secundarios (MS). El análisis detecta secuencias génicas con dominios conservados típicos para la producción de enzimas implicadas en MS, y se presentan como un posible gen biosintético (Medema *et al.*, 2011; Overbeek *et al.*, 2014).

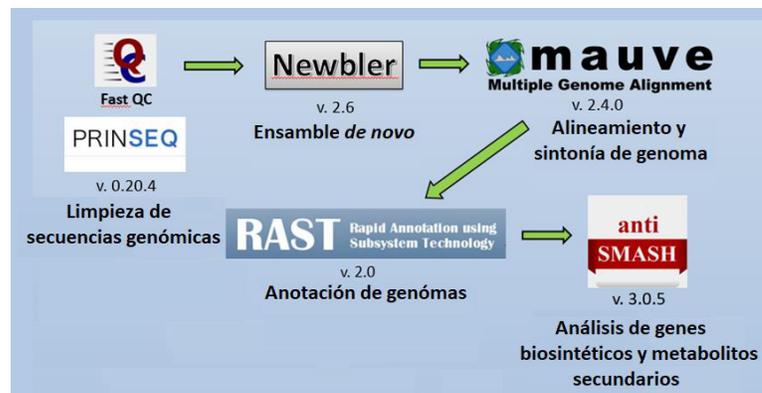


Figura 3. Diagrama de proceso bioinformático para el análisis genómico.

Evaluación *in vivo* de bacterias marinas en dietas para camarón *L. vannamei*

Los bioensayos con las bacterias marinas y desafíos con camarón se realizaron en el Laboratorio de Acuicultura del ITSON en Cd. Obregón, Sonora.

Preparación de dietas

Las cepas probióntes 36R, 13L y 36Y se reactivaron en caldo y se sembraron en placas de TSA (2%NaCl) o MA por 24 h a 30°C. Se inocularon 2 colonias en un matraz con 500 ml de TSB (2% NaCl) o MB y se incubaron en un agitador orbital Incu-Shaker (Benchmark) por 24 h a 30°C y 150 RPM. La biomasa se cosechó por centrifugación a 5,000 RPM durante 10 min, y se resuspendió en 250 ml de solución salina para aplicar por aspersión (0.4 ml/g de alimento) en 500 g de alimento comercial para camarón juvenil (Camaronina, Purina-Cargill) con 35% de proteína. De cada suspensión bacteriana se estimó la carga de UFC mediante siembra en placas de TSA o MA, por dilución. Se prepararon cuatro dietas: D1 con 36R *Bacillus pumilus*, D2 con 13L *Bacillus safensis*, D4 con 36Y con *Pseudoalteromonas piscicida*, D4 con una mezcla 1:1 de 36R y 13L, y C dieta control sin aditivo bacteriano. El alimento se colocó en charolas para agregar un segundo recubrimiento (gelatina al 6%), y posteriormente se secó en un horno a 50°C (Yamato) por 3 h. El alimento desecado se guardó en recipientes de plástico etiquetados hasta su uso (Manilal *et al.*, 2011; Sugathan *et al.*, 2014).



Figura 4. Cosecha de biomasa y preparación de dietas experimentales.

Transporte y aclimatación de organismos

Un laboratorio comercial de postlarvas de camarón del Sur de Sonora, México proporcionó un lote de camarones juveniles *L. vanammei* (1 g promedio), los cuales fueron recibidos para su aclimatación en el Laboratorio de Acuicultura de ITSON, en 2 tinajas con 3,000 L de agua marina filtrada (35% salinidad) y aireación constante.

Etapa de alimentación

El bioensayo se realizó en dos fases: una de alimentación y otra de desafío. En la primera etapa se utilizaron 250 camarones (1.6 g promedio), los cuales se distribuyeron en 5 tinas con un volumen de 200 L de agua marina, a una densidad de 50 organismos por tina. Durante 28 días se alimentaron 4 tratamientos y un control, en base al 8% de biomasa dividida en dos raciones al día (8 AM y 5 PM) (Tacon *et al.*, 2011).

Tabla 2. Relación de dietas utilizadas para el bioensayo de camarones juveniles.

Tina	Tratamiento	Descripción	Organismos
1	D1	36R – <i>B. pumilus</i>	50
2	D2	13L – <i>B. safensis</i>	50
3	D3	36Y - <i>P. piscicida</i>	50
4	D4	Mezcla de 36R y 13L (1:1)	50
5	C	Control (solución salina)	50

Manejo y parámetros fisicoquímicos del agua

Diario se sifonearon heces y restos de alimento en el agua de las tinas. Semanalmente se realizó un recambio de agua del 60% y una biometría para ajustar la alimentación. Para mantener los rangos óptimos del agua, se monitoreo diario la temperatura, concentración de oxígeno disuelto (DO) (Oxímetro YSI-55), el pH (Hanna) y salinidad (BioMarine). Para la desinfección de equipos y se utilizó alcohol al 70% (Khanjani *et al.*, 2016).

Recuento de hemocitos

De cada tratamiento se tomaron cuatro muestras de hemolinfa de camarón. Se extrajeron 100 µL del seno ventral del organismo y se mezclaron con el mismo volumen de EDTA (1:1). El conteo total de hemocitos (CTH) se realizó en la cámara de Neubauer y se expresó como células ml⁻¹ (Song *et al.*, 2003).

Diseño experimental de bioensayo de desafío

Los organismos que fueron alimentados por 28 días, se transfirieron a la sala de bioensayos y se mantuvieron 24 h para aclimatación antes del desafío con la cepa

patógena *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32). En el diseño experimental las unidades fueron distribuidas completamente al azar. Para el desafío se organizaron 6 tratamientos por triplicado en peceras de cristal, cada unidad contenía 8 camarones (3.2 g promedio), con 30 L de agua marina (35 ‰), aireación constante, tapaderas y comederos. Se registró una temperatura de 28-30°C en la sala, y se mantuvo un fotoperíodo de 12 h con luz/oscuridad (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2016).

Preparación y aplicación de inóculo bacteriano

Para el desafío se utilizó la cepa *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32), la cual se reactivó en TSB y se sembró en placas de TSA (2% NaCl), TCBS y CHROMagar Vibrio para corroborar su fenotipo. A partir de una colonia pura, se realizó un preinóculo en 3 ml de TSB (2% NaCl) por 1 h a 30°C. Posteriormente el preinóculo se agregó a un matraz con 2.5 L de TSB (2% NaCl), y se incubó a 30°C en agitación orbital, hasta alcanzar una OD a 600 nm de 1 (10^7 - 10^9 cel ml⁻¹ aprox). Para determinar la carga de UFC ml⁻¹ la suspensión se sembró por dilución seriada en TCBS. Se agregaron 140 ml de inóculo (4.7 ml L⁻¹ aprox.) a cada pecera de desafío, y al control negativo se agregó TSB estéril (Tran *et al.*, 2013; Joshi *et al* 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015).

Tabla 3. Relación de tratamientos del bioensayo de desafío. Los organismos continuaron con alimentación.

Tratamiento	Desafío	Organismos	Repeticiones
D1-36R	Si	24 (8 org/acuario)	3
D2-13L			
D3-36Y			
D4 – Mezcla			
C+			
C-	No		

Monitoreo y muestreo de organismos

Después de aplicar el inóculo los organismos se revisaron cada hora y se colectaron los moribundos para bacteriología, PCR y análisis histológicos. Los datos de mortalidad

(por hora y tratamiento) se registraron en una bitácora. Los organismos continuaron alimentándose una vez al día con una ración baja (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015).

Bacteriología y recuperación de la cepa patógena

Para evaluar el postulado de Koch, el patógeno fue recuperado de los organismos infectados y moribundos mediante bacteriología de estómago y hepatopáncreas en placas de TCBS (incubación 24 h a 30°C). Las colonias verdes se sembraron en TSA (2% NaCl) y CHROMagar Vibrio para corroborar rasgos coloniales y coloración morada malva de la cepa patógena, respectivamente. De estos aislados se extrajo el ADN para realizar PCR-tiempo real (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015).

Diagnóstico molecular del desafío experimental por PCR-tiempo real

El análisis molecular de los aislados recuperados del bioensayo y la cepa de desafío, se realizó por PCR-tiempo real usando el kit IQ REAL AHPND/EMS (GeneReach) siguiendo las instrucciones del fabricante. La prueba se basa en la detección de copias del gen PirAB (toxina) de *V. parahaemolyticus* y un plásmido característico de AHPND (sonda FAM), así como ADN genómico de camarón (sonda VIC). Cada mezcla de reacción (25 µL) contenía 1X of Real-Time PreMix, 4U of IQzyme DNA polimerasa, y 2µL de ADN templado. Se utilizaron las siguientes condiciones: 40 ciclos de 93°C por 15 seg y 60°C por 1min. Se utilizó el equipo 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) y el software 7500 Fast System (version 1.4.2) (Chen *et al.*, 2017).

Previamente, las cepas de *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32, B25 y E14V2) se confirmaron por PCR, utilizando el primer AP3: (AP3F) - 5' - ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC - 3' y (AP3R) - 5' - GTGGTAATAGATTGTACAGAA - 3' (amplicón de 336 pb). Con esta prueba se detectan genes que codifican de proteínas (toxinas) de *V. parahaemolyticus* AHPND. Se siguió el protocolo y las condiciones de reacción de Sirikharin *et al.*, 2014.

Análisis histológico

Las lesiones características que causa AHPND en hepatopáncreas de camarón se identificaron mediante histopatología. De cada tratamiento se fijaron organismos moribundos con solución Davidson por 24 h antes del proceso histológico. Para observar el daño en tejido, las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina se revisaron en un microscopio Axio Imager M2 (Carl Zeiss) (Bell y Lightner, 1988).

Análisis estadístico

Los resultados de pruebas antagónicas y biofilm se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95%. Los resultados del bioensayo de desafío en camarón fueron analizados mediante ANOVA y Kaplan Meier, para determinar las diferencias entre los tratamientos y la sobrevivencia, respectivamente. Se utilizó el software estadístico SPSS Statistics 23 (IBM) y Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc.) (Leyton *et al.*, 2012; Velmurugan *et al.*, 2013).

RESULTADOS

Aislamiento de cepas probióntes

Se procesaron por bacteriología diferentes especímenes de distintas localidades y a partir de cultivos heterótrofos (72 h), se aislaron 180 cepas con características distintas.

Tabla 4. Relación e identificación de especímenes colectados en diferentes localidades

Especímen	Localidad					Nombre científico
	BL	Me	At	Ri	Ya	
Camarón blanco		X	X	X		<i>Litopenaeus vannamei</i>
Camarón azul		X	X	X		<i>Litopenaeus stylirostris</i>
Ostión de Cortéz	X			X		<i>Crassostrea corteziensis</i>
Ostión japonés	X			X		<i>Crassostrea gigas</i>
Almeja chocolata			X		X	<i>Megapitaria squalida</i>
Almeja china			X	X		<i>Chione sp.</i>
Almeja lisa			X	X		<i>Polymesoda sp.</i>
Pata de mula	X		X			<i>Anadara tuberculasa</i>
Alga Clorophyta 01	X		X		X	<i>Rhizoclonium implexum</i>
Alga Clorophyta 02	X		X			<i>Enteromorpha compressa</i>
Alga Rhodophyta 01					X	<i>Gracilaria sp.</i>
Alga Rhodophyta 02					X	<i>Gymnogongrus sp.</i>
Salina	X	X	X		X	N.A.
Sedimento	X	X	X		X	
Agua	X	X	X	X	X	

BL=Bahía de Lobos; Me=Mélagos; At=Atanasia; Ri=Riito y Ya=Yaváros

Evaluación preliminar de la actividad antagónica *in vitro*

Mediante la evaluación preliminar *in vitro* del lote de bacterias por CSM, con la cepa *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32), se seleccionaron cinco aislados con potencial antagónico para una caracterización bioquímica y genómica más profunda (Tabla 5). Las cepas se purificaron en placas de TSA o MA y se criopreservaron a -80°C.



Figura 5. Colecta de algas y sedimento salino.

Tabla 5. Cepas seleccionadas con potencial antagónico.

Cepa	Localidad	Espécimen
36R	La Atanasia	Salina
42	Lobos	Salina
13L	Lobos	Salina
36Y	El Riíto	Agua Hipersalina
02Y	Yaváros	Alga café (<i>Gracilaria sp.</i>)

Caracterización de cepas con potencial probiótico

La descripción macroscópica de las colonias de las cepas 36R, 42 y 13L fueron similares, grandes y circulares con borde ligeramente irregular, color blanca o crema, opaca y plana. Las colonias de 36Y y 02Y fueron medianas con borde definido, color amarillo/naranja y cóncavas. En las pruebas microbiológicas las cepas 36R, 42 y 13L resultaron bacilos Gram positivos, esporulados (36R 1.62 X 0.92 μm ; 13L 1.50 X 0.75 μm). Mediante la prueba de TSI (Becton Dickinson), estos mismos aislados lograron fermentar glucosa, lactosa y sacarosa, mientras que 36Y y 02Y no fueron capaces. Las cepas 36R y 13L se propagaron a 50°C, y 13L toleró hasta 30% de salinidad. Las cepas 36R, 42 y 13L presentaron hemólisis parcial (beta), 36Y y 02Y no presentaron hemólisis (gama). Todas las bacterias excepto 02Y producen proteasas y ninguna produce quitinasas, lo cual es benéfico para aplicaciones en cultivo camaroneros. Todas las cepas son sensibles a florfenicol y enrofloxacin. En el caso de oxitetraciclina, las cepas 36R, 42 y 13L son sensibles a este antibiótico, sin embargo 36Y y 02Y son resistentes.

