

Evaluación del antagonismo de microbiota marina contra *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*, patógenos de camarón (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931).

Galaviz-Silva L., Soto Marfileño K., Espinosa-Mata A., Molina-Garza, Z.J.
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Ave Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás De los Garza, Nuevo León. C.P. 66455. México.

RESUMEN

Las enfermedades de etiología bacteriana en *Litopenaeus vannamei* tienen una tendencia a la resistencia a los antibióticos más utilizados, como las tetraciclinas, por lo que nuevas estrategias de control y erradicación de enfermedades son clave para mantener la producción de camarones en México. Se aislaron 12 cepas con capacidad antagonista contra dos cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* y de *Vibrio harveyi*, causantes de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda. También se encontraron tres cepas antagonistas para *V. harveyi*, pero no para *V. parahaemolyticus*. Las especies con mayor actividad antagonista fueron identificadas como *Bacillus safensis* y *Bacillus zhangzhouensis*.

ABSTRACT

Diseases of bacterial etiology in *Litopenaeus vannamei* tend to show resistance to the most widely used antibiotics in aquaculture, such as tetracyclines, so new disease control and eradication strategies are fundamental to maintaining shrimp production in Mexico. Twelve strains with antagonistic ability against two pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*, which cause acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimps, were isolated. We also found 3 antagonist strains for *V. harveyi*, but not for *V. parahaemolyticus*. The species with the highest antagonist activity were identified as *Bacillus safensis* and *Bacillus zhangzhouensis*.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN.

En México, la producción de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se ubica en los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, y Baja California. En el año 2013, los productores calcularon una disminución de hasta un 65% comparado con la producción total del año 2011 (Nunan *et al.*, 2014). En décadas anteriores, la pérdida en producción de camarón blanco en el país se debió a diversas enfermedades en los cultivos, tanto virales, como lo son el virus de la mancha blanca (WSSV), virus del síndrome Taura (TSV), virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), como bacterianas, especialmente por *Vibrio parahaemolyticus*, causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND o Vp_{AHPND}), también conocida como síndrome de muerte temprana (EMS, Han *et al.*, 2015). Esta enfermedad surgió en Asia en el año 2009 y se extendió por el hemisferio occidental; en México se registraron casos en el 2013 y causó mortalidad del 100% en *L. vannamei* (Nunan *et al.*, 2014, Zrriehzahra y Banaederakhshan, 2015).

Cabe mencionar que no todas las cepas de *Vibrio* spp. son causantes de AHPND. La enfermedad esta asociada a cepas que poseen un plásmido pVA1, el cual contiene los genes *pirA* y *pirB* que codifican para toxinas con los mismos nombres VP_{AHPND} y VH_{AHPND}, respectivamente (Trujillo, 2016). Para tratar esta enfermedad en camarones, los antibióticos de primera línea utilizados son las tetraciclinas debido a su actividad de amplio espectro, así como su bajo costo, comparado con otros antibióticos. Sin embargo, su uso extensivo ha modificado de manera natural cepas ahora resistentes a estos, por lo que el diseño de nuevos tratamientos alternos se han convertido en una opción para el control o prevención de enfermedades de origen bacteriano (Han *et al.*, 2015). El propósito de esta

