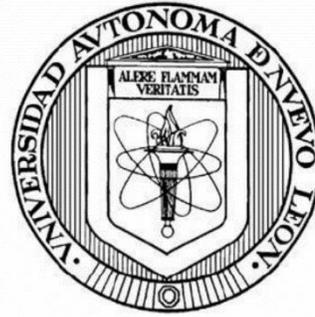


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE BACTERIAS MARINAS AISLADAS AL SUR DE SONORA,  
MÉXICO, Y SU POTENCIAL UTILIZACIÓN COMO PROBIÓTICO Y  
ANTAGONISTA PARA *Vibrio parahaemolyticus* EN CAMARÓN BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*)

POR

KARLA ALEJANDRA SOTO MARFILEÑO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS CON ORIENTACION EN MICROBIOLOGÍA

2025

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS MARINAS AISLADAS AL SUR DE SONORA,  
MÉXICO, Y SU POTENCIAL UTILIZACIÓN COMO PROBIÓTICO Y  
ANTAGONISTA PARA *Vibrio parahaemolyticus* EN CAMARÓN BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*)**

**Comité de Tesis**



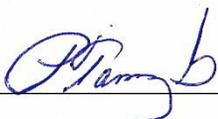
---

Dr. Lucio Galaviz Silva



---

Dra. Dra. Itza E. Luna Cruz



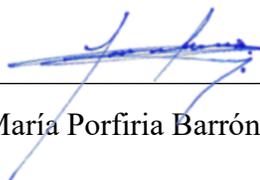
---

Dra. Patricia Tamez Guerra



---

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto



---

Dra. María Porfiria Barrón González

---

Dra. Katuska Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS MARINAS AISLADAS AL SUR DE SONORA,  
MÉXICO, Y SU POTENCIAL UTILIZACIÓN COMO PROBIÓTICO Y  
ANTAGONISTA PARA *Vibrio parahaemolyticus* EN CAMARÓN BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*)**

**Dirección de Tesis**



---

Dr. Lucio Galaviz Silva

DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL.

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

#### Financiamiento:

Esta tesis fue financiada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), “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” (# 3157) y Programa de Apoyo a Investigación Científica y Tecnológica (PROACTI-UANL) 80-CA-2023 a LGS.

Así mismo, por la beca otorgada a KASM lo largo del posgrado (CVU: 854121)

## AGRADECIMIENTOS

Extiendo mi agradecimiento a por la oportunidad de realizar mi estancia doctoral al Dr. Lucio Galaviz Silva.

Quiero agradecer a mi compañero y amigo Gabriel Cázares por su apoyo en el proyecto, además de que su investigación previa fue crucial para la realización de esta tesis.

A los profesores del posgrado en microbiología, ya que su guía y enseñanza fueron importantes para el rumbo de esta investigación y culminación del proyecto, gracias.

Extiendo también un agradecimiento al comité de tesis, por sus comentarios y observaciones para poder enriquecer enormemente la investigación, ya que fueron fundamentales para la culminación del proyecto.

Otra de las personas a las cuales quiero agradecer es al Dr. Bruno Gómez Gil, por permitirme el ingreso y estancia en el CIAD de Mazatlán, aunque corta, fue de mucho provecho, ya que me brindó ayuda necesaria en el proceso bioinformático de esta tesis.

Por último, extiendo mi más profundo agradecimiento a CONAHCyT por el financiamiento de este trabajo de investigación y por la haberme brindado la oportunidad de ser becario de esta institución.

## DEDICATORIAS

A mis papás, gracias por el apoyo que me brindaron durante todo este proceso, se los agradezco siempre e infinitamente, los amo mucho.

A mis amigos, en Annie, Oziel, Glenda y Esteffy por siempre brindarme su apoyo incondicional, estar ahí en mis mejores y peores momentos, gracias por escucharme siempre y extenderme su mano en todo momento, los quiero mucho.

A mis hermanos, Carlos, Alejandro y Lulú, a mis sobrinos Keira, Aiden, Mateo y Amelia.

A Miguel, gracias por creer en mí, darme el apoyo y comprensión, y palabras de aliento cuando más lo necesitaba.

A Max Apolinar. Gracias por haber sido un gran mentor en maestría, y por apoyarme, porque fuiste de los primeros que vio el potencial en mí, gracias a ti pude llegar a donde estoy.

A Jack, Mili y Billy, que son uno de los motivos y el impulso para seguir adelante.

A mis compañeros, colegas y amigos del departamento de Química, los admiro a todos y cada uno de ustedes.

## INDICE

INDICE DE TABLAS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
LISTADO DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	X
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES .....	5
1. Acuicultura a nivel mundial .....	5
2. Producción mundial de camarón .....	5
3. Producción de camarones en México .....	6
4. Enfermedades en la acuicultura .....	7
5. Vibriosis en camarón .....	7
6. Infección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AHPND ( <i>Vp</i> AHPND) en camarones ...	7
7. Alternativas de prevención y control de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	9
8. Probióticos .....	9
JUSTIFICACIÓN .....	13
3. HIPÓTESIS .....	14
4. OBJETIVO GENERAL .....	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	16
5. MATERIALES Y METODOS .....	17
5.1 Aislados y condiciones de crecimiento .....	17
5.2 Confirmación de presencia de plásmido AHPND en <i>V. parahaemolyticus</i> en cepa 756. ....	18
5.2.1 Extracción de DNA y PCR .....	18
5.3 Evaluación preliminar <i>in vitro</i> de la actividad antagonista .....	19
5.4 Ensayo de actividad antagonista. ....	19
5.5 Actividad hemolítica .....	19
5.6 Actividad enzimática .....	20
5.7 Ensayo de doble capa .....	20

5.8	Ensayo de toxicidad en nauplios de <i>Artemia salina</i> bajo diferentes tratamientos de aislados seleccionados como probióticos potenciales. ....	20
5.8.1	Desinfección de quistes de <i>A. salina</i> .....	20
5.8.2	Ensayo de toxicidad de los candidatos probióticos en <i>A. salina</i> .....	21
5.9	Extracción de DNA genómico del aislado <i>Bacillus pumilus</i> Sonora.....	21
5.10	Secuenciación de genoma completo del aislado <i>B. pumilus</i> Sonora.....	21
5.11	Ensamblaje <i>de novo</i> , anotación del genoma, análisis filogenético e identificación de genes involucrados en la síntesis de antimicrobianos del <i>B. pumilus</i> Sonora.....	22
5.12	Análisis estadístico.....	22
6.	RESULTADOS 23	
6.1	PCR confirmatoria para presencia de genes <i>ToxA</i> de <i>VpAHPND</i> . ....	23
6.2	Evaluación preliminar de antagonismo por difusión en pozo de las cepas contra <i>VpAHPND-756</i> .....	24
6.3	Actividad antagónica y ensayo de doble capa.....	25
6.4	Actividad hemolítica y enzimática de los aislados. ....	28
6.5	Actividad hemolítica y enzimática de los aislados. ....	28
6.6	Ensamblaje <i>de novo</i> , anotación y análisis filogenético de <i>Bp-Son</i> . ....	32
7.	DISCUSIÓN .....	37
8.	CONCLUSIÓN .....	42
9.	PERSPECTIVAS A FUTURO .....	43
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados y fuente de muestra. ....	15
Tabla 2. Ensayos de actividad hemolítica y enzimática de los aislados .....	26
Tabla 3. Características del genoma de <i>Bacillus pumilus</i> Sonora.....	30
Tabla 4. Clúster Biosintético de genes relacionados a la síntesis de antimicrobianos contenidos en el genoma de <i>Bp</i> -Son .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amplificación de gen <i>pirA</i> <sup>VP</sup> causante de la enfermedad AHPND en cepas de <i>Vibrio</i> sp .....	21
Figura 2. Diámetro de inhibición (mm) de los aislados contra <i>Vp</i> AHPND-756 para el ensayo de difusión en pozo .....	22
Figura 3. Ensayo de difusión en pozo del aislado J1 y el aislado <i>Bp</i> -Son .....	23
Figura 4. Ensayo de actividad antagonista.....	23
Figura 5. Diámetro de inhibición (mm) de los aislados contra <i>Vp</i> AHPND-756 en el ensayo de actividad antagonista .....	24
Figura 6. Diámetro de inhibición (mm) de los aislados contra <i>Vp</i> AHPND-756 en el ensayo de doble capa. ....	25
Figura 7. Ensayo de doble capa .....	26
Figura 8. Ensayos enzimáticos para producción amilasas, proteasas y celulasas .....	27
Figura 9. Actividad hemolítica de los aislados .....	28
Figura 10. Supervivencia de nauplios de <i>A. salina</i> inoculados con diferentes combinaciones e aislados como probióticos potenciales .....	29
Figura 11. Gráfico circular del genoma de <i>B. pumilus</i> Sonora ( <i>Bp</i> -Son) .....	31
Figura 12. Subsistemas contenidos en el genoma de <i>Bp</i> -Son obtenidos con RAST .....	32
Figura 13. Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA y en el método de máxima verosimilitud (ML) .....	33