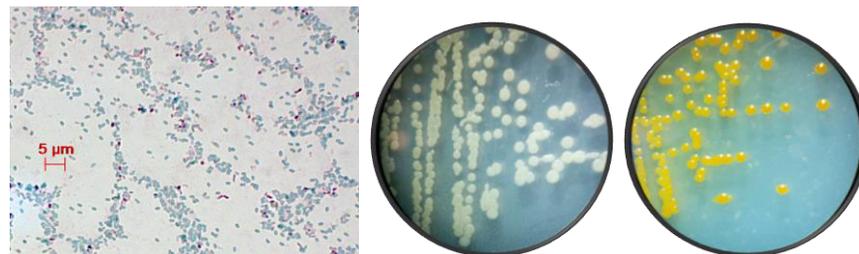


Figura 6. Endosporas de cepa 36R, colonias de cepa 13L y 36Y, respectivamente.

Tabla 6. Caracterización microbiológica y fisiológica de las bacterias antagonistas.

Prueba	Cepa				
	36R	42	13L	36Y	02Y
Gram	+	+	+	-	-
Morfología	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Oxidasa	-	-	-	+	+
Catalasa	+	+	+	-	-
Endosporas	+	+	+	-	-
Propagación					
TSA 2% NaCl	+	+	+	+	+
MA	+	+	+	+	+
TSI	+	+	+	-	-
15°C	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	-	-
50°C	+	-	+	-	-
Tolerancia NaCl					
2%	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+
20%	-	-	+	-	-
30%	-	-	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
Enzimas					
Hemolisis	β	β	β	γ	Γ
Proteasa	+	+	+	+	-
Amilasa	-	-	-	+	+
Quitinasa	-	-	-	-	-
Celulasa	+	+	+	-	-
Antibióticos					
Florfenicol	S	S	S	S	S
Enrofloxacina	S	S	S	S	S
Oxitetraciclina	S	S	S	R	R

Identificación bioquímica

El perfil de identificación se presenta en la siguiente Tabla 7. Entre las cepas candidatas se presentaron bacterias Gram positivas y negativas; y se utilizaron sistemas de identificación diferentes. Se observó que el sistema Microscan tiene limitantes para la identificación de aislados silvestres, mientras que el kit API tuvo un mejor desempeño.

Tabla 7. Resultados de identificación mediante perfil bioquímico.

Cepa	Gram	Morfología	Identificación	Sistema
36R	+	bacilo largo	<i>Bacillus pumilus</i> (99.9%)	API 20E y 50 CHB (BioMerieux)
42	+	bacilo largo	<i>Bacillus pumilus</i> (99.9%)	
13L	+	bacilo largo	<i>Bacillus pumilus</i> (99.9%)	
36Y	-	bacilo corto	Biotipo raro	Microscan (Siemens)
02Y	-	bacilo corto	Biotipo raro	

Curvas de crecimiento

Para determinar las fases de crecimiento de cada cepa, se realizó la curva en TSB (2% NaCl) y MB (caldo marino). En la curva con TSB se observó que las cepas del género *Bacillus* (36R, 42 y 13L) alcanzaron la fase estacionaria a las 12 h, mientras que el crecimiento de las cepas 36Y y 02Y se presentó después de las 26 h. En MB las cepas 36Y y 02Y alcanzaron la fase estacionaria a las 10 y 12 h respectivamente; mientras que las cepas 13L, 42 y 36R se estacionaron a las 18, 20 y 24 h, respectivamente.

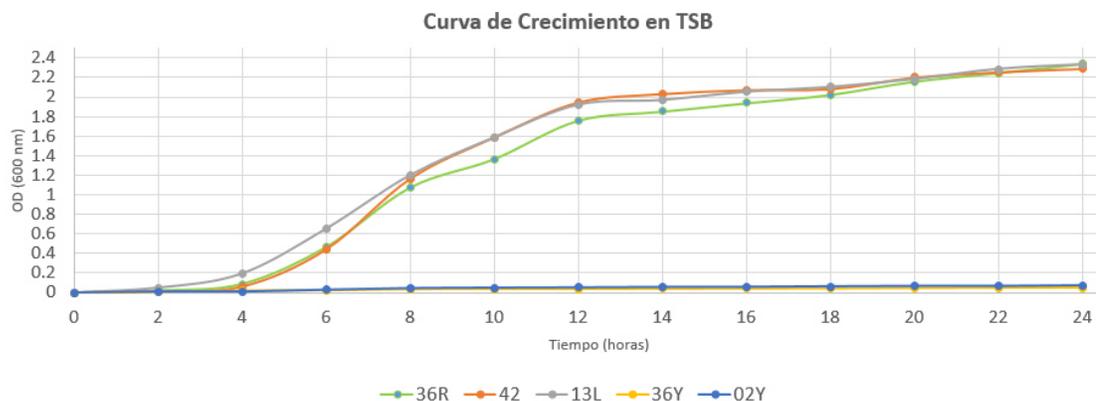


Figura 7. Curva de crecimiento de cepas en TSB (2% NaCl), absorbancia a 600 nm.

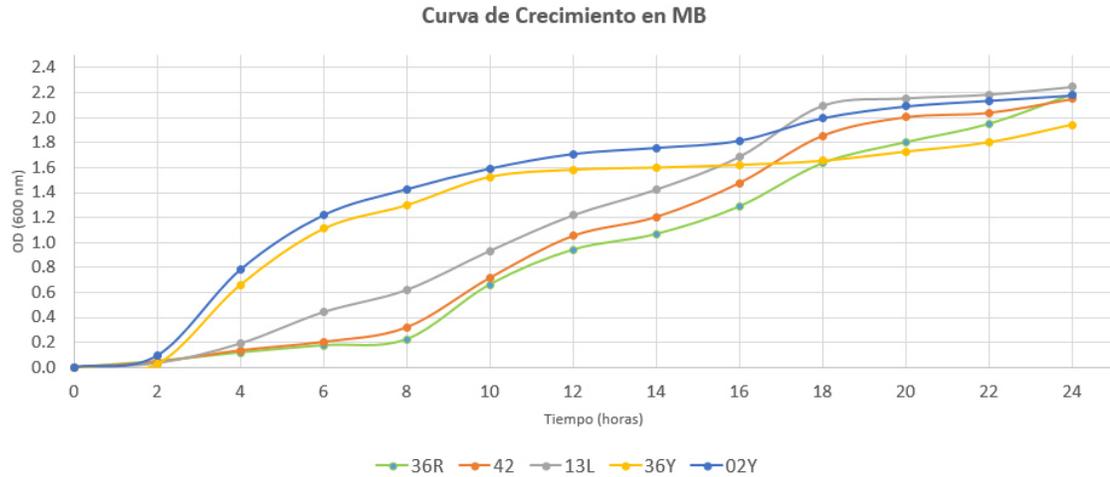


Figura 8. Curva de crecimiento de cepas con potencial probionte en MB, absorbancia a 600 nm.

Se observó que las bacterias pigmentadas 36Y y 02Y se propagan mejor en caldo MB que en TSB, debido a que son estrictamente marinas.

Producción de biofilm

Se evaluó la propiedad de las cepas para producir biofilm en microplaca de poliestireno. Con esta técnica se observó la formación de agregados bacterianos y se cuantificaron con un lector. Las cepas 36Y y 02Y presentaron formación de biofilm moderada. Como control se utilizó TSB, MB y agua.

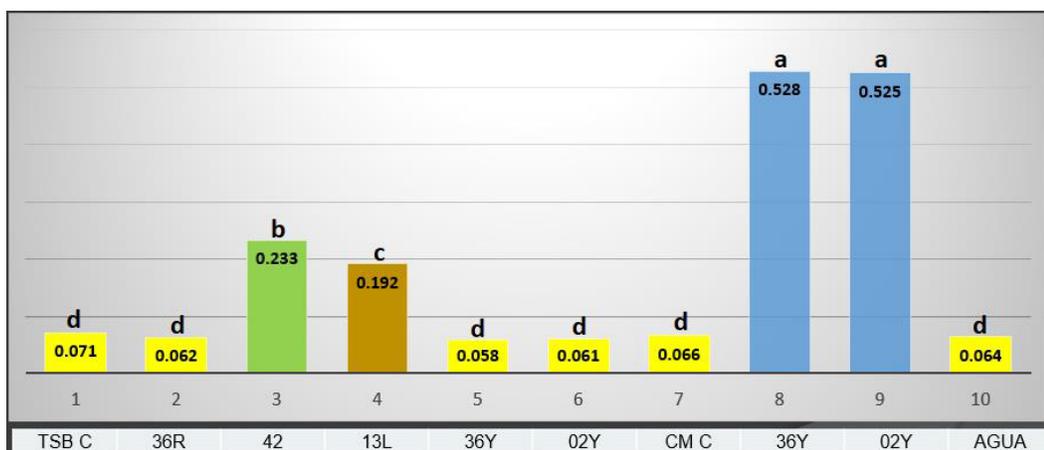


Figura 9. En las lecturas, las cepas 42, 13L, 36Y y 02Y presentan actividad moderada; ANOVA ($p < 0.05$).

Pruebas de antagonismo in vitro

En la prueba de CSM el antagonismo se observó basado en la interacción e inhibición entre la cepa candidata y las cepas problema (*V. parahaemolyticus* ATCC, *V. parahaemolyticus* AHPND MC32, B25y E14V2, 11DC *V. parahaemolyticus* silvestre). Durante la aplicación La incubación de bacterias probióntes en placa fue por 48 h para que liberaran metabolitos antimicrobianos el medio. Debido a que se formó un área de inhibición entre las cepas, fue posible medir la zona en mm (Figura 10).

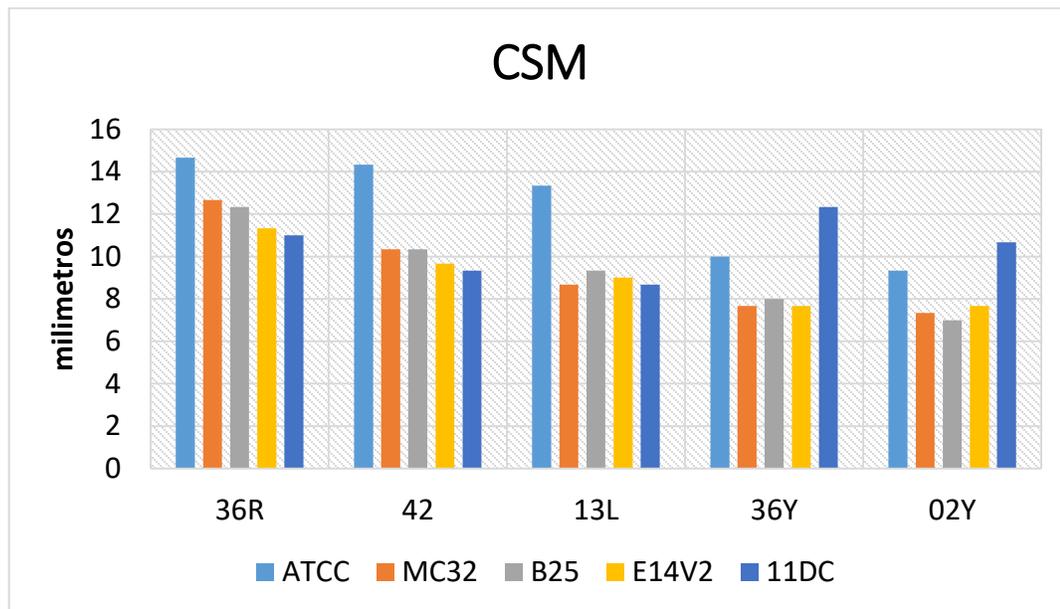


Figura 10. Promedio de zonas de inhibición en mm entre cepas.

En esta prueba las bacterias del género *Bacillus* (36R, 42 y 13L) mostraron ligeramente mayor actividad antagónica a las diferentes cepas evaluadas. Sin embargo en todas las cepas se presentó antagonismo con diferentes tamaños de inhibición.

En la prueba de doble capa de Dopazo, las cepas probióntes se incubaron por 72 h, posteriormente se preparó la placa con las bacterias *V. parahaemolyticus* (ATCC, y AHPND MC32, B25 y E14V2). Los halos de inhibición se registraron para determinar el antagonismo. Las cepas 36R y 42 pertenecientes al género *Bacillus* mostraron mayor rendimiento antagónico en esta prueba, sin embargo con las 3 cepas restantes también se observó inhibición.

Halos de Inhibición

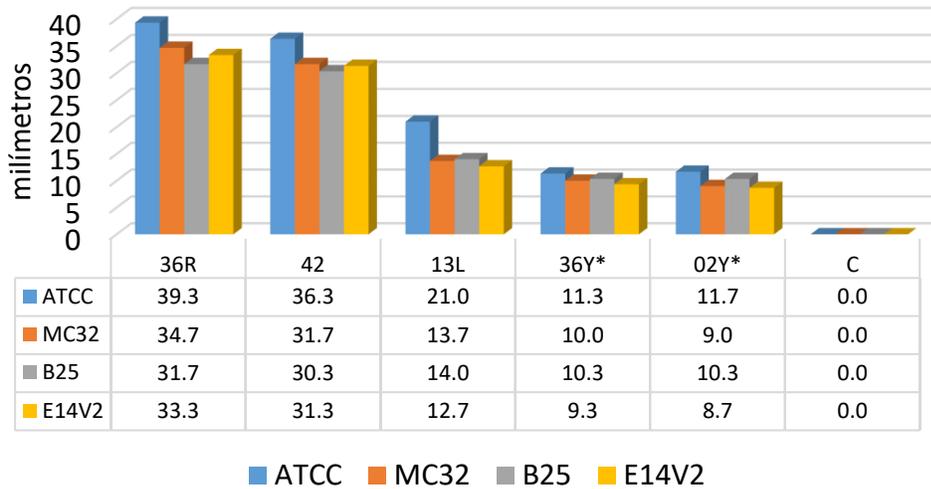


Figura 11. Promedio de halos de inhibición a *V. parahaemolyticus* después de 24 h.