investigación es demostrar la actividad antagónica *in vitro* que pueden exhibir algunas cepas bacterianas de ecosistemas acuáticos marinos en el territorio mexicano contra *Vibrio parahaemolyticus* AHPND y *V. harveyi* AHPND.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se colectaron muestras de tres costas mexicanas con el fin de obtener bacterias antagonistas. Las muestras fueron algas, sedimentos marinos, crustáceos y moluscos en las siguientes locaciones: Bahía de Lobos (27°15'42.0 N, 110°25'34.6 W) y Bahía de Guásimas (27°15'42.0 N, 110°25'34.6 W) en Sonora y Playa del Carmen (20°40'05.3 N, 87°01' 40.7 W) en Quintana Roo. Las muestras obtenidas fueron procesadas, y lo obtenido se inoculó en cajas de Petri con agar soya tripticasa (TSA, Dibco) con NaCl al 2% y agar marino (MA, Becton, Dickinson y compañía). Las colonias bacterianas resultantes fueron seleccionadas para identificación en base a morfología colonial de cada cepa para obtener cultivos axénicos. Se realizaron tinciones de Gram y observaciones en microscopio óptico para identificar la morfología de los microorganismos, y se realizaron pruebas de oxidasa y catalasa. Se realizaron pruebas de actividad antagónica de los aislados obtenidos contra VP_{AHPND} y VH_{AHPND} con el método de estría cruzada (Yan *et al.*, 2003), en la cual con ayuda de un hisopo estéril impregnado con la cepa a evaluar se realizó una estría longitudinal y se incubó por 48 h a 28-32°C; transcurrido este tiempo se limpiaron 3 líneas para en un ángulo de 90°C con hisopos estériles para hacer carriles para evaluar a *V. parahaemolyticus* D74 y *V. harveyi* 9V. La siembra de estos patógenos se realizó como de la misma manera que los aislados a evaluar, y se incubaron las placas por 24 h a 30°C. En caso de observar antagonismo se midieron las zonas de inhibición con un vernier. Posteriormente, se evaluó la actividad antagónica del sobrenadante libre de células bacterianas. Para lo anterior, se recuperaron los sobrenadantes a partir de caldos bacterianos de 24 h por centrifugación (6000 g/10 min/4°C) y se filtraron (5 mm de diámetro, Corning Glass Works, Corning, NY, USA). Se ajustó el pH a 7.2 -7.4 con NaOH 1.0 M y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford a 4 µg/µL para todos los caldos. Después, las células, B patogénicas (D74, Vh y 9V) se inocularon en medio Muller Hinton con hisopo estéril, se realizaron pocillos en el medio (4.5 mm de diámetro), se depositaron 100 µL de los sobrenadantes libres de células y se incubaron 24 h a 30°C. Los halos de inhibición se midieron con vernier. Finalmente, se realizó la identificación molecular de los aislados antagonistas mediante secuenciación del gen 16S rRNA utilizando los siguientes primers universales: 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGGCTC AG-3') y 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTTACG ACT T-3').

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se obtuvieron un total de 42 aislados bacterianos (Tabla 1) los cuales se caracterizaron de acuerdo con su morfología microscópica y de acuerdo con la tinción de Gram.

Tabla 1. Clasificación de los 42 aislados mediante tinción de Gram, morfología macroscópica y microscópica, y pruebas oxidasa y catalasa.

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Cepa	Clave	Gram	Morfología	Catalasa	Oxidasa	Morfología colonial
1	BLBS e-01	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
3	BLBE e-03	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
5	BLBS e-05	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, blanco opaco, lobulado
6	BLCI-01	+	Coco	+	-	Pequeñas, redondas, blanco opaco
8	BLCH P-01	+	Bacilo	+	-	Naranja claro, opaco, crecimiento indefinido
9	BLAN-01	+	Bacilo	+	-	Plana, aspecto de cráter, blanco opaco
12	BLDS e-01	+	Coco	+	-	Redondas, blanco opaco
13	BLDS e-02	+	Coco	+	-	Amarillo opaco, redondo, pequeño
20	BLCH P-02	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
21	BLCG-01	+	Coco	+	-	Pequeñas, redondas, blanco opaco
22	BLCG-02	-	Bacilo	+	-	Cremosa, crecimiento indefinido, blanco opaco
25	BLDS e-03	+	Bacilo	+	-	Plana, transparente, redonda
26	BLDS e-04	+	Bacilo	+	-	Redondas, crema opaco
32	BLBS-07	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

38	BLIC-06	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
40	BLSC-09	+	Bacilo	+	-	Naranja claro, opaco, crecimiento plano
41	GBM-02	+	Bacilo	-	-	Naranja claro, opaco, crecimiento plano
42	GAUC HC-01	+	Bacilo	+	-	Naranja claro, opaco, crecimiento plano
43	GUO-01	+	Bacilo	+	-	Redondas, crema opaco
44	GUO-02	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
45	GUHC-03	+	Bacilo	+	-	Redondas, crema opaco
46	GUHC-04	+	Bacilo	+	-	Crema, irregular, pequeño
48	GUHC-06	-	Bacilo	+	-	Rojo claro, irregular, pequeño
CM48	GUHC-07	+	Bacilo	+	-	Plana, aspecto de cráter, blanco opaco
50	BLGS-03	-	Bacilo	+	-	Redondo, grande, opaco
51	BLBS-08	+	Coco Bacilo	+	-	Cremosa, redonda, blanco opaco
51T	BLBS-09	+	Coco Bacilo	+	-	Cremosa, redonda, blanco opaco
52-14	BLCG-05	+	Bacilo	+	-	Plana, aspecto de cráter, blanco opaco
53	GAW C-01	+	Bacilo	+	-	Aspecto de cráter, con aspecto lobulado/estriado, crema opaco
54	GUCH C-02	-	Bacilo	-	+	Redondo, grande, opaco
55	GUCH C-03	+	Bacilo	-	-	Plana, transparente, redonda
56	GUCH S-01	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
D2	PCRS 2-02	-	Bacilo	+	+	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
D3	PCRS 2-03	-	Bacilo	+	+	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
D5	PCRS 2-05	-	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G1	PCRS 1-01	-	Bacilo	+	+	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G2	PCRS 1-02	-	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, naranja opaco
G3	PCRS 1-03	-	Bacilo	+	+	Pequeñas, redondas, crema opaco
G4	PCRS 1-04	+	Coco Bacilo	+	+	Cremosa, crecimiento indefinido, blanco opaco
G5	PCRS 1-05	-	Bacilo	-	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G6	PCRS 1-06	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G6.2	G PCRS 1 07	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema