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
>	Mayor que
<	Menor que
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
<i>Vp</i> AHPND-756	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
AHPND	Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda
WGS	Secuenciación de Genoma Completo
<i>Bp</i> -Son	<i>Bacillus pumilus</i> Sonora
g	Gravedades
ng	Nanogramos
TSA	Agar Soya Tripticasa
TSB	Caldo de Soya Trpticasa
NaCl	Cloruro de sodio
h	Horas
g	Gramos
rpm	Revoluciones por minuto
pb	Pares de base
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
UFC	Unidad formadora de colonias
ml	Mililitro
RNA	Ácido ribonucleico

## RESUMEN

La enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda, causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (*VpAHPND*), portadoras de los genes de las toxinas *pirA<sup>VP</sup>* y *pirB<sup>VP</sup>* ha causado grandes pérdidas económicas desde su primera aparición en China. Muchas cepas son resistentes a los antibióticos, por lo que se han investigado alternativas a su utilización. Una de estas es la suplementación con probióticos. En este estudio se evaluaron 14 aislados bacterianos para determinar su capacidad antagonista. Los resultados mostraron que *Bacillus pumilus*, identificado como *Bp-Son*, tuvo la mejor actividad antagonista contra *VpAHPND-756 in vitro*. Además, presentó actividades proteolítica y celulolítica, lo cual podrían mejorar la absorción de nutrientes y la digestión por parte de los camarones. Además, *Bp-Son* es una bacteria segura para su administración en camarón, ya que presentó una baja mortalidad en *Artemia salina*.

Las características genéticas de *Bp-Son* se exploraron mediante secuenciación del genoma completo (WGS) utilizando la plataforma Illumina MiSeq, revelando un genoma de 3.512.470 pb y 3.734 secuencias codificantes contenidas en 327 subsistemas. Algunos de los genes identificados están relacionados con la biosíntesis de antimicrobianos (surfactinas, fengicina, esquizoquinas, bacilibactina, bacilisina), el metabolismo del nitrógeno y el fósforo y la respuesta al estrés. Estos hallazgos sugieren que *Bp-Son* tiene características deseables para ser aplicado como un probiótico funcional suplementado en dietas de camarones con base en análisis realizados *in vitro* y en el conocimiento de las características genéticas y funcionales de esta bacteria.

## ABSTRACT

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), caused by *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*AHPND) strains carrying the *pirA*<sup>VP</sup> and *pirB*<sup>VP</sup> toxin genes, has caused significant economic losses since its first appearance in China. Many strains are resistant to antibiotics, thus prompting the investigation of alternative treatments. One such alternative is the supplementation of probiotics. In this study, 14 bacterial isolates were evaluated to determine their antagonistic capacity. Results showed that *Bacillus pumilus*, identified as *Bp*-Son, exhibited the best antagonistic activity against *Vp*AHPND-756 *in vitro*. Additionally, it presented proteolytic and cellulolytic activities, which could enhance nutrient absorption and digestion in shrimp. Furthermore, *Bp*-Son is safe for shrimp administration, as it showed low mortality in *Artemia salina*.

The genetic characteristics of *Bp*-Son were explored through whole-genome sequencing (WGS) using the Illumina MiSeq platform, revealing a 3,512,470 bp genome and 3,734 coding sequences contained in 327 subsystems. Some of the identified genes are related to the biosynthesis of antimicrobials (surfactins, fengicin, skqualamine, bacilibactin, bacilisin), nitrogen and phosphorus metabolism, and stress response. These findings suggest that *Bp*-Son possesses desirable characteristics for application as a functional probiotic supplemented in shrimp diets, based on *in vitro* analyses and the knowledge of the genetic and functional characteristics of this bacterium.

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha emergido como una alternativa para la producción de alimentos con numerosas ventajas en comparación con la pesca de captura. Actualmente, la industria acuícola proporciona la mitad de la producción mundial de animales acuáticos para el consumo humano (Stieglitz et al. 2023). La Organización para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization, FAO) informó que la pesca produjo 177,8 millones de toneladas, y de este total, aproximadamente 49 % proviene de la actividad acuícola (FAO 2022).

La acuicultura del camarón es de suma importancia en la economía mundial, especialmente para los países de desarrollo económico bajo o medio, como los pertenecientes a América Latina y Asia (Soo y Bhasu 2023). En México, la producción de camarón tiene un alto valor económico, ubicándose en el séptimo lugar (FAO 2022), dejando ganancias económicas en 2021 de alrededor de 876 millones de dólares y una producción de 214,063 toneladas, en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit (CONAPESCA 2021).

Sin embargo, la producción de camarón es afectada por diversas enfermedades, lo que ha generado pérdidas millonarias (Asche et al. 2021). Los principales agentes infecciosos que afectan a México y otros países de América Latina son virus del síndrome de Taura (TSV), el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), y bacterias, como algunas especies del género *Vibrio*, causantes de una enfermedad denominada vibriosis (Soto-Rodríguez et al. 2015). Esta enfermedad provoca lesiones necróticas en el tejido de los organismos infectados (Jiravanichpaisal y Miyazaki 1994). En 2013, en el noreste de México, en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, se reportaron por primera vez cepas nuevas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*, agente etiológico de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarones (Soto-Rodríguez 2022). Esta enfermedad se caracteriza por una severa atrofia del hepatopáncreas en su etapa aguda (Joshi et al. 2014), lo que resulta en pérdidas del 80% en la producción, teniendo graves efectos económicos (Soto-Rodríguez 2015). Esta patología surgió en China y en su dispersión, los países más afectados por esta enfermedad se estima que tuvieron pérdidas económicas de 23.6 mil millones de dólares (González-Gómez et al. 2020).

Existen varios agentes antimicrobianos, como los antibióticos, para tratar diversas enfermedades bacterianas en acuicultura, sin embargo, su administración inadecuada en este campo ha ejercido una fuerte presión selectiva hacia la resistencia a este tipo de fármacos, generando una adaptación por parte de las bacterias a través del flujo horizontal de genes de resistencia por mecanismos de mutación cromosómica o adquisición de plásmidos; además, el incremento en el uso de antibióticos conduce a su acumulación en la carne de camarón, imposibilitando su introducción al mercado internacional (Kumar et al. 2016). Debido a lo anterior, se han buscado alternativas al uso de antibióticos. Una que se ha investigado ampliamente son los probióticos, que son microorganismos vivos y, si se administran adecuadamente, confieren beneficios al hospedero (FAO 2001). En la acuicultura, los probióticos se han definido como un suplemento microbiano que tiene efectos benéficos al modificar la comunidad microbiana ambiental o asociada al hospedero, asegurando un mayor provecho del alimento o aumentando su valor nutricional, también mejora la respuesta del hospedero a las enfermedades a través de varios mecanismos, incluida la competencia de nutrientes y/o la inhibición de patógenos derivados de la síntesis de compuestos antimicrobianos (Verschuere et al. 2000; Decamp et al. 2008).