Posterior a las pruebas en medios sólidos, se evaluó el efecto antagónico utilizando medios líquidos y condiciones dinámicas de agitación. En el primer ensayo se realizó un co-cultivo en caldo TSB, agregando un volumen con cada cepa probiótica y la cepa patógena *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32). La carga de *Vibrio* en los cultivos se estimó mediante siembra en placa de TCBS por dilución seriada.

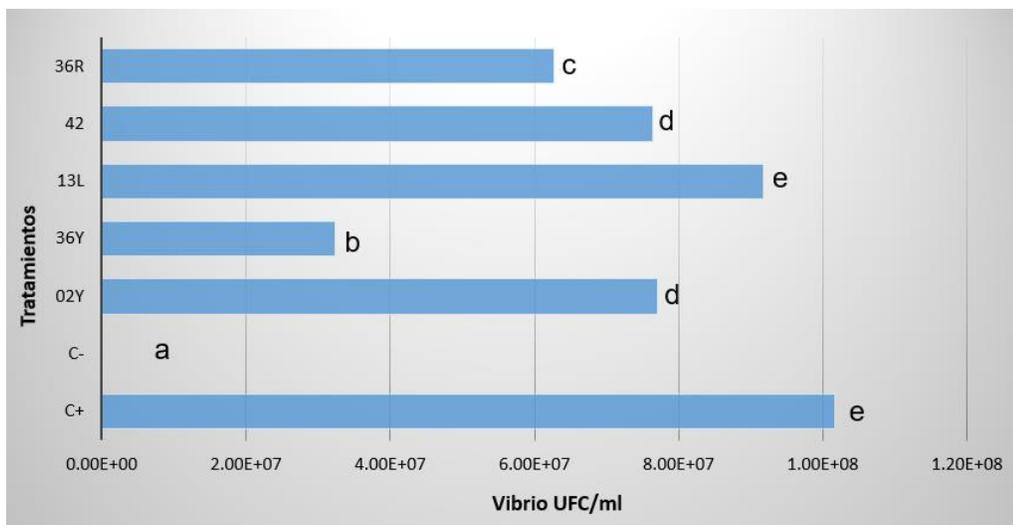


Figura 12. Carga de *V. parahaemolyticus* después de 12 h de incubación en co-cultivo; ANOVA ($p < 0.05$).

Se registró una menor carga (UFC/ml) de *Vibrio* en el tratamiento con la cepa 36Y (32×10^6) en comparación con el control positivo; seguido de la cepa 36R (62.6×10^6), 02Y (77×10^6) y 42 (76.3×10^6). El control positivo resultó con una carga similar al *Bacillus* 13L, con 101.6×10^6 y 91.6×10^6 , respectivamente.

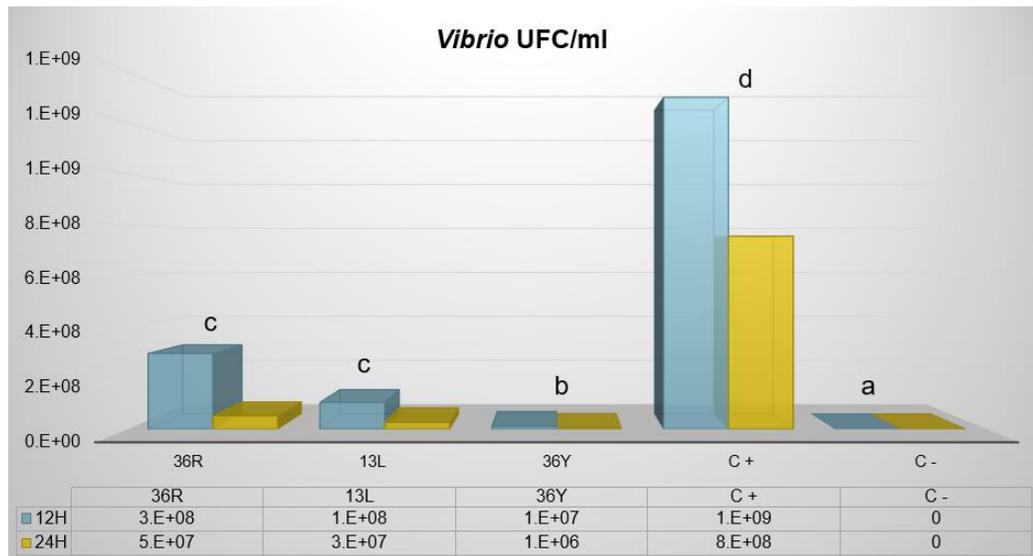


Figura 13. Carga de *V. parahaemolyticus* después de 12 y 24 h de incubación en co-cultivo de agua marina; ANOVA ($p < 0.05$).

Esta prueba reveló la fuerte actividad antagónica que tienen las bacterias en el agua marina, ya que las cargas de *Vibrio* fueron significativamente menores que el control positivo. La carga (UFC/ml) a las 12 h de la cepa 36Y fue de 1×10^7 y a las 24 h fue de 1×10^6 , mientras que el control positivo a las 12 h reportó 1×10^9 y a las 24 h 8×10^8 . El control negativo no presentó carga de *Vibrio* en ninguna de las pruebas en suspensión.

Selección de bacterias candidatas finales

Para continuar con análisis referentes a evaluación de extractos crudos, genómica y bioensayos, se seleccionaron 3 cepas (36R *Bacillus pumilus*, 13L *Bacillus safensis* y 36Y *Pseudoalteromonas piscicida*) para continuar con el estudio.

Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida

Se determinó la MIC y MBC de los extractos crudos de las bacterias 36R, 13L y 36Y, a base de etil acetato 1:1, se reportaron de la siguiente manera: La formación de color rosa

en los pozos indicó la presencia de células bacterianas (MIC), y la MBC se determina como la menor concentración de extracto que erradicó el 99.9 % de las bacterias. En los extractos de las cepas 36R y 13L, la MIC para *Vibrio parahaemolyticus* MTCC451 fue de 25 µg/ml y la MBC de 50 µg/ml. El extracto de la cepa 36Y presentó un valor de MIC de 50 µg/ml y un valor de MBC de 100 µg/ml. El índice de MIC (MBC/MIC<4) calculado para el extracto de 36Y demuestra que tiene actividad bactericida.

Ensayo de ruptura del biofilm

Por microscopía se observó una ruptura o menor densidad del biofilm en las muestras tratadas con el extracto, comparadas con la muestra control. El metanol inhibió ligeramente el biofilm del microorganismo. Con cristal violeta 0.1% se visualizó el biofilm. Basado en el patrón de adherencia de células al cubreobjetos se determinó que el compuesto de la cepa 13L presentó mayor actividad que la cepa 36R y 36Y.

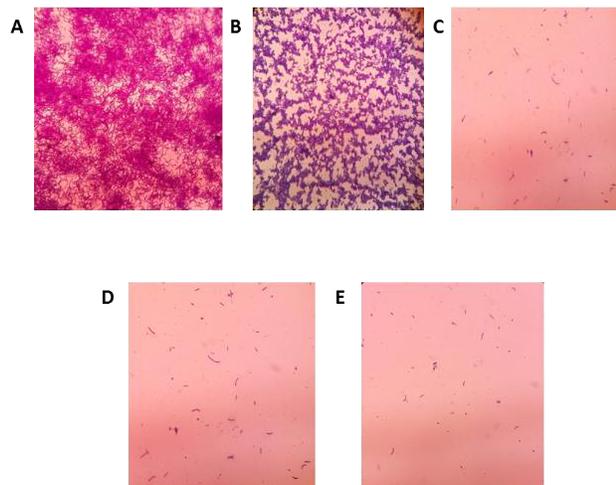


Figura 14. Visualización microscópica (40X) de la actividad antibiofilm de los extractos contra *Vibrio parahaemolyticus* MTCC451. En A (control sin extracto) y B (control de solvente) se demuestra la capacidad formadora de biofilm de la bacteria. En C, D y E se observa una menor formación de biofilm debido a la capacidad de ruptura de los extractos de las cepas 36Y, 36R y 13L, respectivamente.

Quorum quenching (QQ)

Mediante esta prueba se trató de determinar si los extractos crudos eran capaces de inactivar el QS de la cepa reportera *Chromobacterium violaceum* (CV2656), la cual genera un pigmento violeta mediante autoinductores (AHL, acil-homoserina lactona). La

inhibición del pigmento se hubiera considerado como positivo para la inactivación de AHL; sin embargo los 3 extractos demostraron actividad antimicrobiana e inactivaron a la cepa reportera.



Figura 15. Resultados de Quorum Quenching con los extractos crudos de 36R, 13L y 36Y.

Análisis por PCR (GTG)₅

Los 5 aislados fueron analizados por PCR (GTG)₅. En la Figura 16 se muestra el perfil de bandas amplificado por las bacterias. El tamaño de los productos fue de 200-2000 pb. Las bandas revelaron que los aislados 36R y 42 poseen el mismo patrón. El objetivo de esta técnica fue discriminar, y estimar similitudes o diferencias entre las cepas.

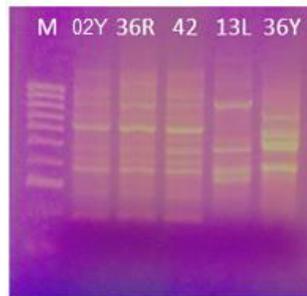


Figura 16. Patrón de bandas amplificado (GTG)₅ por las cepas de estudio en agarosa 1.5%.

Identificación molecular por el gen 16S ARNr

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y homologadas en la base de datos de NCBI mediante BLAST; se descargaron secuencias de referencia con alta similitud para construir un árbol filogenético. Con las secuencias 16S ARNr se determinó que las cepas 36R, 42, 13L, 36Y y 02Y, corresponden en un 98-99% a las especies (Tabla 8):

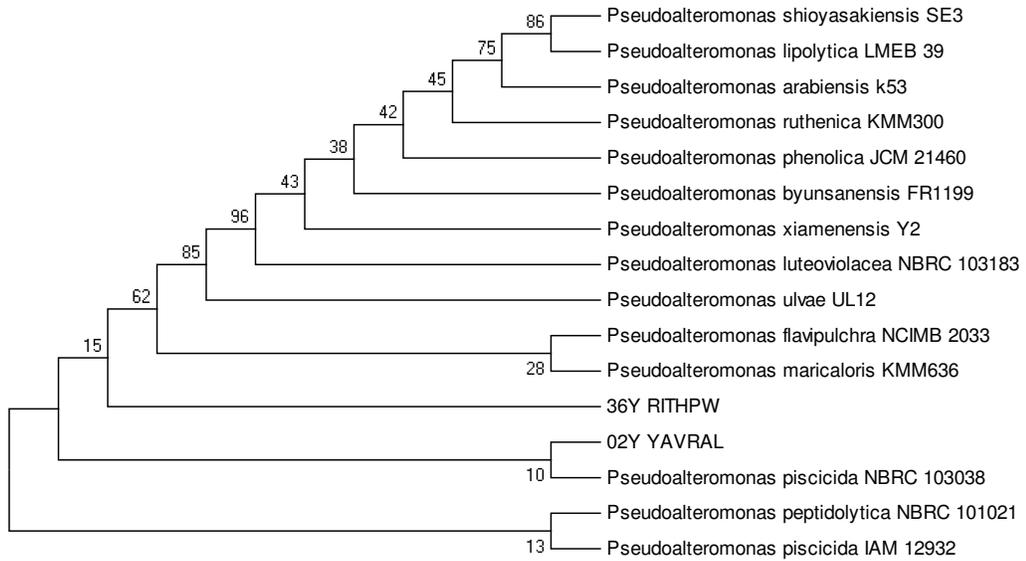


Figura 17. El análisis molecular filogenético de las cepas 36Y y 02Y (*P. piscicida*) se realizó por el método de Maximum Likelihood (ML), 1,000 Bootstrap (Kumar *et al.*, 2016).

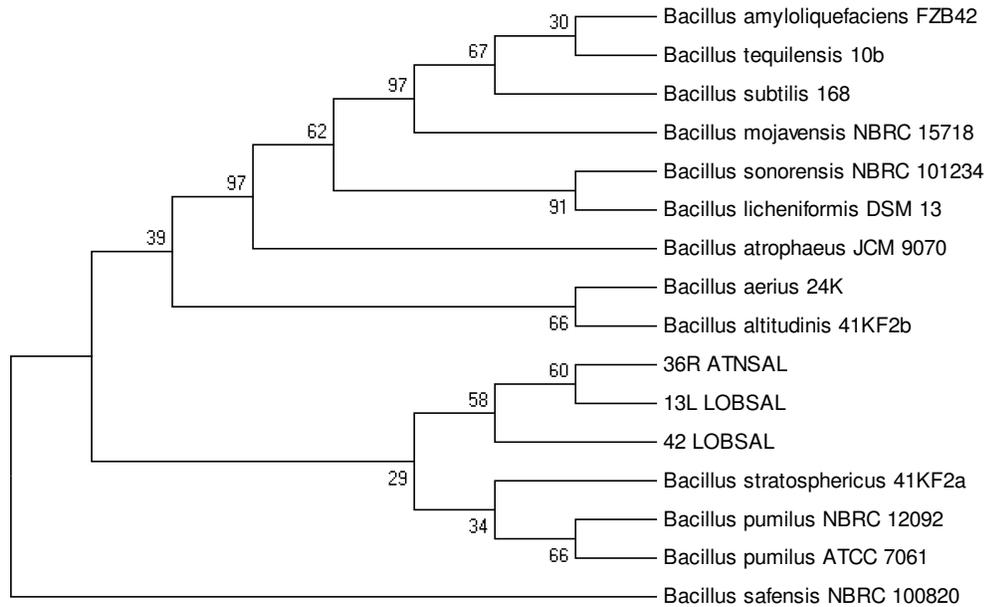


Figura 18. El análisis molecular filogenético de las cepas 36R, 42 y 13L (*Bacillus*) se realizó por el método Maximum Likelihood (ML), 1,000 Bootstrap (Kumar *et al.*, 2016).