La actividad antagonista se debe a la capacidad de los microorganismos de producir sustancias extracelulares, las cuales poseen actividad antimicrobiana frente a un rango determinado de organismos (Iracheta, 2017).

De los 42 aislados sometidos a prueba de estría cruzada, 12 (29%) mostraron una actividad antagonista contra las tres cepas retardadas, y 3 (7%) mostraron una actividad bacteriostática hacia *Vibrio harveyi* (Tabla 2 y Figura 1).

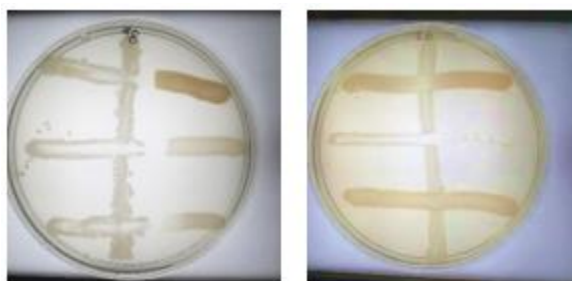


Figura 1. Resultado positivo para antagonismo por método de estría cruzada (izquierda), inhibición parcial de la cepa *Vibrio harveyi* (derecha).



Figura 2. Resultado positivo para antagonismo por método de sobrenadante libre de células bacterianas (izquierda), resultado negativo de la misma prueba (derecha).

Tabla 2. Resultados en mm de la actividad antagónica de aislados microbianos contra VP_{AHPND} y VH_{AHPND} (A = Ausencia de antagonismo).

		Cepa patógena		
Cepa	Clave	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (D74)	<i>Vibrio harveyi</i> (Vh)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (9V)
1	BLBSe-01	A	25 mm	A
3	BLBEe-03	10 mm	13.16 mm	13.33 mm
5	BLBSe-05	8.3 mm	11.2 mm	12 mm
13	BLDSe-02	8 mm	18.33 mm	11 mm
20	BLCHP-02	A	6 mm	A
21	BLCG-01	A	10 mm	A
22	BLCG-02	8.6 mm	17 mm	15 mm
26	BLDSe-04	6.66 mm	11.33 mm	10.33 mm
43	GUO-01	7.33 mm	10 mm	9.5 mm
44	GUO-02	9.66 mm	12.33 mm	11.66 mm
45	GUHC-03	7 mm	13.5 mm	9.5 mm
46	GUHC-04	10 mm	15.66 mm	15.5 mm
48	GUHC-06	4 mm	8.33 mm	8.5 mm
CM48	GUHC-07	6.66 mm	10.33 mm	10.5 mm
G5	PCRS1-05	1.33 mm	7.33 mm	4 mm

Por otro lado, para la evaluación de la actividad antagónica del sobrenadante libre de células bacterianas, 15 (36%) aislados resultaron positivos (Figura 2 y Tabla 3).

Tabla 3. Resultados en mm de la actividad antagonica del sobrenadante libre de células bacterianas contra VP_{AHPND} y VH_{AHPND}. (A = ausencia de antagonismo).