Debido a lo anterior, el desarrollo de este trabajo de investigación permitirá plantear una estrategia de control biológico, mediante la evaluación, en condiciones *in vitro* de la capacidad antagónica de aislados bacterianos de ecosistemas marinos contra *V. parahaemolyticus*, agente causal de la AHPND (*VpAHPND*) en cultivos de camarón.

## **2. ANTECEDENTES**

### **1. Acuicultura a nivel mundial**

La acuicultura a nivel mundial ha crecido rápidamente. La Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO 2018), reportó que la producción acuícola mundial ha alcanzado el nivel más alto de todos los tiempos con un estimado de 171 millones de toneladas en el 2016 en respuesta al incremento de la demanda doméstica e internacional de mariscos, y se prevé que esta proporción aumente en un 62% para el año 2030, debido a la estabilización del rendimiento de la pesca por captura en mar abierto y al aumento de la producción acuícola, así como en respuesta a la demanda mundial.

Aunque existe un desarrollo de nuevos métodos de producción, es indispensable un mejoramiento respecto a medidas de control y prevención en los procesos productivos, debido a que se ha observado un incremento notable en surgimiento de agentes patógenos tanto bacterianos como virales siendo esto un reto a resolver en la acuicultura moderna, ya que existen grandes pérdidas económicas en este sector (Zhang et al. 2023).

### **2. Producción mundial de camarón**

El camarón es un marisco muy apreciado y repleto de nutrientes como proteínas, ácidos grasos omega-3 y vitaminas, su producción desempeña un papel fundamental en el panorama económico mundial y la seguridad alimentaria (Wikumpriya et al. 2023).

La producción de camarón de cultivo a nivel mundial en el año 2018 se estimó que fue de 4 millones de toneladas, con un aumento del 3 al 5% respecto al 2017 (FAO 2018).

La producción de camarón de cultivo alcanzó la asombrosa cifra de 5.17 millones de toneladas en 2022, valoradas en 46,900 millones de dólares, y se prevé que el mercado mundial del camarón experimente un crecimiento exponencial en los próximos años, impulsado por la creciente demanda de la industria de alimentos (FAO 2022).

Actualmente, el camarón es producido a través de operaciones intensivas de cultivo en América Latina y el este y sudeste de Asia, la mayor parte del suministro se dirige hacia los consumidores provenientes de América del Norte, Europa y Japón. En 1976, las exportaciones de camarones y langostinos obteniendo ganancias por 1,200 millones de

dólares, lo que representa el 15.4% del valor de las exportaciones mundiales de productos acuáticos, mientras que, en 2020, tuvieron un valor de 24,700 millones de dólares, lo que representa el 16.4% del total en términos de valor (FAO 2022).

### **3. Producción de camarones en México**

En México, la industria camaronera comenzó en los años 1970 principalmente en las costas del Pacífico convirtiéndose en una de las actividades económicas más importantes (Roque et al. 2001). En 2016, México cultivó 129,049 toneladas de camarón, lo que representó un tercio de la producción acuícola nacional. Con un valor de 11,479 millones de pesos, el camarón superó a otras especies como la tilapia, atún, ostión y trucha, consolidándose como uno de los productos acuícolas más valiosos del país (CONAPESCA 2021).

Para el año 2020 el país ocupaba el 7° lugar en términos de producción de crustáceos, con una ganancia de 676 millones de USD en los estados de Sonora y Sinaloa, de los cuales el 88% de la producción total provenía de granjas camaroneras (Gonzalez-Rivas y Tapia 2023).

En 2021, México produjo 249,958 toneladas de camarón, generando ingresos por alrededor de 23 millones de pesos. La acuicultura fue el principal motor de esta producción, aportando 182,025 toneladas, mientras que la captura representó 67,933 toneladas. Sinaloa y Sonora fueron los estados líderes en producción. Con una tasa de crecimiento anual promedio del 4.56% en la última década, el camarón mexicano ha ganado relevancia en el mercado internacional, con Estados Unidos, China y Japón como principales destinos de exportación (CONAPESCA 2021).

Finalmente, en el año 2023 México se posicionó en el 7° lugar a nivel mundial respecto a la producción pesquera y acuícola de acuerdo con reportes de la FAO; se alcanzó una producción de camarón cultivado de 192 mil 600 toneladas teniendo ganancias económicas de más de 19 mil 800 millones de pesos, siendo el estado de Sinaloa el principal productor (CONAPESCA 2024).

#### **4. Enfermedades en la acuicultura**

La producción de camarones enfrenta grandes retos debido a su rápido crecimiento gracias a la alta demanda mundial. La principal razón de brotes de enfermedades es resultado de un incremento en la densidad de la población de peces y mariscos, hacinamiento y falta de manejo sanitario ocasionando pérdidas de billones de dólares anualmente (Lafferty et al. 2015).

Entre las enfermedades que afectan la acuicultura mundial de camarones son el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), el cual causó la muerte masiva en el camarón azul (*L. stylirostris*) en México (Jiménez et al. 1999). En el año 1992 en granjas cercas del Río Taura, en el Golfo de Guayaquil, Ecuador, se registraron pérdidas del 60% en la producción de camarones debido al virus del síndrome de Taura (TSV, Pinheiro et al. 2007); esta enfermedad se registró en México hasta el año 1995 en los Estados de Sonora, Sinaloa, Guerrero y Chiapas. El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) fue registrado primeramente en Taiwan en 1992 y se dispersó rápidamente por Asia (Sánchez-Paz 2010), y fue hasta el año 2000 que se confirmó su presencia en México causando pérdidas hasta del 100% en la producción de camarón de cultivo (COAES 2009). En el caso de las enfermedades bacterianas, la vibriosis, causada por diferentes especies de bacterias del género *Vibrio*, es una de las principales enfermedades generan problemas en la acuicultura de mariscos y peces (Chandrakala y Priya 2017). En el año 2013, se registraron pérdidas severas en granjas del Pacífico (Sonora y Sinaloa) debido a esta enfermedad (Vincent y Lotz 2007; Valera y Peña 2014)

#### **5. Vibriosis en camarón**

Las bacterias del género *Vibrio*, comúnmente asociadas a ambientes acuáticos, son patógenos oportunistas que pueden infectar una amplia variedad de organismos, incluyendo camarones (Vandenberghe et al. 2003). Entre las enfermedades causadas por estas bacterias destaca la vibriosis, que afecta principalmente al hepatopáncreas del camarón (Gómez-Gil et al. 1998). Especies como *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. cholerae* son las principales responsables de estas infecciones (Noriega-Orozco et al. 2007). *V. parahaemolyticus*, en particular, es capaz de infectar tanto a

animales terrestres como acuáticos; este patógeno ha causado pérdidas económicas en la acuicultura a nivel mundial (Pui et al., 2014).

## 6. Infección de *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (*Vp*AHPND) en camarones

La bacteria *V. parahaemolyticus* es uno de los agentes patogénicos que afecta la viabilidad de la industria acuicultora, especialmente en camarones. Esta bacteria es causante de la Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) o el síndrome de mortalidad temprana (EMS) en camarones, el cual ha causado grandes afectaciones en la acuicultura de camarón en México y Asia (Li et al. 2017; Flegel 2012).

La AHPND fue reportada por primera vez en China en el 2009, seguido de Malasia en el 2010, Vietnam, Tailandia y México en 2010, 2011, 2012 y 2013 respectivamente (Pui et al. 2014). Su tasa de mortalidad es elevada, ya que se encuentra entre el 40 al 100% de camarones infectados y las especies de camarón susceptibles a la enfermedad son *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* y *Penaeus chinensis*. (Kua et al. 2016).

Los análisis del genoma de la *Vp*AHPND aislada de México y Tailandia mostraron que esta bacteria contiene un plásmido con los factores de virulencia tipo IV de proteínas de pili y proteínas de transferencia por conjugación (Gómez-Gil et al. 2014). El plásmido extracromosomal llamado pVA1, contiene los genes que codifican para las toxinas PirA<sup>VP</sup> y PirB<sup>VP</sup> que expresan homólogos de la toxina binaria relacionada con insectos *Photorhabdus* (Pir; Lai et al. 2015). Khimmakthong y Sukkaarun (2017) reportaron que 6 horas post infección, la dispersión de *Vp*AHPND en el camarón infectado puede encontrarse en agallas, hepatopáncreas, intestino, músculos, y hemolinfa.