Tabla 8. Relación de identificación mediante secuencia parcial del gen 16S.

Cepa	Identificación	No. de Acceso	Tipo
36R	<i>Bacillus pumilus</i>	MF033448	Secuencia parcial del gen 16S ARN ribosomal
42	<i>Bacillus sp.</i>	MF033451	
13L	<i>Bacillus safensis</i>	MF033449	
36Y	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	MF033450	
02Y	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	MF033452	

Amplificación e identificación del gen PKS-I

De los tres aislados marinos, el gen PKS-I amplificó mediante PCR solo en la cepa 36Y. El producto fue purificado y enviado a secuenciar (Eurofins Genomics), para homologar en la base de datos de NCBI con el algoritmo BlastX. Posteriormente, la secuencia fue analizada y se construyó un árbol filogenético. La secuencia del gen PKS-I fue depositada en NCBI BankIt con el número de acceso 2013557.

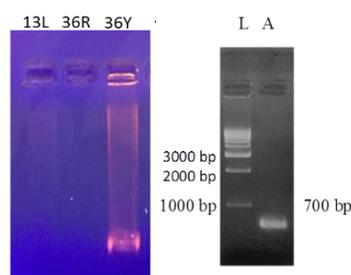


Figura 19. Amplificación del gen PKS positivo para 36Y, 36R y 13L resultaron negativas (izq). El producto amplificado pesa alrededor de 700 pb, corrido en un gel de agarosa con un marcador de 1000 pb.

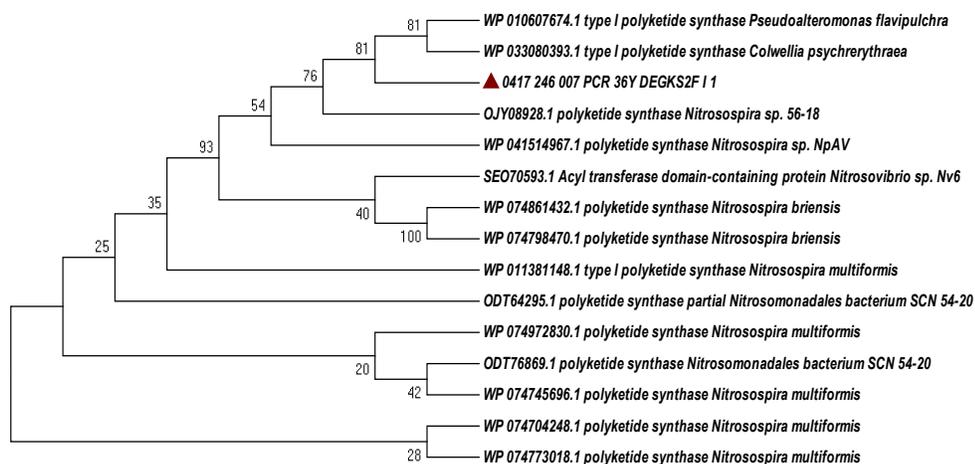


Figura 20. El análisis filogenético del gen PKS-I de cepa 36Y por el método de Neighbor-Joining.

Secuenciación y ensamble de genomas

A partir de las secuencias obtenidas por Ion Torrent y MiniSeq (*.fastq), se sometieron a un tratamiento o preproceso de lecturas crudas, el cual consistió en verificar con FastQC la calidad de las secuencias; y mediante PRINSEQ se removieron adaptadores, se filtraron lecturas cortas (< 100 pb) y bases o lecturas de baja calidad, de acuerdo a la escala de Phred (Q 20). En el caso de la cepa 13L se generó una gran cantidad de lecturas (reads) y Mpb debido a que la cobertura fue mucho mayor que en las secuencias de 36R y 36Y que fueron secuenciadas con la plataforma Ion Torrent.

Tabla 9. Características de los archivos crudos generados tras la secuenciación de ADN genómico de 36R *Bacillus pumilus*, 13L *Bacillus safensis* y 36Y *Pseudoalteromonas piscicida*.

	36R		13L		36Y	
Plataforma	Ion Torrent PGM		MiniSeq Illumina		Ion Torrent PGM	
Cobertura	21.6X		234X		33.5X	
	Inicial	Procesado	Inicial	Procesado	Inicial	Procesado
Total de lecturas (reads)	380,463	380,278	2,291,884	2,291,884	606,805	606,534
Tamaño (Mpb)	166.06	73.48	888.45	352.48	308.48	139.63

Las secuencias filtradas se ensamblaron con Newbler y se obtuvieron las siguientes características:

Tabla 10. Características de los archivos generados por Newbler tras la secuenciación de ADN genómico.

	36R	13L	36Y
Número total de secuencias (contigs)	283	82	226
Número total de bases (Mpb)	3.94	3.68	5.15
Secuencia promedio	13,926.13	44,827.29	22,808.45
Longitud de secuencia Mínimo	102 bp	103 bp	100 bp
Longitud de secuencia Máximo	196,083 bp	508,763 bp	198,264 bp
N50	49,075 bp	136,895 bp	83,977 bp
50% del total de longitud de secuencias	25	8	24
GC %	41.1	41.6	43.3

Para el ordenamiento de contigs y sintonía de genomas se utilizó Mauve Genome Alignmen. Los genomas de referencia (cerrados) utilizados para el proceso fueron descargados de GenBank NCBI: *Bacillus pumilus* SAFR-032 para 36R, *Bacillus pumilus* MTCC B6033 para 13L, y *Pseudoalteromonas piscicida* ATCC 15057 para la cepa 36Y.

Anotación de genomas mediante RAST

Los genomas sintonizados fueron sometidos a anotación en la plataforma RAST, y se obtuvieron los siguientes resultados: 4,220, 3,793 y 4,587 secuencias codificantes (CDS); 80, 80 y 67 secuencias de ARN, para 36R, 13L y 36Y, respectivamente.

Tabla 11. Relación de datos obtenidos en la anotación de RAST por cada cepa.

	36R	13L	36Y
Tamaño (pb)	3,941,096	3,675,838	5,154,709
Contenido de GC (%)	41.1	41.6	43.3
N50	49,075	136,895	83,977
L50	25	8	24
Número de Contigs (con PEG)	283	82	226
Número de Subsistemas	474	462	494
Número de Secuencias Codificantes (CDS)	4,220	3,793	4,587
Número de ARN	80	80	67
Cobertura de Subsistema			
En Subsistema	47%	48%	45%
CDS No Hipotéticas	1841	1721	1890
CDS Hipotéticas	109	96	169
TOTAL	1950	1817	2059
No en Subsistema	53%	52%	55%
CDS No Hipotéticas	927	924	1159
CDS Hipotéticas	1343	1052	1369
TOTAL	2270	1976	2528

GC (%), guanina citosina; PEG, gen codificador de proteína; CDS, secuencia codificante

En la cepa 36R *Bacillus pumilus*, se encontraron 12 genes involucrados en la producción de bacteriocinas y síntesis de péptidos antimicrobianos ribosomales (bacitracina), 6 genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios (biosíntesis de lantioninas y auxinas), 96, 22 y 25 genes relacionados con la respuesta a estrés, metabolismo de nitrógeno y fósforo, respectivamente. Para la cepa 13L *Bacillus safensis*, se encontraron 12 genes involucrados en la síntesis de bacteriocinas y péptidos antimicrobianos ribosomales (bacitracina y resistencia a colicina), 10 genes relacionados al metabolismo secundario (tiazol/oxazol-modificado microcina TOMM y síntesis de auxinas); 97, 16 y 25 genes relacionados con respuesta a estrés, metabolismo de nitrógeno y fósforo, respectivamente. En la cepa 36Y *Pseudoalteromonas piscicida*, el análisis de RAST mostró 84 genes involucrados en la resistencia antibióticos y compuestos tóxicos, como resistencia a multidrogas, cobre, zinc, arsénico, cromo y cadmio, fluoroquinolonas, fosfomicina y tetraciclina; 12 genes relacionados con la síntesis de bacteriocinas y péptidos antimicrobianos ribosomales (marinocina y colicina V); 10 genes relacionados con metabolismo secundario, lantionina sintetetasas, paerucumarina (una nueva cumarina) y síntesis de auxinas; también se determinó la presencia de un gen integrón relacionado con mecanismos de elementos transponibles. Las 3 cepas presentan un gran número de genes relacionados con la síntesis de carbohidratos, aminoácidos y metabolismo de proteínas.

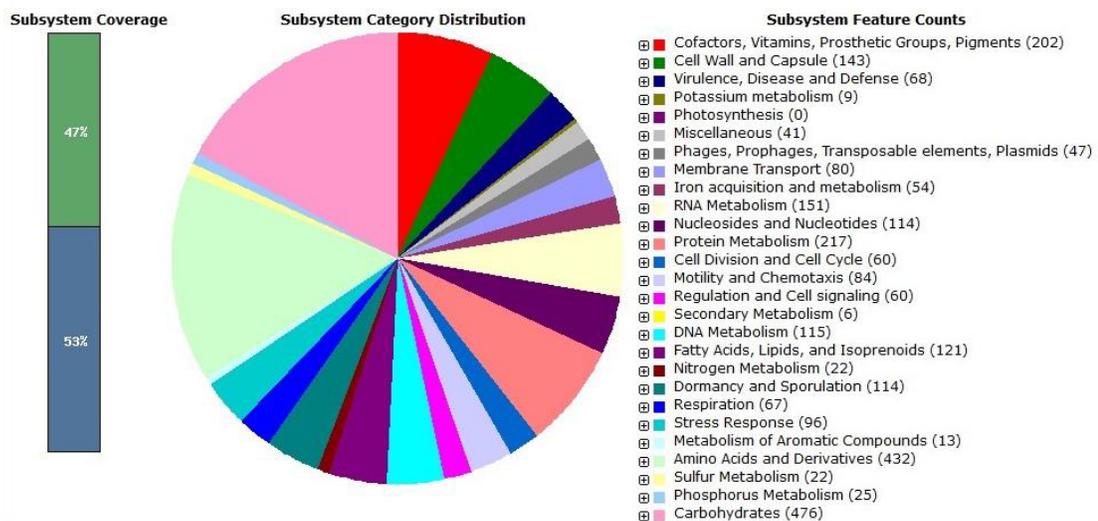


Figura 21. Anotación funcional de genes predichos para el genoma de *Bacillus pumilus* (36R).

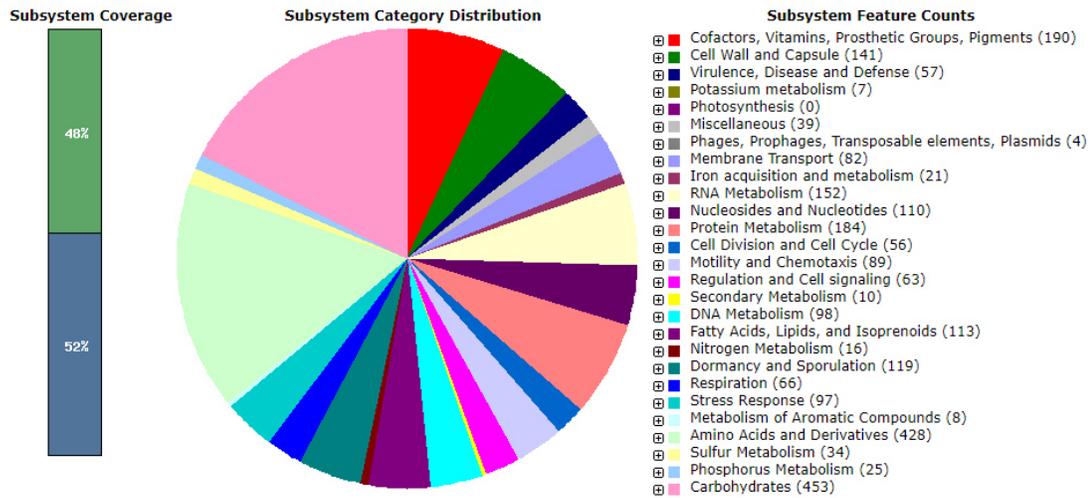


Figura 22. Anotación funcional de genes para el genoma de *Bacillus safensis* (13L).

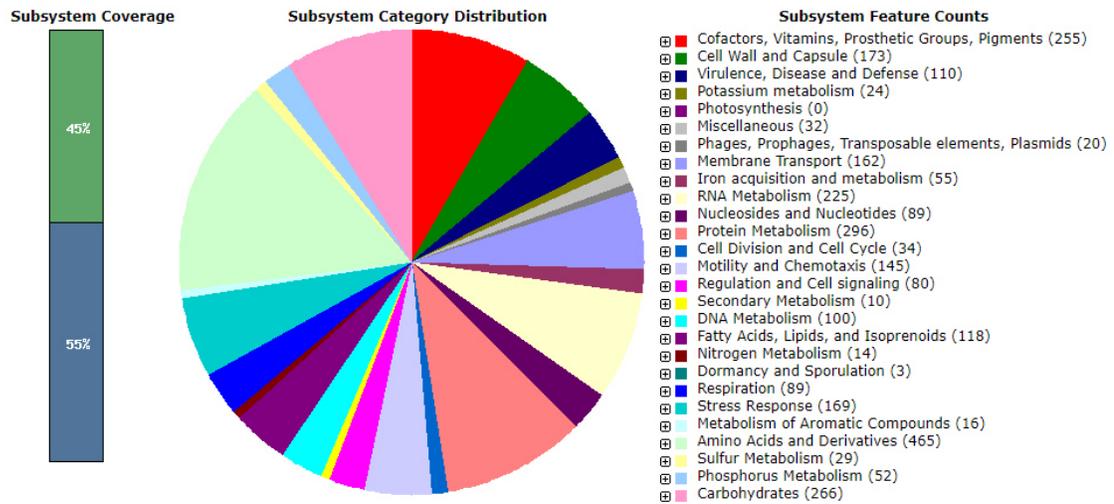


Figura 23. Anotación funcional de genes para el genoma de *Pseudoalteromonas piscicida* (36Y).