Cepa	Clave	Cepa patógena		
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (D74)	<i>Vibrio harveyi</i> (Vh)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (9V)
1	BLBSe-01	A	2 mm	A
3	BLBEe-03	7 mm	3 mm	1 mm
5	BLBSe-05	1 mm	3 mm	4 mm
13	BLDSe-02	1.6 mm	2 mm	4 mm
20	BLCHP-02	A	1 mm	A
21	BLCG-01	A	2 mm	A
22	BLCG-02	A	4 mm	A
26	BLDSe-04	4 mm	3.6 mm	6 mm
43	GUO-01	1 mm	3 mm	5 mm
44	GUO-02	2.6 mm	1 mm	3 mm
45	GUHC-03	A	5 mm	0.93 mm
46	GUHC-04	2 mm	3mm	6 mm
48	GUHC-06	3 mm	3 mm	7 mm
CM48	GUHC-07	1.6 mm	3 mm	6 mm
G5	PCRS1-05	1.6 mm	3 mm	1 mm

A= Ausencia de antagonismo.

Las cepas antagonistas fueron enviadas a Macrogen Inc. (Corea del Sur) para su identificación por secuenciación del gen 16S rRNA (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación por secuenciación de cepas antagonistas Gram positivas

Cepa	Clave de la cepa	Primers utilizados	Resultado
3	BLBEe-03	785 F 907 R	<i>Bacillus safensis</i>
5	BLBSe-05		<i>Bacillus subtilis</i>
13	BLDSe-02		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
20	BLCHP-02		<i>Staphylococcus hominis</i>
22	BLCG-02		<i>Bacillus safensis</i>
21	BLCG-01		<i>Kocuria palustris</i>
26	BLDSe-04		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
43	GUO-01		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
44	GUO-02		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
45	GUHC-03		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
46	GUHC-04		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
48	GUHC-06		<i>Bacillus pumilus</i>
CM48	GUHC-07		<i>Bacillus zhangzhouensis</i>
G5	PCRS1-05		<i>Bacillus sonorensis</i>

Los aislados con mayor actividad antagónica contra los tres patógenos fueron BLBEe-03 y BLDSe-02, identificados como *Bacillus safensis* y *Bacillus zhangzhouensis* respectivamente. *B. safensis* mostró una inhibición promedio de 12.16 mm contra los tres patógenos AHPND; Abdelli *et al.* (2019) reportaron una cepa de *B. safensis* en suelo contaminado con aceite de oliva. El microorganismo era productor de un biosurfactante posteriormente clasificada como surfactina, dicho lipopéptido mostró actividad antimicrobiana, con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.78 mg mL⁻¹ para *B. subtilis* y 1.56 mg mL⁻¹ contra *S. aureus*, *Enterobacter faecium* y *Micrococcus luteus*. El 75% de las cepas Gram positivas fueron identificadas en el género *Bacillus*, microorganismos ampliamente estudiados ya que son productores de metabolitos de tipo lipopéptidos y policétidos, las cuales son moléculas bioactivas que poseen actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral y por lo tanto son de alto interés para el desarrollo en nuevas aplicaciones en las áreas química, agrícola, farmacéutica y alimentaria (Avery, 2018; Zhao *et al.*, 2017).

El aislado BLCG-01 identificado como *Kocuria palustris*, es una bacteria perteneciente al phylum Actinobacteria, la cual ha sido ampliamente estudiada por la producción de un péptido llamado kocurina, el cual posee actividad antibacteriana a Gram positivos de importancia médica como *S. aureus*, *B. cereus* y *E. faecalis* (Jakubiec- Krzesniak *et al.*, 2018) en este caso, mostro un resultado favorable al inhibir VP_{AHPND} y VH_{AHPND}.

Bibliografía.

Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of aquatic organisms*, 111(1), 81-86.

Trujillo García, E. A. (2016). Neutralización de las toxinas PirA y PirB de *Vibrio parahaemolyticus* asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas Del Noreste.

Han, J. E., Mohny, L. L., Tang, K. F., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*, 2, 17-21.

Yan, L., Boyd, K. G., Adams, D. R., & Burgess, J. G. (2003). Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(7), 3719-3727.

Iracheta Villarreal, J. M. (2017). Actividad antagonista in vitro de microbiota de Bahía de Lobos y Bahía de Guasimas, Sonora y Playa del Carmen, Quintana Roo contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Abdelli, F., Jardak, M., Elloumi, J., Stien, D., Cherif, S., Mnif, S., & Aifa, S. (2019). Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin (s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. *Biodegradation*, 1-14.

Avery, S. E. (2018). A Study of the Antagonistic Activity of *Bacillus subtilis* Strain T1 against Shrimp Pathogen *Vibrio parahaemolyticus* Strain D4 (Doctoral dissertation, University of Maryland, Baltimore County).

Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J. O. A. N. N. A., & Solecka, J. O. L. A. N. T. A. (2018). Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish journal of microbiology*, 67(3), 259-272.

Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(15), 5951-5960