Los signos clínicos en camarones infectados con *Vp*AHPND son letargo, caparazón suave, músculo blanquecino, estómago e intestino medio vacío, crecimiento lento, hepatopáncreas pálido y atrofiado, el cual algunas veces presenta rayas negras (Kua et al. 2016).

Existen tres etapas de la AHPND: inicial, aguda y terminal. En la etapa inicial, las células epiteliales se elongan dentro del lumen tubular, hay una reducción de tamaño de la vacuola y un incremento de la descamación de las células epiteliales tubulares. En la etapa aguda, el epitelio tubular es necrótico y, en la etapa terminal, el tejido intermedio de los túbulos

hepatopancreáticos muestra una respuesta inflamatoria severa, y el epitelio tubular se vuelve totalmente necrótico, con células muertas en diferentes fases de lisis con una descamación severa de las células, acumulándose en el lumen como células muertas (Soto-Rodríguez 2015).

### **7. Alternativas de prevención y control de *Vibrio parahaemolyticus***

La acuicultura requiere a menudo del uso de agentes terapéuticos como agentes curativos y/o profilácticos, así como agentes químicos para el mantenimiento de instalaciones y desinfección del agua (Ringo et al. 2010). El incremento de la actividad acuícola tiene un impacto ecológico importante, junto al surgimiento de patógenos y bacterias resistentes a fármacos, así como residuos de antimicrobianos no deseables en productos cosechados que están a la venta para el consumo humano debido al uso indiscriminado de agentes quimioterapéuticos (Balcázar et al. 2006).

Comúnmente se utilizan antibióticos para tratar a los cultivos infectados con *V. parahaemolyticus*, sin embargo, se ha demostrado que puede existir resistencia a algunos de estos (Lai et al. 2015). Xu et al. (2016) reportaron que un aislado de *V. parahaemolyticus* obtenido de vendedores de productos acuáticos al norte de China presentaba resistencia a estreptomicina (86.2%), aunque mostró ser menos resistente a ampicilina (49.6%), cefazolina (43.5%), cefalotina (35.9%) y kanamicina (22.1%). Por otro lado, Oh et al. (2011) reportaron la prevalencia de resistencia en aislados *V. parahaemolyticus*, encontrando que la ampicilina fue la más alta (57.8%), seguido por la resistencia a rifampicina (11.9%), estreptomicina (8.7%) y trimetoprima (6.4%). Desafortunadamente, más recientemente en Sonora, México, se identificaron cepas resistentes a oxitetraciclina y sulfacloropiridacina-trimetoprim (Galaviz-Silva et al. 2021). Con el descubrimiento de aislados resistentes a antimicrobianos provenientes de la acuicultura es necesario monitorear su utilización y buscar medidas alternas a su uso; una de estas alternativas es la utilización de probióticos (Reid et al. 2003).

### **8. Probióticos**

La aplicación de probióticos ha sido de especial interés en la acuicultura debido a sus múltiples avances en controlar enfermedades bacterianas, incrementar la inmunidad no

específica, además de ayudar en la absorción de nutrientes y digestión en especies acuáticas (Bermudez-Brito et al. 2012). En un inicio, el término probiótico fue definido como “organismos y sustancias las cuales contribuyen al balance intestinal microbiano” (Parker 1974), después, como “suplementos alimenticios microbianos vivos los cuales actúan benéficamente al animal hospedero mediante el mejoramiento del balance intestinal microbiano” (Fuller 1989), sin embargo, en el caso de los organismos acuáticos las interacciones con el ambiente externo es mucho más cercana comparado con organismos terrestres, ya que lo anterior mencionado y la alimentación tienen efectos sustanciales en el estado microbiano del organismo acuático, por lo tanto Verschuere et al. en el 2000 sugirieron que el término probiótico debe ser definido como un “complemento microbiano vivo que exhibe un efecto beneficioso sobre el hospedero mediante la modulación de la comunidad microbiana ambiental o asociada a él”. Para el 2015, Hai (2015) los describe como “célula microbiana viva, muerta o componente de esta que exhibe un efecto beneficioso en el hospedero mediante el mejoramiento de resistencia a enfermedades, tasa de crecimiento, utilización de alimento y estado de salud, logrado a través del equilibrio microbiano tanto en el hospedero como en el ambiente”, por lo cual los metabolitos bioactivos pueden ser usados directamente o contemplados para diseñar nuevos compuestos terapéuticos para administrarse como probiótico en los alimentos para que los activos antimicrobianos se liberen en el tracto de los organismos para tratar las enfermedades (Pérez-Sánchez et al. 2013).

La literatura sugiere que los posibles mecanismos de acción de los probióticos en la acuicultura incluyen: promoción de crecimiento, producción de compuestos inhibitorios, mejoramiento en la digestión de nutrientes, mejora de la calidad del agua, aumento en la respuesta inmune, y competición por nutrientes (Defoirdt et al. 2007; Martínez Cruz et al. 2012).

Las características deseables de un probiótico potencial incluyen no ser dañinas para el hospedero, capacidad de sobrevivir durante el transporte al sitio activo, capacidad de colonizar y proliferar dentro del hospedero, no poseer genes de resistencia a antibióticos o de virulencia (Hai et al. 2015).

Comúnmente, los microorganismos utilizados como probióticos en camarones son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus sp.*, *Bidifobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Ouwehand et al. 2002; Salamoura et al. 2014).

Se ha reportado a bacterias Gram negativas, en este caso *Pseudomonas sp.* como inhibidoras del crecimiento de *Vibrio haerveyi* y *Vibrio fluvialies* en el cultivo de camarón, sin embargo, su utilización es limitada debido a la capacidad de transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias Gram negativas patogénicas y no patogénicas (Farzanfar 2006).

Bacterias pertenecientes al género *Arthrobacter* poseen varias propiedades nutricionales y múltiples beneficios para ser utilizado en la acuicultura, ya que se ha reportado que producen compuestos antimicrobianos, así como aminoácidos, vitaminas, enzimas, factores específicos de crecimiento y polisacáridos, además se ha demostrado que pueden antagonizar diversos patógenos importantes en la acuicultura incluyendo a *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, y *V. nereis*, además de mostrar protección en postlarvas de *Penaeus chinensis* contra vibrios patogénicos (Ninawe y Selvin 2009).

Por otro lado, *Lactobacillus sp.* produce diversos compuestos durante su fermentación láctica tales como ácidos orgánicos, diacetilo, y proteínas bactericidas las cuales son implementadas para estimular y activar el sistema inmune de animales acuáticos haciéndolos resistentes a infecciones por diversos patógenos (Van Hai y Fotedar 2010).

Otras bacterias utilizadas como probióticos en camarón son las pertenecientes el género *Bacillus*. Ejemplo de esto son *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis* provenientes de agua y suelo marino los cuales se estudiaron para su utilización en la biorremediación de cultivos de *Penaeus monodon*, revelando que estos *Bacillus spp.* secretan amilasas, proteasas y lipasas e inhiben a patógenos de *Vibrio spp.* sin tener alteraciones en las postlarvas de *P. monodon*, por lo cual se recomendó como agente para la biorremediación de los sistemas de cultivos en la acuicultura (Devaraja et al. 2013). En un estudio realizado por Lui et al. (2010) reportaron que *B. subtilis* E20 aislado de *natto* la cual es una comida japonesa fermentada preparado a base de habas de soya (Ilango y Antony 2021), consumida como alimento funcional para humanos. Esta bacteria fue

utilizada en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* las cuales mostraron una disminución en la mortalidad acumulada y los análisis de expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico demostraron la expresión de genes de profenoloxidasa I, profenoloxidasa II y lisozima.