Las secuencias de los genomas completos se depositaron en GenBank bajo los números de acceso NKHG00000000, NKHH00000000 y NKHF00000000, para 36R - *Bacillus pumilus*, 13L - *Bacillus safensis* y 36Y - *Pseudoalteromonas piscicida*, respectivamente.

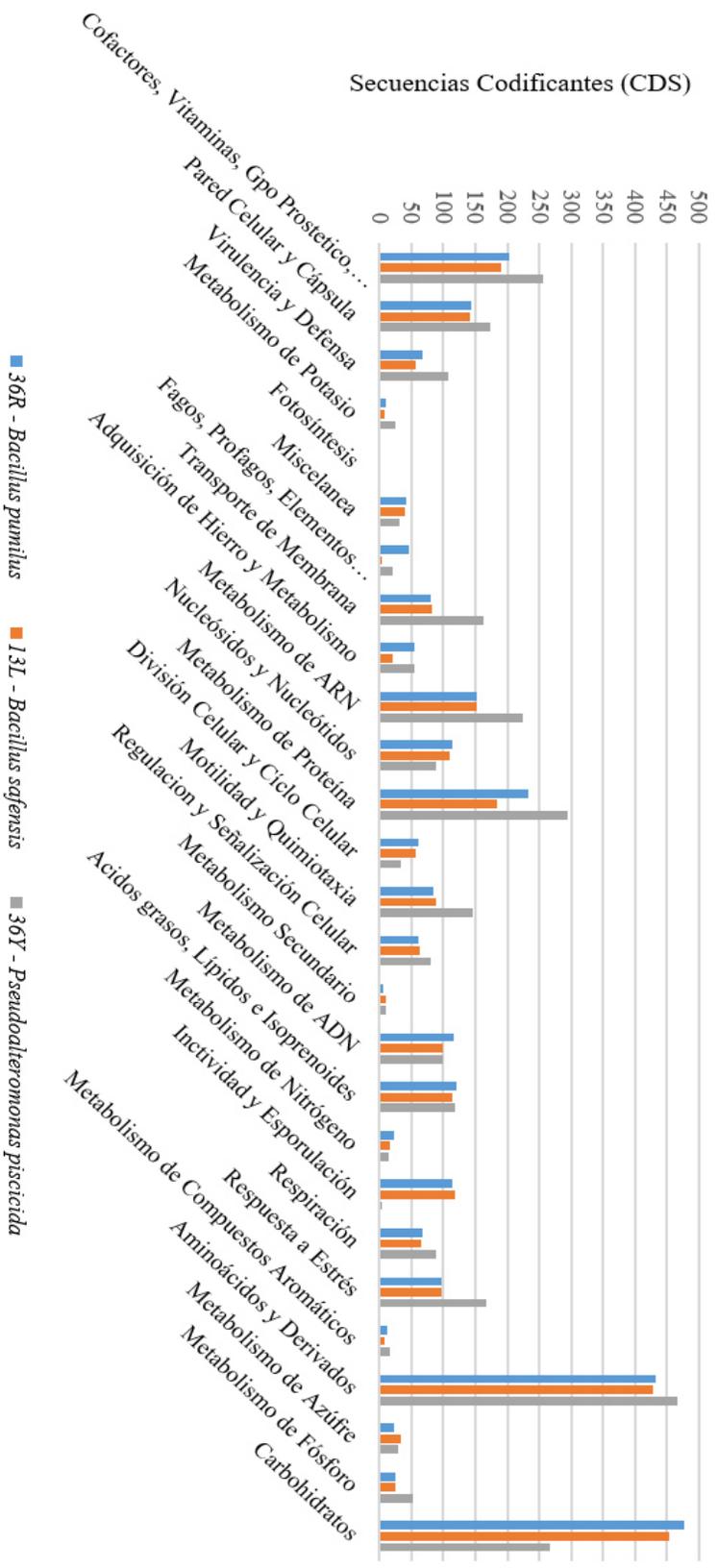


Figura 24. Comparativo de la anotación realizada por RAST de secuencias codificantes en los diferentes subsistemas analizados de las cepas con potencial probiótico.

Anotación funcional mediante AntiSMASH

Además de identificar algunos metabolitos y antimicrobianos mediante RAST, se utilizó la plataforma AntiSMASH para identificar genes biosintéticos relacionados con la producción de metabolitos secundarios. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 12. Relación de grupos de genes biosintéticos encontrados por AntiSMASH en los genomas.

Tipo	Bacteria		
	36R	13L	36Y
Bacteriocinas	2	-	2
Lantipéptidos	1	-	1
Clúster híbrido Policétido sintasa tipo I/ Sintasa de péptidos no ribosomales (PKS-I/NRPS)	1	2	3
Clúster híbrido Aril-polieno/NRPS	-	-	1
PKS tipo I	-	-	1
PKS tipo III	1	1	-
NRPS	4	4	7
Ácidos grasos	1	2	2
Glúcidos (carbohidratos)	2	4	2
Terpeno	2	2	-
Sactipéptidos	1	-	-
Otros	2	-	1
Cf_Putativos	11	17	10
TOTAL	28	32	30

Dentro de las agrupaciones de genes que presenta la plataforma, se pueden presentar identidades asociadas a un gen biosintético específico. En el caso de la cepa 36R (*B. pumilus*) dentro del grupo de Sanctipéptidos se reporta el gen Sporulation_killing_factor (skfA) (85% de similitud génica); en el grupo NRPS se reporta el gen Surfactin_biosynthetic_cluster (43% de similitud), un potente surfactante con capacidad antibiótica; en Glúcidos se reporta el gen Teichuronic_acid_biosynthetic_cluster (100% de similitud) un componente de la pared celular de Gram positivos; y en Otros se reporta el gen de Bacilysin_byosynthetic (85% de similitud) un péptido de síntesis no ribosomal. Con la cepa 13L (*B. safensis*), también se reportan los genes de producción de ácido

teicurónico y bacilicina, además dentro del grupo de NRPS se reporta el gen Lichenysin_biosynthetic_cluster (50% de similitud) un potente biosurfactante; y en el grupo Putativo se reporta el gen Mycosubtilin_biosynthetic_cluster (50% de similitud), un lipopéptido antifúngico. La cepa 36Y (*P. piscicida*) en el grupo híbrido Aril-polieno/NRPS se reporta el gen de Alterochromides_biosynthetic_cluster (95% de similitud), péptido cíclico con actividad citotóxica y antimicrobiana; y en el grupo NRPS se detectó el gen Nostopeptolide_biosynthetic_cluster (37% de similitud), productor de un péptido cíclico.

Evaluación *in vivo* de cepas con potencial probiótico

Las bacterias seleccionadas durante las pruebas *in vitro* (36R, 13L y 36Y) se utilizaron para un ensayo *in vivo*, los resultados se presentan a continuación. Las cepas de *Bacillus* (36R y 13L) presentaron fuerte actividad antagónica *in vitro* en medio sólido, además de presentar actividad enzimática (proteasas, celulasas) y esporulación. La cepa 36Y (*P. piscicida*) demostró fuerte antagonismo en pruebas de medio líquido (movilidad) y producción de biofilm *in vitro*. Según la anotación funcional de sus respectivos genomas, las tres cepas producen diferentes metabolitos secundarios y antibacterianos.

Los organismos después de ser alimentados 28 días con las dietas de aditivos bacterianos, se transfirieron a una sala de desafío donde cada tratamiento registró los siguientes datos:

Tabla 13. Información sobre dietas, parámetros zootécnicos y calidad del agua durante el bioensayo.

Tratamiento	Dieta (UFC/g)	Peso inicial (ABW g)	Peso final (ABW g)	Desafío	Temp (C°)	OD (mg/L)	pH	Sal %
D1 - 36R	1.21 x 10 ⁹	1.60	3.25	+	28.5	5.7	8.2	35
D2 - 13L	3.00 x 10 ⁸	1.66	3.18		28.4	5.82	8.3	35
D3 - 36Y	1.51 x 10 ⁹	1.61	3.27		28.4	5.25	8.2	36
D4 - MIX	7.56 x 10 ⁸	1.62	3.36		28.2	5.22	8.2	35
C+	Salina	1.64	3.38		28.4	5.63	8.1	35
C-	Salina	1.64	3.38	-	28.4	6.63	8.1	36

Se registró una temperatura de 28-30°C en la sala, y se mantuvo un fotoperíodo de 12 h con luz/oscuridad.

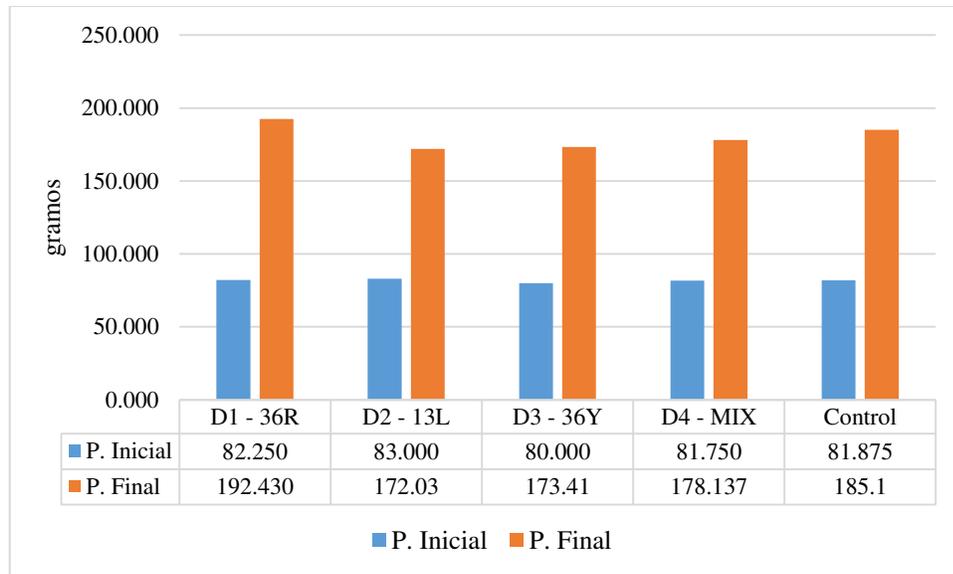


Figura 25. En la biomasa inicial y final de los tratamientos no se observan diferencias significativas, ANOVA ($p>0.05$).

Antes del desafío se tomaron muestras de hemolinfa de los camarones con tratamiento y se realizó el conteo total de hemocitos (CTH). En conteos, los hemocitos hialinos, granulares y CTH no se presentaron diferencias significativas ANOVA ($p>0.05$).

Tabla 14. Promedio (\pm S.E.) de conteo de hemocitos hialinos, granulares y total (CTH), y porcentaje relativo de células hialinas y granulares en camarón blanco después de alimentarse por 28 días.

Tratamiento	Hemocitos ($\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$)			Porcentaje (%)	
	Hialinos	Granulares	CTH	H/CTH	G/CTH
D1 - 36R	189.5 \pm 17.37 ^{ab}	102.10 \pm 20.60 ^b	291.60 \pm 16.66 ^{ab}	64.99	35.01
D2 - 13L	212.6 \pm 13.42 ^{ab}	52.90 \pm 4.17 ^a	265.50 \pm 17.49 ^{ab}	80.08	19.92
D3 - 36Y	167.1 \pm 6.61 ^a	100.80 \pm 19.44 ^{ab}	267.90 \pm 13.30 ^{ab}	62.37	37.63
D4 - MIX	230.5 \pm 33.90 ^b	84.70 \pm 20.54 ^{ab}	315.20 \pm 21.80 ^b	73.13	26.87
Control	173.6 \pm 15.38 ^{ab}	71.40 \pm 5.24 ^{ab}	245.00 \pm 13.19 ^a	70.86	29.14

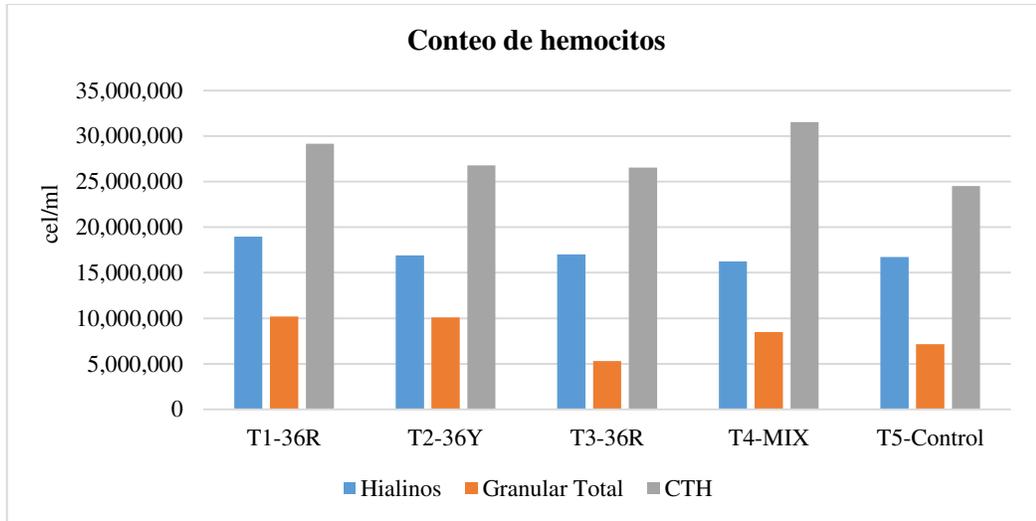


Figura 26. En recuento de hemocitos no hay diferencia significativa ANOVA ($p > 0.05$).

Después de agregar el inóculo de *V. parahaemolyticus* AHPND a los tratamientos, se registró la mortalidad cada hora y se graficó la sobrevivencia a través del tiempo. Durante las primeras 8 horas comenzó la mortalidad y se detuvo el bioensayo a las 48 h.

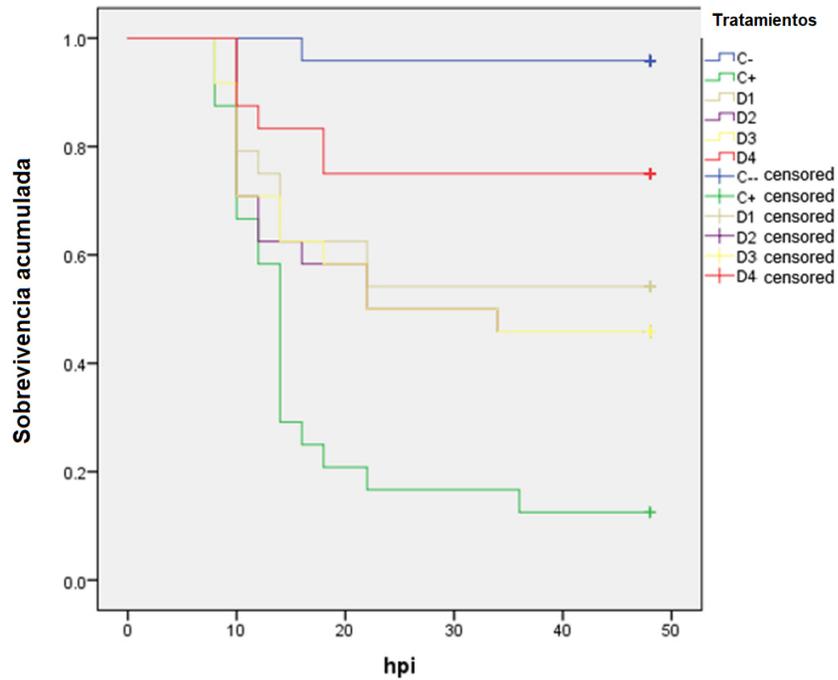


Figura 27. Después de 48 de desafío se muestra el gráfico de sobrevivencia por Kaplan Meier.

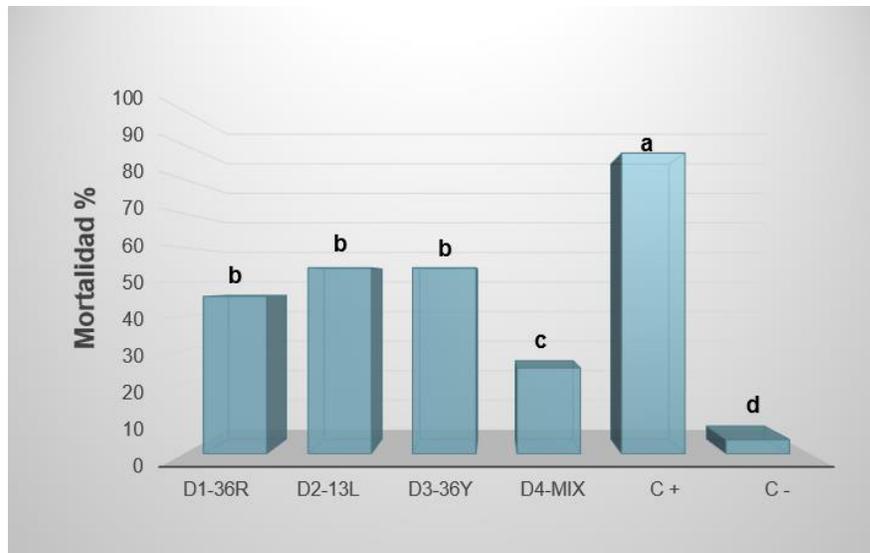


Figura 28. Los tratamientos con aditivo bacteriano presentaron diferencia significativa ANOVA ($p < 0.05$), con respecto a los grupos control.

A partir de bacteriología de hepatopáncreas de los organismos moribundos, se realizó el patógeno en placas de TCBS. Las bacterias recuperadas de los diferentes tratamientos se sembraron en ChromAGAR Vibrio y TSA para confirmar características fenotípicas y bioquímicas, además de extraer ADN para PCR-tiempo real. Se analizaron muestras de todos los tratamientos, incluyendo la cepa patógena *V. parahaemolyticus* (MC32) utilizada para el desafío. Las reacciones positivas amplificaron a partir de los 12 ciclos.

Tabla 15. Relación de muestras analizadas por PCR tiempo real.

Muestra	C+ Rx	C- Rx	MC32	D1	D2	D3	D4	C+	C-
Resultado	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Los signos histopatológicos de AHPND se observaron en los organismos moribundos colectados. En tratamientos desafiados se reportaron daños como: destrucción de células epiteliales y túbulos hepatopancreáticos, disposición anormal de túbulos, infiltración hemocítica, presencia de bacterias dentro de túbulos hepatopancreáticos. Mientras que en (C-) los túbulos hepatopancreáticos permanecieron intactos, se reportó disposición normal de células y túbulos (Figura 28).

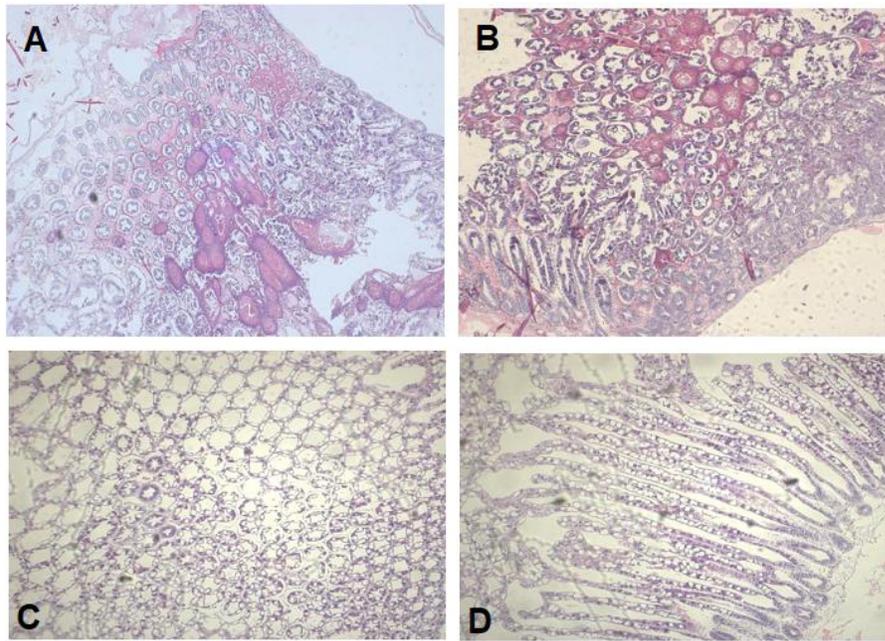


Figura 29. Lesiones en túbulo hepatopancreático, deterioro de células e infiltración hemocítica (A) D1 y (B) C+. En contraste con ausencia de lesiones en hepatopáncreas (C y D) C-.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las bacterias marinas antagonistas al patógeno *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND) designadas como 36R, 42, 13L, 36Y y 02Y; corresponden a *Bacillus pumilus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus safensis*, *Pseudoalteromonas piscicida* y *P. piscicida* respectivamente.

En las pruebas de antagonismo *in vitro*, el género *Bacillus* mostró un mejor rendimiento en medios sólidos, mientras que el género *Pseudoalteromonas* presentó mayor actividad antimicrobiana en medio líquido (suspensión). Las diferentes pruebas de antagonismo que se pueden realizar *in vitro*, pueden tener resultados diferentes debido a las matrices utilizadas (sólidas o líquidas); también se involucra las propiedades motrices y fisiológicas de las bacterias o compuestos involucrados en las pruebas (Chanda y Dave, 2009).

Liu *et al.*, 2015 reporta el aislamiento de *Bacillus pumilus* y *Bacillus mojavenensis* los cuales demostraron actividad antimicrobiana *in vitro* contra *V. parahaemolyticus*. Ambas cepas producen actividad enzimática hidrolítica y antagonismo a más de una bacteria *in vitro*, lo cual indica que estas dos cepas tienen un amplio espectro de aplicación como probióticos en acuicultura. Interaminense *et al.*, 2018 encuentra en *Bacillus subtilis* propiedades antagónicas contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* y lo utilizan a manera de aditivo en alimento ayudando a mejorar el crecimiento y estado sanitario de los organismos. Richards *et al.*, 2015 reporta el aislamiento de *Pseudoalteromonas piscicida* de agua marina y mediante evaluaciones antimicrobianas presenta resultados favorables contra *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Photobacterium damsela* y *Shewanella algae*. Esto se debe a dos mecanismos descritos, que involucran la competencia y la secreción de antimicrobianos. Las especies reportadas en el presente proyecto concuerdan con las características antagónicas, y producción de enzimas descritas por los autores mencionados.

Los extractos crudos de las cepas 36R, 13L y 36Y a base de etil acetato, demostraron un efecto antimicrobiano *in vitro* contra *V. parahaemolyticus*, *V. fischeri*, y la cepa

reportera *Chromobacterium violaceum*. Los tres extractos disminuyeron la formación de biofilm de *V. parahaemolyticus*. Esto indica que los compuestos crudos presentan actividad contra factores de virulencia de *Vibrio*, como la producción de biofilm y/o el mecanismo de expresión Quorum Sensing. Los géneros de *Bacillus* y *Pseudoalteromonas* han sido reportados por evaluaciones en extractos crudos y han demostrado capacidad antimicrobiana, antiviral, y silenciadora del mecanismo de Quorum Sensing, mediante AHL Lactonasas, En *Pseudoalteromonas* se han purificado fracciones de extractos revelando nuevos compuestos con aplicaciones médicas e industriales (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005; Franks *et al.*, 2006; Hayashida-Soiza *et al.*, 2008; Mani *et al.*, 2012).

A través del ensamble *de novo* y las diferentes herramientas de bioinformática se logró generar la reconstrucción de genomas de alta calidad de las cepas 36R, 13L y 36Y.

Mediante la anotación funcional de genes biosintéticos implicados en la síntesis de metabolitos secundarios y antimicrobianos, se identificó que las cepas 36R y 13L (*Bacillus*) producen: lantipeptidos (péptido ribosomal), bacteriocinas, bacitracinas (polipéptidos), péptidos antibacterianos de síntesis ribosomal y microcinas (péptidos cíclicos). La cepa 36Y *P. piscicida*: lantipeptidos, cumarinas, bacteriocinas, péptidos antibacterianos de síntesis ribosomal, marinocina y colicina (antibiótico). Estas biomoléculas sugieren ser responsables del antagonismo a *V. parahaemolyticus* AHPND en las evaluaciones del presente estudio. La mayoría de los antimicrobianos son de naturaleza peptídica, siendo algunos de configuración cíclica, que los hace estructuralmente más estables (Franks *et al.*, 2005). La actividad antimicrobiana de las diferentes biomoléculas reportadas se basa en actividad citotóxica, alteraciones en paredes celulares, sustracción de nutrientes, modificaciones de pH, toxinas, etc (Moffitt y Neilan, 2000).

El gen PKS detectado en AntiSMASH concuerda con el reportado mediante la reacción de PCR con los primers degenerados. Las cepas 36R y 13L no lo expresaron en PCR, sin embargo se encontraron híbridos PKS/NRPS o PKS tipo 3. Se detectó una gran cantidad

de grupos de genes biosintéticos, y esto en parte se debe a que como los genomas ensamblados no están cerrados, hay regiones abiertas que podrían no ser reconocidas adecuadamente por los programas de anotaciones.

Se detectaron genes biosintéticos de compuestos aún no identificados y que podrían representar nuevos bioactivos. La secuenciación de genomas de bacterias de interés en acuicultura nos da mayor perspectiva de la acción que ejercen como agente probiótico. Existen pocos reportes de genomas completos de *Pseudoalteromonas piscicida*, y el presentado en este proyecto y publicación (sometido) es el primer reporte en México.

El medio marino nos brinda una fuente de microorganismos y metabolitos con aplicaciones biotecnológicas en la camaronicultura. Estos metabolitos bioactivos se pueden usar como drogas o templados para diseñar nuevos compuestos terapéuticos (Proksch, 2002).

Las dietas con aditivos bacterianos incrementaron la resistencia del camarón contra la cepa patógena *V. parahaemolyticus* AHPND, mejorando la sobrevivencia a nivel experimental. Sin embargo, la mezcla de *Bacillus* (36R y 13L; 7.56×10^8 UFC g⁻¹ de alimento) confirió mayor sobrevivencia comparada con el grupo control. El uso de *Bacillus* como probiótico en acuicultura ha sido ampliamente reportado como aditivo en alimento, trayendo mejoras en crecimiento y respuesta inmune en camarón durante evaluaciones (Gullian *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2009; Pham *et al.*, 2014; Interaminense *et al.*, 2018).

Las cepas 36R *B. pumilus*, 13L *B. safensis* y 36Y *P. piscicida* demostraron ser un potencial probiótico para su aplicación en cultivos de camarón, sin embargo se requiere un mayor estudio. Se concluye que en el proyecto se afirma la hipótesis, en donde a partir de microbiota marina se encontraron bacterias con potencial probiótico, capaces de sintetizar antimicrobianos, y las cuales al utilizarse como aditivo en alimento generaron un efecto benéfico en camarón desafiado con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* (AHPND).

PERSPECTIVAS

Se sugiere continuar con evaluaciones de las cepas probióticas bajo diferentes esquemas: dosis en alimento, consorcios, bioensayos nutricionales (crecimiento), medición de expresión de genes del sistema inmune, colonización intestinal, etc.

Escalamiento para producción de bacterias en biorreactores adaptados a los modelos de producción acuícola. Realizar pruebas a nivel piloto en campo (larvarios, maternidades o estanques de engorda).