La combinación de probióticos, como *B. subtilis* y *B. lincheniformis* produce enzimas que pueden destruir compuestos dañinos para el camarón, por ejemplo, disminuyendo la concentración de amonio y nitritos en los estanques, y a su vez esta mezcla de probióticos puede contribuir a la disminución del crecimiento de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* hasta en un 90% (Ina-Salwany et al. 2019).

Existen diversos métodos a través de cuales los probióticos pueden ser administrados a los camarones, entre ellos se encuentran la suplementación en el alimento, administración oral, sumersión e inmersión, aunque diversos estudios han mostrado que la suplementación vía alimentación es más eficiente y factible comparado con otros métodos, sin embargo continúan investigaciones para mantener la integridad y viabilidad del probiótico; las metodologías más utilizadas son cultivos liofilizados en el alimento, revestimiento superior con lípidos para la encapsulación de las formulaciones de alimentos, y el secado por aspersion (Tamilselvan y Raja 2024).

## JUSTIFICACIÓN

La presencia de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) causada por *Vibrio parahaemolyticus* en cultivos de camarones implica un riesgo para la actividad acuícola a nivel mundial y en México, donde se han registrado mortalidades desde el año 2013, relacionadas a *VpAHPND* lo que resulta en pérdidas del 80% en la producción con graves efectos económicos. En la acuicultura se utilizan antibióticos para tratar esta enfermedad, sin embargo, su inadecuada administración ha ejercido una fuerte presión selectiva hacia la resistencia a este tipo de fármacos, generando una adaptación por parte de las bacterias. En consecuencia, se han buscado alternativas como lo es la utilización de probióticos, que son microorganismos que, si se administran adecuadamente, confieren beneficios al hospedero como un mejor aprovechamiento del alimento y la mejora de la respuesta frente a la enfermedad a través de varios mecanismos, incluida la competencia de nutrientes y/o la inhibición de patógenos derivados de la síntesis de compuestos antimicrobianos.

Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue la evaluación y determinación de probióticos funcionales, que posean principalmente capacidad antagónica contra *V. parahemolyticus*, agente causal de la AHPND (*VpAHPND*) para su aplicación en la acuicultura de camarón.

### 3. HIPÓTESIS

Las bacterias marinas aisladas en costas al Sur de Sonora, México, poseen actividad probiótica y capacidad antagónica contra *Vibrio parahaemolyticus* agente causal de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar y evaluar bacterias marinas con potencial probiótico y antagonista contra *Vibrio parahaemolyticus* para su uso como aditivo en alimento de camarón, e identificar, mediante análisis bioinformáticos, la presencia de genes responsables en la biosíntesis de agentes antimicrobianos.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 4.1 Evaluar mediante ensayos *in vitro* la capacidad antagónica de las bacterias aisladas contra cepas patogénicas de *Vibrio parahaemolyticus* AHPND 756.
- 4.2 Determinar mediante ensayos *in vitro* la capacidad de los aislados para la producción de enzimas celulasas, proteasas y amilasas.
- 4.3 Mediante análisis bioinformáticos, identificar la presencia de genes implicados en la biosíntesis de antimicrobianos en los genomas de las cepas con mejor actividad antagónica para *V. parahaemolyticus* AHPND.
- 4.4 Evaluar la toxicidad de los microorganismos seleccionados como probióticos en *Artemia salina*.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Aislados y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas para este proyecto de investigación y la fuente de procedencia se enlistan en la Tabla 1. Todos los aislados estuvieron criopreservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 20% se reactivaron en agar soya tripticasa (TSA) con 2% NaCl a  $28-30^{\circ}\text{C}$  por 24 h. La cepa de *V. parahemolyticus* con la que se trabajó fue la 756 (*Vp*AHPND-756), donada por el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON).

**Tabla 1.** Aislados y fuente de muestra.

Aislados	Fuente de muestreo
32a	Mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> )
43	Almeja china ( <i>Ilioichione subrugosa</i> )
<i>Bp</i> -Son	Sedimento salino
Y119	Agua marina
HA	Barro de manglar
J1	Agua marina
H3M	Agua marina
H2	Cangrejo hermitaño ( <i>Clibanarius panamensis</i> )
G2.1	Alga verde ( <i>Enteromorpha</i> sp.)
G2	Alga verde ( <i>Enteromorpha</i> sp.)

G3.2	Alga verde ( <i>Rhizoclonium</i> sp.)
E2.1	Agua marina
G10	Sedimento salino
36R	Sedimento salino

---

## 5.2 Confirmación de presencia de plásmido AHPND en *V. parahaemolyticus* 756.

### 5.2.1 Extracción de DNA y PCR

Con la finalidad de confirmar la presencia de genes *pirA*<sup>VP</sup> que codifican toxinas PirA<sup>VP</sup> de *VpAHPND-756* se realizó extracción de DNA y PCR. La extracción de DNA se realizó según el protocolo de Lina-López y Mejía (2012) para lo cual una colonia de cada muestra fue inoculada en caldo soya tripticasa (TSB, Difco) suplementado con 2% NaCl y se incubó durante 24h a 28°C, posteriormente se centrifugó a 6500 g por 10 min, la pastilla obtenida fue lavada dos veces con 1 ml de PBS 1X (pH 7.4), luego fue resuspendido en 100 µl de PBS + Tween 20 0.05%, se incubó a 100°C por 10 min y se centrifugó a 16,000 g por 10 min, finalmente el sobrenadante fue recuperado. Se verificó la pureza y cantidad de DNA utilizando NanoDrop 2000c (Thermo Fisher), y posteriormente se realizó una PCR siguiendo el protocolo AP3 (Sirikharin et al. 2014) con los iniciadores AP3F - 5' – ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC - 3' y AP3R - 5' – GTGGTAATAGATTGTACAGAA - 3', para el mix de PCR se utilizó el kit PCR SuperMix (Invitrogen<sup>TM</sup>), con el protocolo siguiente: se prepararon 50 µl para cada reacción las cuales contenían 45 µl de PCR SuperMix, 1 µl del primer forward (concentración del stock 10 µM), 1 µl del primer reverse (concentración del stock 10 µM), 1 µl del template de DNA (100 ng) y 2 µl de Agua MiliQ. Después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se agregaron 50 µl de GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain 10,000X Biotium®) por cada 50 ml de agarosa, como buffer de corrimiento se

utilizó TBE 1X, y se le aplicó un voltaje de 100 voltios para visualizar los productos de amplificación de 336 pb.

### **5.3 Evaluación preliminar *in vitro* de la actividad antagonista**

El ensayo preliminar para la actividad antagónica de los aislados fue el método de difusión en pozos de agar. La superficie de cajas Petri con TSA suplementadas con 2% NaCl se inoculó con 100 µl de la cepa 756 (*VpAHPND*) a una densidad de  $1.5 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> y se dispersó con varilla de vidrio y se incubó durante 20 minutos a 30°C. Luego, asépticamente con una puntilla de micropipeta de 200 µl estéril, se perforó un orificio y se agregaron 100 µl de cada cepa de los aislados a una densidad de  $1.5 \times 10^7$  UFC/ml. Las placas se incubaron a 30°C por 24 h, se evaluó la presencia de halos de inhibición y se midieron con el software ImagenJ (Avendaño-Herrera et al. 2005; Schneider et al. 2012). Los aislados bacterianos que generaron halos de inhibición se seleccionaron para ensayos posteriores.

### **5.4 Ensayo de actividad antagonista.**

Con el objetivo de determinar la capacidad antagónica de los aislados, una caja de Petri con agar Mueller-Hinton fue inoculada con 50 µl de un cultivo ( $1.5 \times 10^7$  UFC/ml) de *VpAHPND*-756, se sembró por dispersión y se incubó por 2 h a 30°C. Subsecuentemente, se realizó un ensayo de antagonismo siguiendo la metodología de Li et al. (2017) con algunas modificaciones. Se incubaron a los aislados durante 24 h a 28°C y se emplearon puntillas amarillas de micropipeta de 200 µl estériles para obtener una colonia aislada del cultivo mencionado y fue colocada encima del medio con agar Mueller-Hinton previamente inoculado con *VpAHPND*-756 (Santos-Beneit et al. 2022). El ensayo se realizó por triplicado y los halos de inhibición producidos por los aislados se midieron utilizando el software ImageJ (Schneider et al. 2012); como control negativo se evaluó el efecto de bacteria sin el aislado.