Continuar con análisis de bioinformática y minería de las secuencias genómicas para revelar nuevas características genéticas. Caracterizar los bioactivos de los extractos con potencial acuícola o industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, I.G., Shamsudin, M.N. and Shariff, M. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fis.Sci.* 2: 93-108.
- Andrade TPD, Srisuvan T, Tang, KFJ, Lightner DV. 2007. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*. 264: 9–15.
- Aranguren FL, Tang KF, Lightner DV. 2010. Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*. 307: 187–192.
- Arunkumar Mani, Sheikabdulla Shahul Hameed, Sivakumar Ramalingam and Mahesh Narayanan. 2012. Assessment of Quorum Quenching Activity of *Bacillus* Species Against *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297. *Global Journal of Pharmacology* 6 (2): 118-125, 2012
- Avendaño-Herrera, R., M. Lody, y C.E. Riquelme. 2005. Production of inhibitory substances among bacterial biofilms on marine substrates. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40:117–125.
- Beaz-Hidalgo R. 2008. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja, caracterización y patogénesis. Universidad de Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. ISBN 978 – 84 – 9887 – 102 – 9.
- Bell TA, Lightner DV. 1988. A handbook of normal shrimp histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Berger C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. Asociación Langostina Peruana (ALPE). 102-110.
- Berridge B.R., Fuller J.D., Azavedo J., Low D.E., Bercovier H., Frelie P.R. 1998. Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. *J Clin Microbiol* 36: 2778–2781.
- Bilio M., Coze A.S., Hernandez-Portocarrero A. 1999. Mangroves shrimp and the development of coastal areas in Central America. *EC Fisheries Bulletin*. 12 (4): 20-22.
- Boonyaratpalin M, New MB 1993. On-farm feed preparation and feeding strategies for marine shrimp and freshwater prawns, p. 120-134. In M.B.New, A.G.J.Tacon and I. Csavas (eds.) *Farm-made aquafeeds*. Proceedings of the FAO/AADCP Regional Expert Consultation on Farm-Made Aquafeeds, 14-18 December 1992, Bangkok, Thailand.

- Cabello F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8(7):1137–1144.
- Chanda S., Dave R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: an overview. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3 (13) (2009), pp. 981-996
- CESASIN (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa) 2012. “Sinaloa líder de producción de camarón de cultivo en México”. Comunicado en *Revista Industria Acuícola*. Vol 8, No. 5, pp 16-22.
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca). 2010. Anuario Estadístico 2010 “Producción de Camarón en Peso Desembarcado por Acuicultura 2010 [en línea]. <http://contenido.com.mx/2011/03/sonora-lider-en-captura-de-sardina-calamar-y-cultivo-de-camaron/>. [Consulta: 20 de Noviembre del 2013].
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca). 2013. Seguimiento Mensual de la Producción de Camarón 2013 [en línea]. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/seguimiento_mensual_de_la_produccion_de_camaron_20. [Consulta: 9 de Mayo del 2014].
- COSAES (Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora). 2013. Alerta Epidemiológica, Boletín informativo 01/2013. [en línea]. <http://www.cosaes.com/>. [Consulta: Noviembre del 2013].
- COSAES (Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora). 2013. “Cae 84% Acuicultura en Sonora” Entrevista a Reyes Eugenio Molina Moreno en portal de la revista *Panorama Acuícola*. [en línea]. http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2013/11/20/cae_acuicultura_84_en_sonora.html. [Consulta: 10 de Mayo de 2014].
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacterial antibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Current Protein and Peptide Science*. 6: 61-75.
- Coutteau P., Goossens T. 2013. Novel additives to reduce the economic impact of disease on shrimp production. *International Aquafeed*. January February 2013 pp. 28-32.
- Dopazo CP, Lemos ML, Bolinches J, Barja JL, Toranzo AE. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J Appl Bacteriol*. 65: 97-101.
- Drake SL, DePaola A, Jaykus LA. 2007. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Com. Rev. Food Sci. and Food Safety*. 6: 120-144.
- Dykes GA, Hastings JW. 1997. Selection and fitness in bacteriocin producing bacteria. *Proc. Royal Soc, London*. 264: 683-687.

- Espinoza-Valles I., Soto-Rodríguez S., Edwards R.A., Wang Z., Vora G.J., Gómez-Gil B. 2012. Draft Genome Sequence of the Shrimp Pathogen *Vibrio harveyi* CAIM 1792. *J. Bacteriol.* p. 2104.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2010: El Estado Mundial de la Pesca y La Acuicultura [en línea]. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf>. [Consulta: 20 de Marzo del 2010].
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013: Culprit behind massive shrimp die-offs in Asia unmasked. [en línea]. www.fao.org/news/story/en/item/175416/icode/. [Consulta: 5 de Agosto del 2013].
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2013: Perspectivas Alimentarias (Resúmenes de Mercado) [en línea]. <http://www.fao.org/docrep/019/i3473s/i3473s.pdf> [Consulta: 9 de Mayo del 2014].
- Faye T, Holo H, Langsrud T, Nes IF, Brede DA. 2011. The unconventional antimicrobial peptides of the classical propionibacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 89: 549-554.
- Feltham R.K.A., Power A.K., Pell P.A., Sneath P.H.A. 1978. A simple method for storage of bacteria at -76°C. *Journal of Applied Bacteriology* 44:313–316.
- FIRA. 2009. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura, Boletín Informativo Situación Actual y Perspectivas del Camarón en México. Num. 3. pp 27 -35.
- Flegel TW. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258: 1-33.
- Flegel T., Loh C.F., Vatanakul U. 2013. Researchs release free information on AHPND Detecion. *Shrimp News International*, 2013. <http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/NewsReportsFolder/ThailandTaiwanFreeEMStests.html>
- Flegel TW. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia, *Journal of Invertebrate Pathology.* 110: 166-173, ISSN 0022-2011.
- Fujino T. 1974. Discovery of *Vibrio parahaemolyticus*. In: International Symposium of *Vibrio parahaemolyticus*. Fujino, T., G. Sakaguchi, R Sakazaki, *et al.* (eds.), Saikon, Tokyo, pp.1-4.
- Franks, A., P. Haywood, C. Holmström, S. Egan, S. Kjelleberg, and N. Kumar. 2005 Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules* 10: 1286-1291.

- Franks, A., Egan, S., Holmström, C., James, S., Lappin-Scott, H. and Kjelleberg, S. 2006. Inhibition of fungal colonization by *Pseudoalteromonas tunicata* provides a competitive advantage during surface colonization. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6079–6087.
- Galaviz-Silva L; Molina-Garza ZJ, Alcocer JM , Rosales-Encinas JL. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture* 242. 53–68.
- García B.M. 2001. *Vadamecum veterinario IPE*. Editorial Imprelibros. Colombia 3ra. Edición. ISBN: 968-6779-25-6.
- Gómez-Gil B, Tron-Mayen L, Roque A, Turnbull JF, Inglis V., Guerra-Flores AL. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 163, 1–9.
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, Lozano R, Betancourt-Lozano M. 2014. Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.* 2(2):e00055-14. doi:10.1128/genomeA.00055-14.
- González-Galaviz JR, Rodríguez-Anaya LZ, Molina-Garza ZJ, Ibarra-Gámez J., L. Galaviz-Silva. 2013. Genotyping of white spot syndrome virus on wild and farm crustaceans from Sonora, Mexico. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*. 65: 945-947.
- Goarant C, Reynaud Y, Ansquer D, de Deckera S, Saulnierb D, le Roux F. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology*. 29: 570-580.
- Guo, J.-J., K.-F. Liu, S.-H. Cheng, C.-I. Chang, J.-J. Lay, Y.-O. Hsu, J.-Y. Yang, and T.-I. Chen. 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquacult. Res.* 40:609–618.
- Gullian, M., F. Thompson, and J. Rodriguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquacult.* 233:1–14
- Haldar S, Chatterjee S, Asakura M, Vijayakumaran M, Shinji Y. 2007. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (Non-O1 and O139) from moribund shrimp (*Penaeus monodon*) and experimental challenge study against post larvae and juveniles. *Annals of Microbiology*. 57: 55-60.
- Hayashida-Soiza G., A. Uchida., N. Mori., Y. Kuwahara., Y. Ishida. 2008. Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine

- bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1672-1677.
- Hernández, G, Olmos J. 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 722–727.
- Holt JG, Krieg NR, Sheath, PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Hosseini H., Cheraghali M.A., Yalfani R., Razavilar V. 2004. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food Control* 15:187–190.
- IAES-SEDEPRO. 2001. Directorio Estatal de Acuicultores. 2001. Hermosillo, Sonora, México. pp.42.
- Jiang LX, Pan LQ, Fang B. 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology.* 18, 185–188.
- Jiménez R, Barniol R, de Barniol L, Machuca M. 1999. Infection of IHHN virus in two species of cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997-98. *Aquac. Res.* 30, 695-705.
- Johnson S. K. 1990. *Handbook of Shrimp Diseases*. Texas A&M Sea Grant College Program. Galveston, Texas.
- Jones D., Pell P.A., Sneath P.H.A. 1991. Maintenance of bacteria on glass beads at -60°C to -76°C. In *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: A Manual of Laboratory Methods*, 2nd edition, p. 45-50. Edited by B.E. Kirsop and A.E. Doyle. London: Academic Press.
- Kamat T, Kerkar S. 2011. Bacteria from salt pans: a potential resource of antibacterial metabolites. *Recent Res. Sci. Technol.* 3: 46–52.
- Kruskal, W.H., y W.A. Wallis. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47:583–621.
- Leyton Y, Borquez J, Darias J, Cueto M, Días A, Riquelme C. 2012. Diketopiperazines produced by an *Bacillus* species inhibits *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Aquacult Res. Dev.* 3: 144. Doi 10.4.4172/2155-9546.1000144.
- Leyton Y, Riquelme YC. 2010. Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (common name “Loco”) have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Ecol.* 60:599–605.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey (ed.) *CRC Handbook of Mariculture*, Second edition, Volume 1, Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. p. 393-486.

- Lightner DV. 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. 15: 579-601.
- Lightner DV. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured Penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA
- Lightner D.V., Redman R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164: 201–220.
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, Noble BL, Tran LH. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Glob Aquacult Advocate* Jan/Feb 2012: 40.
- Mahoney J, Gerding M, Jones S, Whistler C. 2010. Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (22): 7459-7465.
- Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., Wade W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR Primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 795-799.
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47: 469–474.
- Matsuda S, Kodama T, Okada N, Okayama K, Honda T, Iida T. 2010. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipids rafts in essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infection and Immunity*. 78: 603-610.
- Meador EC, Parsons MM, Bopp CA, Gerner-Smidt P, Painter JA, Vora GJ. 2007. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*. 45: 1133–1139.
- Molina-Garza ZJ, Galaviz-Silva L, Rosales-Encinas JL, Alcocer-González JM. 2008. Nucleotide sequence variations of the major structural proteins (VP15, VP19, VP26 and VP28) of white spot syndrome virus (WSSV), a pathogen of cultured *Litopenaeus vannamei* in Mexico. *Journal of Fish Diseases*. 31: 197–203.
- Molinski TF, 1993. Marine pyridoacridine alkaloids: structure, synthesis, and biological chemistry. *Chem. Rev*. 93: 1825–1838.
- Morales Q.V., Cuellar-Anjel J. 2008. Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Panamá.
- Moffitt, M. C. and B. A. Neilan. 2000 The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiol. Lett*. 191: 159-167

- Naylor R, Burke M. 2005. Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea. *Annu. Rev. Env. Resour.* 30, 185-218.
- Noorlis A, Ghazali F, Cheah Y, Zainazor T, Wong W, Tunung R, Pui C, Nishibuchi M, Nakaguchi Y, Son R. 2011. Antibiotic resistance and biosafety of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater fish at retail level. *International Food Research Journal.* 18: 1523-1530.
- Noriega-Orozco L., Acedo-Félix E., Higuera-Ciapara I., Jiménez-Flores R., Cano R. 2007. Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. *Rev Latinoam Microbiol;* 49 (3-4). pp. 60-67.
- Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I (2001) Bacteriological study of shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius hatcheries in India. *J Appl Ichthyol* 17: 59-63
- Pedroche F.F., Silva P.C., Aguilar L.E., Dreckman K.M., Aguilar R. 2005. *Catálogo de las Algas Marinas Bentónicas del Pacífico de México, I. Clorophycota.* UABC, UAM, UCB, México. Editorial Universitaria, 1er Edición.
- Pfeffer C. S., Hite F.M., Oliver J.D. 2003. Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3526–3531.
- Pham D., Ansquera D., Chevaliera A., Daugaa C., Peyramalea A., Wabetea N., Labreucheb Y. 2014. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture*, Volume 432, 475–482.
- Pinheiro ACAS, Lima APS, de Souza ME, Neto ECL, Adriaio M, Goncalves VSP, Coimbra MRM. 2007. Epidemiological status of Taura syndrome and infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). *Aquaculture.* 262: 17-22.
- Prior S, Browdly CL, Shepard EF, Laramore R, Parnell PG. 2003. Controlled bioassay system for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.* 54: 89-96.
- Proksch P, Edrada RA, Ebel R. 2002. Drugs from the seas current status and microbiological implications. *Appl. Microbial Biotechnol.* 59: 125–134.
- Quiroz Guzmán E. 2005. Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*. Tesis de Maestría, México: Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz B.C., México. <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/14427>
- Rahman S, Khan SN, Naser N, Manjurul. M. 2010. Isolation of *Vibrio* spp. from penaeid shrimp hatcheries and coastal waters of Cox's Bazar, Bangladesh. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 1: 288 – 293.

- Reantaso MB, Gómez Gil B. 2013. Early Mortality Syndrome (EMS) in Shrimp. Tercer Foro Económico de Pesca y Acuicultura. SAGARPA, CONAPESCA. Nov. 25 y 26, 2013. México.
- Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall RA, Roberfroid MB, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 37:105–118.
- Roque A., Molina-Aja A, Bolan-Mejía C., Gómez-Gil B. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17 (2001) 383–387.
- Sabatini, P. & O’Sullivan G. 2004. Shrimp commodity update. FAO/Globefish. Roma, Italia. pp. 83.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2011. Comunicado de Prensa “Impulsaran La Pesca y Acuicultura en Sonora”. Num. 106/11. México, D.F., 05 de Marzo de 2011. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2011/marzo/Documents/2011B106.pdf>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria). 2013. Alerta Epidemiológica. (<http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=25642&IdUrl=61688&down=true>).
- Selvin J., Manilal A., Sujith S., Kiran G.S., Lipton A.P. 2011. Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(2): 197-204.
- Soto-Rodríguez S., Gómez-Gil B., Lozano R. 2010a. “Bright-red Syndrome in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*”. *Dis. Aquat. Org.* 92, pp. 11–19.
- Soto-Rodríguez S., Gómez-Gil B, Lozano R. 2010b. Density of *Vibrios* in hemolymph and hepatopancreas of diseased pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Northwestern Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society.* 4: 76-83.
- Sousa A, Macrae A, Menezes FGR, Gomes NCM, Vieira RHSF, Mendonça-Hagler LCS. 2006. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. *Marine Pollution Bulletin.* 52:1725-1734.
- Tran L; Nunan R, Redman M, Mohny L L, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105: 45–55.

- Unzueta-Bustamante ML, Silveira-Cofficny R, Prieto AA, Aguirre-Guzmán G, Vázquez-Juárez R. 2004. Susceptibility of *Litopenaeus schmitti* and *Cherax quadricarinatus* to white spot syndrome virus (WSSV). *Cienc.Mar.* 30: 537-545.
- Vandenbergh, J., Thompson, F.L., Gomez-Gill, B., Swings, J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219:9-20.
- Valderrama, D. & Anderson, J.L. 2011. Shrimp production survey. GOAL 2011, Santiago, Chile.
- Velmurugan S, Raman K, Thanga V, Viji MBS, Donio J, Adlin J, Babu MM, Citarasu T. 2013. Screening and characterization of antimicrobial secondary metabolites from *Halomonas salifodinae* MPM-TC and its in vivo antiviral influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against WSSV challenge. *J. Of King Saud University-Science.* 25: 181-190.
- Villarreal-Gómez L.J., Soria-Mercado I.E., Guerra-Rivas G., Ayala-Sánchez N.E. 2010. Actividad Anticancerígena y Antibacteriana de Macroalgas y Bacterias Asociadas a su Superficie. *Revista de Biología Marina y Oceanografía.* Agosto Vol. 45, N°2: 267-275.
- Vincent AG, Lotz JM. 2007. Advances in research of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHP-B) affecting penaeid shrimp aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 15: 63-73.
- Zar, J. 1994. *Biostatistical Analysis*, Prentice-Hall, New York, USA.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Liu XF, Li Y, Li JR, Cai LY, Li XX, Chen JR, Lyu SX. 2015. Isolation and characterisation of *Bacillus spp.* antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015 May;31(5):795-803. doi: 10.1007/s11274-015-1833-2.
- Interaminense J.A. Joana L.V., Carolina K. Gouveia Rogério W.S. Portela, José P. Oliveira Humber A.Andrade. Sílvio M.Peixoto Roberta B.Soaes. Diego S.Buarque Ranilson S.Bezerra *In vitro* and *in vivo* potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. *Aquaculture* 488, 10 March 2018, Pages 114-122
- Richards GP, Watson MA, Needleman DS, Uknalis J, Boyd EF, Fay JP. 2017. Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-induced killing of vibrios and other bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 83:e00175-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00175-17>.

- Ayuso-Sacido A., Genilloud O. 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49 (1):10–24. doi: 10.1007/s00248-004-0249-6
- Balouiri M., Sadiki M., Koraichi Ibsouda S. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Baron E.J., Peterson L.R., Finegold S.M. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed., p. 415. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, MO.
- Bekir K., Haddad O., Grissa M., Chaieb K., Bakhrouf A., Ibrahim Elgarssdi S. 2011. Molecular detection of adhesins genes and biofilm formation in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(23), pp. 4908-4917.
- Bell TA, Lightner DV. 1988. *A handbook of normal shrimp histology*. Special publication no. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge LA.
- Bowman S., Roffey P., McNevin D., Gahan M.E. 2016. Evaluation of commercial DNA extraction methods for biosecurity applications. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 48: 407-420. <https://doi.org/10.1080/00450618.2015.1106585>
- Chen W., Hann Ng T., Wu J., Chen J., Wang H. 2017. Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *SCIENTIFIC REPORTS*, 7: 9395. DOI:10.1038/s41598-017-09923-6
- Cuervo, J. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carreara de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá - Colombia. pp. 28.
- Darling A.C.E., Mau B., Blattner F.R., Perna N.T. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* 14: 1394-1403.
- Doetsch, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy. In P. Gerhardt (ed.), *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C p.21–33.
- Douillet, P. and Langdon, C. J. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119: 25-40. 1994.

- Douillet, P. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture* 183: 241-248.
- Ewing B., Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, 8 (3), 186-194.
- Gatesoupe F.J. (1994). Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquat. Living Resour.*, 7: 277–282.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.
- Gibson, L. F., Woodworth, J. and George, A. M. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, (*Crassostrea gigas*), when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169: 111-120.
- Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.-N. 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture handbook no. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sheath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Joshi J, Srisala J, Truong VH, Chend TI, Nuangsaenge B, Suthienkul O, Lo CF, Flegel TW, Sritunyalucksana K, Thitamadee S. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture* 428-429:297–302. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.03.030.
- Kannahi M., Eshwari N.T. 2016. Extraction, Purification and Antibacterial Activity of Bioactive Compounds from Marine *Bacillus* Species, *Int. J. Pure App. Biosci.* 4(4): 244-254. doi: <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.2323>
- Khanjani M.H., Sajjadi M.M., Alizadeh M., Sourinejad I. 2016. Study on nursery growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) under different feeding levels in zero water exchange system. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 15(4) 1465-1484.
- Kautsky, N., Ronnback, P., Tedengren, M. y Troell, M. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191: 145-161.

- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger Ddatasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Lealem F. Gashe B. 1994. Amylase production by a Grampositive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *J. Appl. Bacteriol.* 77 : 348–352.
- Leyton Y, Borquez J, Darias J, Cueto M, Días A, Riquelme C. 2012. Diketoppiperazines produced by an *Bacillus* species inhibits *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Aquacult Res. Dev.* 3: 144. Doi 10.4.4172/2155-9546.1000144.
- Li Z., Chen Y., Mu D., Yuan J., Shi Y., Zhang H., Gan J., Li N., Hu X., Liu B., Yang B., Fan W. 2012. Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap-layout-consensus and de-bruijn-graph. *Brief Funct Genomics*, 11(1):25-37. doi: 10.1093/bfgp/elr035.
- Matsheka M.I., Lastovica A.J., Zappe H., Elisha B.G. 2005. The use of (GTG)₅ oligonucleotide as an RAPD primer to type *Campylobacter concisus*. *Letters in Applied Microbiology* 42: 600-605.
- Manilal A., Selvin J., Sugathan S., Panikkar M.V.N. 2011. Evaluation of therapeutic efficacy of Indian green alga, *Acrosiphonia orientalis* (j. agardh) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon*. *Thalassas An Int. J. Mar. Sci.*, 28 (1): 33-46.
- Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., De Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A., Weber T., Tanako E., Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39: W339-W346.
- Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42: D206 –D214.
- Perumal S., Pillai S., Cai L.W., Mahmud R., Ramanathan S. 2012. Determination of minimum inhibitory concentration of *Euphorbia hirta* (L.) extracts by tetrazolium microplate assay. *Journal of Natural Products*, 5(2).

- Pettersson, B., Lembke F., Hammer P., Stackebrandt E., Priest F. 1996. *Bacillus sporothemodurans*, a New Species Producing Heat-Resistant Endospores. *Int. Journ. System. Bact.* 46 (3): 759-764.
- Purivirojkul W. 2013. Application of Probiotic Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria in Fairy Shrimp *Branchinella thailandensis* culture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 187-196.
- Rivas R., Velázquez E., Zurdo-Piñeiro J.L., Mateos P.F., Martínez Molina E. 2004. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *Journal of Microbiological Methods* 56, 413– 426.
- Sánchez T., León J., Woolcott J., Arauco K. 2004. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Rev. Peru. Biol.* 11(2): 179-186.
- Sánchez-Ortiz A.C., Angulo C., Luna-González A., Álvarez-Ruiz P., Mazón-Suástegui J.M., Campa-Córdova Á.I. 2016. Effect of mixed-*Bacillus spp* isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*; 59:95-102. doi: 10.1016/j.fsi.2016.10.022.
- Schirmer A., Gadkari R., Reeves C.D., Ibrahim F., DeLong E.F., Hutchinson C.R. 2005. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Applied and Environmental Microbiology*; 71 (8):4840–9. doi: 10.1128/AEM.71.8.4840-4849.2005
- Schmieder R., Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27: 863– 864.
- Sirikharin R., Taengchaiyaphum S., Sritunyalucksana K., Thitamadee S., Flegel T.W., Mavichak R. 2014. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030&title=new-pcr-detection-method-for-ahpnd.
- Song Y., Yu C., Lien T., Huang C., Lin M. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome Virus. *Fish & Shellfish Immunology* 14, 317–33. doi:10.1006/fsim.2002.0440
- Soto-Rodríguez S.A., Gómez-Gil B., Lozano-Olvera R., Betancourt-Lozano M., Morales-Covarrubias M.S. 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 81(5): 1689–1699. doi: 10.1128/AEM.03610-14
- Sugathan S., Manilal A., Selvin J. 2014. Development of a probiotic for the management of shrimp Vibriosis. *Scholars' Press*, pp. 96-98.
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Metian, M. 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 564*. FAO. 87 pp.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohney LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 105:45–55. doi:10.3354/dao02621.
- Tukappa A. & Londonkar R.L. 2013. Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of Different Methanol Extract of *Rumex vesicarius*. L. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 3: 72-83. doi:10.3923/ajdd.2013.72.83
- Valgas C., De Souza S.M., Smânia E.F.A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, *Braz. J. Microbiol.* 38, 369–380.
- Velmurugan S, Raman K, Thanga V, Viji MBS, Donio J, Adlin J, Babu MM, Citarasu T. 2013. Screening and characterization of antimicrobial secondary metabolites from *Halomonas salifodinae* MPM-TC and its in vivo antiviral influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against WSSV challenge. *J. Of King Saud University-Science.* 25: 181-190.
- Vera A., Alvarez R., Murano E., Slebe J.C., Leon O. Identification of a marine *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase, *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64, 4378-4383.
- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F. J. Lupski J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Cell Biology* 5: 25-40.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology Molecular. Biology. Rev.* 64:655-671. 2000.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Ricardo Sánchez Díaz

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Nutrición y Tecnología de Alimentos para
Organismos Acuáticos

Tesis: EVALUACIÓN DE BACTERIAS MARINAS Y SU POTENCIAL USO COMO ADITIVO EN ALIMENTO Y/O AGENTE PROBIÓTICO CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*, AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND) EN CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Campo de Estudio: Biotecnología marina. Sanidad Acuícola.

Datos personales: Nacido el 14 de Agosto de 1985 en la Ciudad de México, hijo de Margarita T. Díaz Márquez y Sergio Sánchez Rodríguez.

Educación: egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo el título de Biólogo en 2008. Obtención de grado de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales por el Instituto Tecnológico de Sonora en 2012.

Experiencia Profesional: Encargado de Laboratorio de Patología en Granja Acuícola Costa Rica S.A. de C.V. de Marzo 2012 a Diciembre 2013, Cd. Obregón, Sonora. Traductor y colaborador en la publicación Industria Acuícola desde Noviembre 2010 a la fecha, Cd. Obregón, Sonora. Auxiliar académico y asistente de investigación en el Laboratorio de Análisis de Sanidad Acuícola del Instituto Tecnológico de Sonora desde 2017.

PUBLICACIÓN

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Global Antimicrobial Resistance

Manuscript Draft; Manuscript Number:

Title: Draft Genome Sequence of *Pseudoalteromonas piscicida* Strain 36Y RITHPW, an Hypersaline Seawater Isolate from the South Coast of Sonora, Mexico

Article Type: Genome note

Keywords: *Pseudoalteromonas piscicida*, Hypersaline strain, Genome sequencing, Antimicrobial compounds, AHPND, shrimp culture

Corresponding Author: Dr. Lucio Galaviz-Silva,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Ricardo Sánchez-Díaz

Order of Authors: Ricardo Sánchez-Díaz; Zinnia J Molina-Garza; Lucia E Cruz-Suárez, PhD; Joseph Selvin; George S Kiran; Jose C Ibarra-Gómez; Bruno Gómez-Gil; Lucio Galaviz-Silva

Abstract:

Objectives

The aim of this study was to report the first draft genome sequence of *Pseudoalteromonas piscicida* strain 36Y RITHPW, a marine gammaproteobacteria that synthesize bioactive compounds with antagonistic activity against *Vibrio parahaemolyticus*, a multidrug resistant strain, causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), reported in shrimp farm outbreaks from Asia to Mexico with mortalities of 80-100%.

Methods

The genome was sequenced with an Ion Torrent platform (PGM). A total of 606,805 reads were obtained for a 308.48 Mbp and 33.5X coverage. A highquality draft assembly and ordering of contigs were obtained with Mauve. The annotation was obtained with RAST and antiSMASH.

Results

The genome size consists of 5.15 Mbp, 4,587 CDS and a GC content of 43.3%, 4,587 coding sequences, 84 genes involved in resistance to antibiotics, 12 genes involved in bacteriocins and ribosomally synthesized antibacterial peptides.

Conclusions

The mining of this draft genome provide valuable information to explain the antagonistic capacity of *P. piscicida* 36Y RITHPW, an useful strain as potential probiotic in shrimp aquaculture, against the pathogenic *V. parahaemolyticus*.