### **5.5 Actividad hemolítica**

Una colonia fresca individual previamente cultivada en cajas de Petri con TSA suplementado con 2% de NaCl (Difco) de cada uno de los aislados se inoculó en agar

sangre con 5% de sangre por estría cruzada. Las placas se incubaron a 30°C por 24 h posterior al cual, el patrón de hemolisis se registró (Baron et al. 1994).

## **5.6 Actividad enzimática**

Se determinó la producción de proteasa de los aislados en placas TSA (Difco) con leche descremada al 2.5% (Sánchez et al. 2004). Para determinar las amilasas, se sembraron placas Mueller-Hinton (Difco) (1.5% de almidón) y revelándose el halo de degradación al agregar Lugol a la placa después de 24 h de incubación (Lealem y Gashe 1994). La actividad celulítica se realizó en Medio Mínimo adicionando carboximetilcelulosa (CMC; Sigma) al 2%. La actividad de celulasa se reveló con rojo Congo (Sánchez et al. 2004). La capacidad enzimática/hidrolítica de las cepas se observó por la formación de halos alrededor de las colonias.

## **5.7 Ensayo de doble capa**

De un cultivo de los candidatos antagonistas, inoculado por estría cruzada en agar TSA suplementado con 2% NaCl durante 24 h a 28°C, se obtuvo una colonia aislada empleando una puntilla amarilla de micropipeta de 20-200 µl, y fue colocada en la superficie de placas de agar Mueller-Hinton (Difco) adicionado con 2 % de NaCl, y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Posteriormente, se añadió una segunda capa de 10 ml de agar Mueller-Hinton semisólido inoculado con 100 µL *Vp*AHPND-756 a una densidad de  $1.5 \times 10^7$  C UFC/ml. Después de 24 h de cultivo a 30°C, se observó un halo de inhibición y se midió utilizando el software ImageJ. El ensayo se realizó por triplicado y como control negativo se evaluó el efecto de las bacterias patógenas sin los aislados (Avendaño-Herrera et al. 2005, Santos-Benit et al. 2022).

## **5.8 Ensayo de toxicidad en nauplios de *Artemia salina* bajo diferentes tratamientos de aislados seleccionados como probióticos potenciales.**

### **5.8.1 Desinfección de quistes de *A. salina*.**

Un gramo de quistes de *A. salina* (INVE®, San Diego, CA) se sumergieron en agua destilada estéril por 15 min. Posteriormente se colocaron en 100 ml de hipoclorito de sodio al 5% (cloro comercial) por 40 s y se enjuagaron abundantemente con agua destilada estéril. Luego se sumergieron en 100 ml de cloruro de benzalconio al 1% (Antibenzil)

durante 30 s y se volvió a enjuagar con abundante agua destilada estéril. Para asegurar que los quistes fueran axénicos, se tomaron 20 µl de la mezcla de agua destilada estéril y los quistes fueron colocados en cajas de Petri con TSA suplementado con 2% NaCl por triplicado y se incubaron 24 h a 35°C. Se utilizaron los quistes que no presentaron crecimiento colonial para los subsecuentes experimentos (Quiroz-Guzmán 2013).

### **5.8.2 Ensayo de toxicidad de los candidatos probióticos en *A. salina***

El gramo (1 g) de *A. salina* fue inoculada en 600 ml de agua destilada estéril que contenía 16 g de sal marina artificial (KENT® Marine Reef Salt) y 2 g de extracto de levadura, con un fotoperiodo constante de 24 h a 30°C en agitación constante (130 rpm). Posteriormente se tomaron los nauplios eclosionados y se colocó 1 nauplio por mililitro por pocillo (10 ml por pocillo) por tratamiento en triplicado, siendo los siguientes: T1-G2, 32a, *Bp*-Son, E2.1, J1, 36R; T2-32a, *Bp*-Son, G2, J1; T3-36R, E2.1, G2, J1, 32a; T4-E2.1, *Bp*-Son, G2, J1, 32a; T5-J1, *Bp*-Son, 32a, E2.1, T6-HA, E2.1, 32a, J1, G2. Las combinaciones de los aislados se añadieron a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml en diferentes dosis de 1 µl, 10 µl y 100 µl. Se incubaron por 24 h a 30°C con fotoperiodo constante y se procedió a registrar la supervivencia de los nauplios (Quiroz-Guzmán 2013).

### **5.9 Extracción de DNA genómico del aislado *Bacillus pumilus* Sonora.**

La extracción del DNA genómica se llevó acabo de un cultivo de 24 horas en medio TSB suplementado con 2% de NaCl con el kit Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega kit, Wizard Genomic DNA Purification Kit, Madison, WI, USA;).

### **5.10 Secuenciación de genoma completo del aislado *B. pumilus* Sonora.**

La preparación de la librería de DNA genómico fue realizada usando el kit Nextera XT Libery Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación del DNA genómico completo se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiniSeq (protocolo  $2 \times 150$  pb paired-end, 300 ciclos; Illumina, San Diego, CA, USA; González-Gómez 2020), en las instalaciones del CIAD, Mazatlán, Sinaloa.

### **5.11 Ensamblaje *de novo*, anotación del genoma, análisis filogenético e identificación de genes involucrados en la síntesis de antimicrobianos del *B. pumilus* Sonora.**

El filtrado de secuencias se realizó en FastQC y TrimGalore versión 2015 (disponibles en línea en <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>). La calidad de las lecturas se analizó con FastQC. Los adaptadores fueron removidos con la herramienta TrimGalore. Las lecturas resultantes fueron ensambladas usando SPAdes v3.12.0 y el protocolo a5 miseq (Bankevich et al. 2012). La anotación del genoma se llevó a cabo en la herramienta RAST (Rapid Annotation using the Subsystem Technology, Overbeek et al. 2014) y la plataforma antiSMASH versión 7 (Medema et al. 2011) se utilizó para buscar genes relacionados para la biosíntesis de antimicrobianos. La posición filogenética de *B. pumilus* Sonora entre los genomas representativos y de referencias listado en la base de datos del NCBI se identificó en la plataforma BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, <https://www.bv-brc.org>). El análisis filogenético de *Bp*-Son se generó obteniendo el gen 16S rRNA y se alinearon en conjunto con secuencias del gen antes mencionado de diferentes especies de *Bacillus*, previamente obtenidas en el análisis en BV-BRC, y se incluyó la cepa-tipo de *Bacillus pumilus*. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Para el alineamiento se utilizó el programa MEGA11 (Tamura et al. 2021), la herramienta Muscle (Edgar, 2004) y posteriormente se realizó un árbol filogenético basado en el método de Maximum Likelihood construido utilizando modelo evolutivo Tamura-Nei I + G con 1000 réplicas de bootstrapping (Kumar et al. 2016).

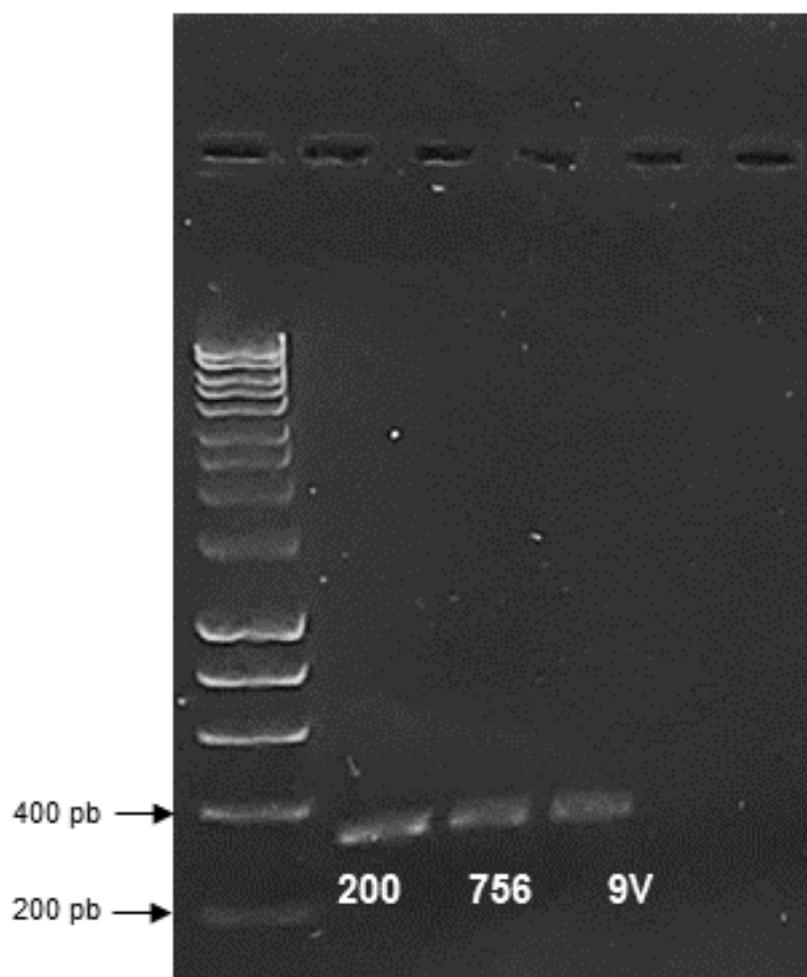
### **5.12 Análisis estadístico.**

Con los datos obtenidos en las pruebas de antagonismo se calcularon las medias de tres repeticiones y las barras de error representaron la desviación estándar de las medias. Se realizó un análisis estadístico de tipo ANOVA para identificar si hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con un intervalo de confianza del 95%, y como prueba *post hoc* la comparación de medias por el método de Tukey. Como software estadístico se utilizó el software Minitab 17 (Minitab Statistical Software, Minitab Inc., PA, USA) y las gráficas se realizaron con el software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 PCR confirmatoria para presencia de genes *pirA*<sup>VP</sup> de *VpAHPND*.

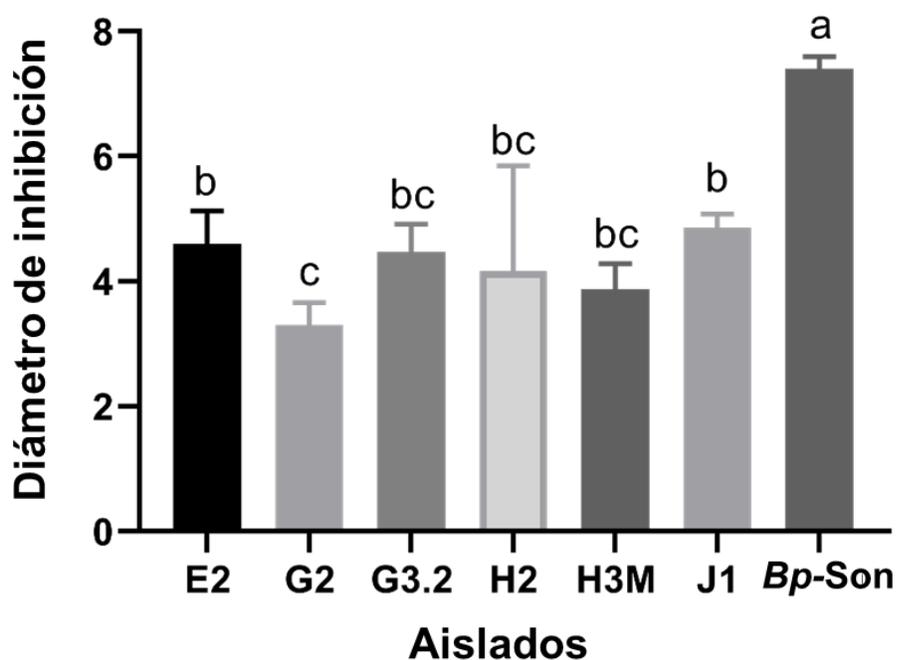
Con la PCR llevada a cabo con el protocolo AP3 se obtuvo la amplificación de la secuencia parcial del gen *pirA*<sup>VP</sup>, confirmando la presencia de genes relacionados a la patogenicidad derivando a la enfermedad AHPND de la cepa 756 de *V. parahaemolyticus* (Fig. 1).



**Figura 1.** Amplificación de gen *pirA*<sup>VP</sup> causante de la enfermedad AHPND en cepas de *Vibrio* sp. (cepa 200 y 9V) y *VpAHPND*-756 en gel de agarosa al 1.5%, marcador molecular de 1000 pb. El producto amplificado tiene un tamaño de 336 pb.

## 6.2 Evaluación preliminar de antagonismo por difusión en pozo de las cepas contra *VpAHPND-756*.

Los resultados obtenidos en el ensayo preliminar para determinar el antagonismo de los 14 aislados contra *VpAHPND-756*, siete mostraron esta capacidad antagónica (Fig. 2 y 3). El aislado que mostró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) fue identificado como *Bacillus pumilus* Sonora (*Bp-Son*) con un diámetro de inhibición promedio de 7.4 mm, mayor que el resto de los aislados.



**Figura 2.** Diámetro de inhibición (mm) de los aislados contra *VpAHPND-756* para el ensayo de difusión en pozo. Los datos muestran las medias de tres repeticiones y la barra de error representa la desviación estándar de las medias. Se llevó a cabo una ANOVA con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  y como prueba post hoc el método de Tukey.

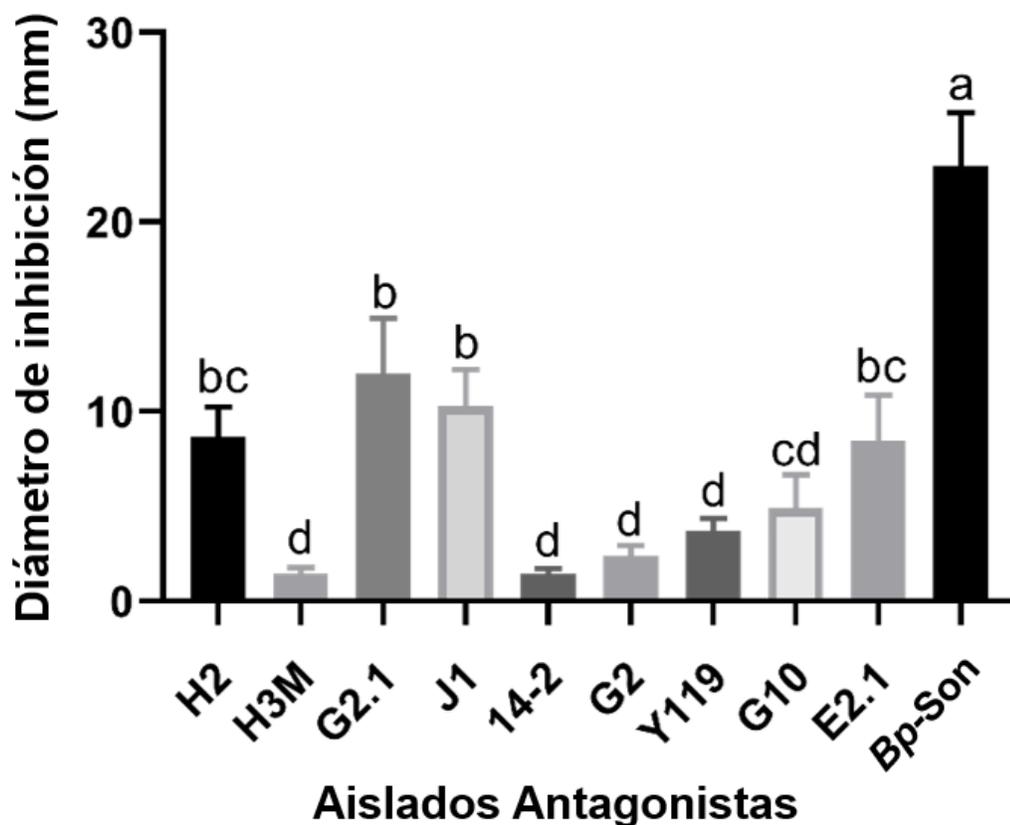


**Figura 3.** Ensayo de difusión en pozo del aislado J1 (izquierda) y el aislado *Bp-Son* (derecha), los cuales mostraron el halo de inhibición de mayor tamaño contra *VpAHPND-756*, de 4.3 y 7.5 mm de diámetro respectivamente. C= Control Negativo.

En el ensayo de actividad antagonista (Fig. 4 y 5), el aislado *Bp-Son* tuvo una inhibición mayor estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), seguido de G2.1 y J1, con un diámetro de inhibición medio de 22.9, 12 y 10.3 mm respectivamente. Por otra parte, en el ensayo de doble capa (Fig. 4 y 5), el aislado *Bp-Son* tuvo un diámetro de inhibición significativamente mayor ( $P < 0.05$ ), seguido de J1 y 43 presentando un diámetro promedio de 14.3, 12.2 y 11.1 mm, respectivamente.

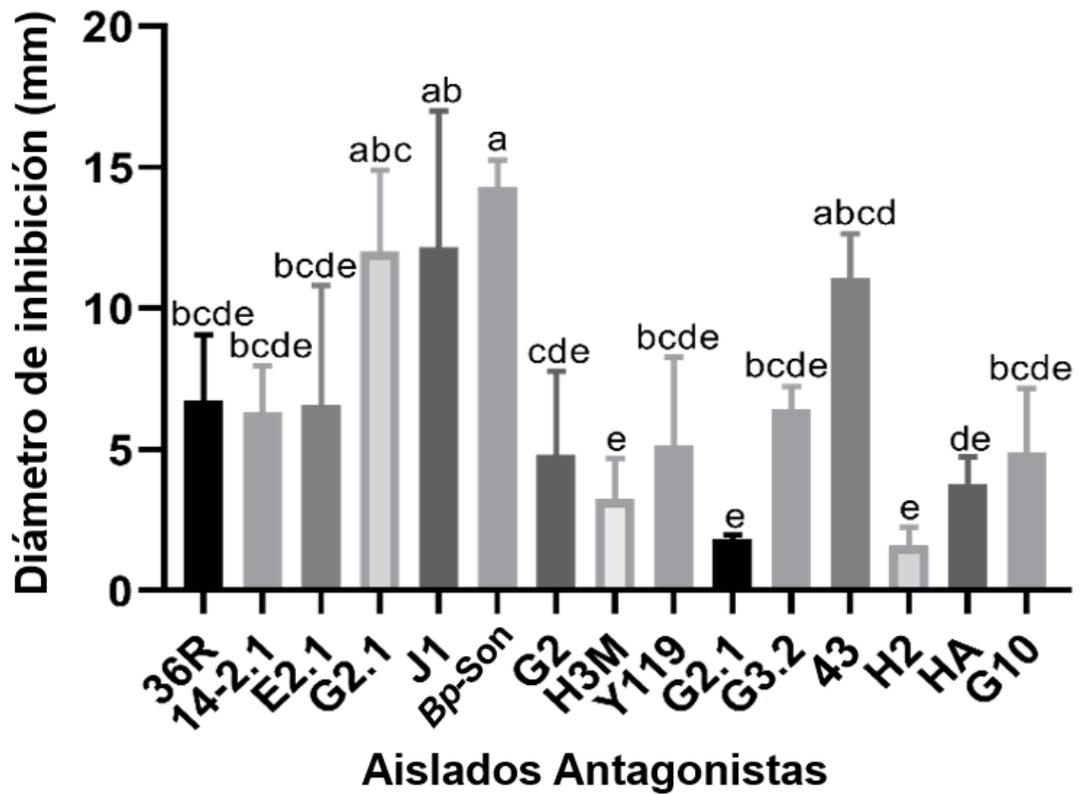


**Figura 4.** Ensayo de actividad antagonista. Se muestran a unos de los aislados, G2.1 y *Bp-Son*, con actividad inhibitoria contra *VpAHPND-756* (inoculación por extensión, fondo). Se observa la formación halos de inhibición por parte de los aislados contra el patógeno. C= Control negativo (sin inóculo de aislado bacteriano)

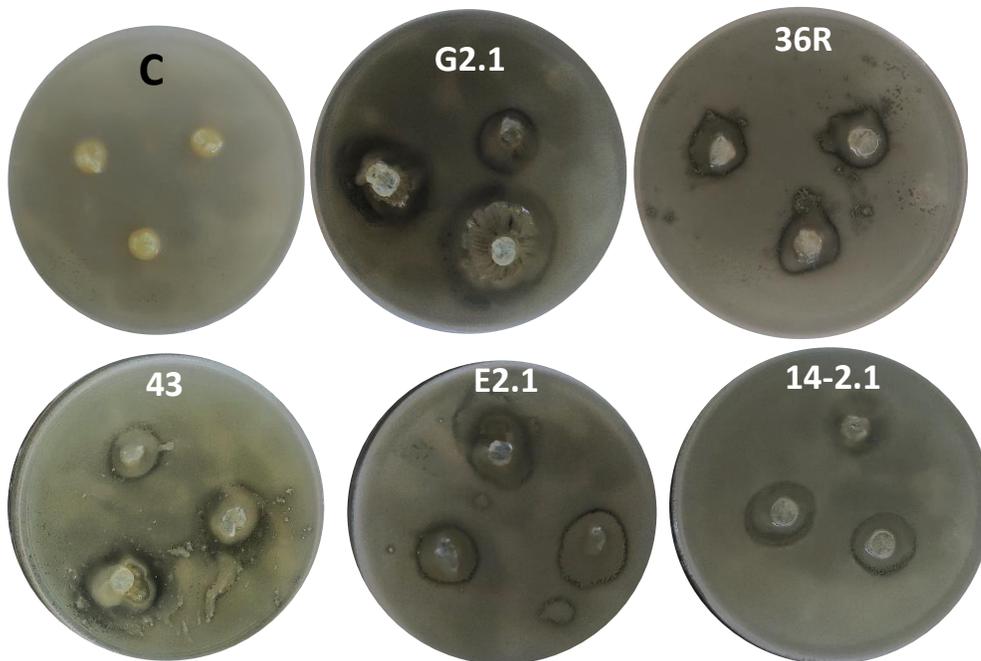


**Figura 5.** Diámetro de inhibición (mm) de los aislados contra *VpAHPND-756* en el ensayo de actividad antagonista. Los datos muestran las medias de tres repeticiones y la barra de error representa la desviación estándar de las medias. Se llevó a cabo una ANOVA con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  y como prueba post hoc el método de Tukey.

De igual forma, en el ensayo de doble capa (Fig. 5), el aislado *Bp-Son* tuvo un diámetro de inhibición significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a comparación de los otros aislados, seguido de J1 y 43, presentando un diámetro promedio de 14.3, 12.2 y 11.1 mm, respectivamente.



**Figura 6.** Diámetro de inhibición (mm) de los aislados contra *VpAHPND-756* en el ensayo de doble capa. Los datos muestran las medias de tres repeticiones y la barra de error representa la desviación estándar de las medias. Se llevó a cabo una ANOVA con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  y como prueba post hoc el método de Tukey.





**Figura 7.** Ensayo de doble capa. Se observan a los aislados con el mayor efecto antagónico contra *VpAHPND-756*, siendo *Bp-Son* el de mayor diámetro de inhibición con 14.3 mm. C= control negativo (*VpAHPND-756* + ausencia de aislados).

### 6.3 Actividad hemolítica y enzimática de los aislados.

En cuanto a la actividad hemolítica de los aislados (Tabla 2) siete aislados H3M, H2, *Bp-Son*, E2.1, HA y 43 presentaron gama-hemólisis. Los aislados G2.3 y Y119 presentaron alfa-hemólisis, en tanto que aislados G10 y J1 beta-hemólisis (Fig. 9). En el caso de los aislados 32a y G2, no fue posible determinar el tipo de hemólisis debido a su ausencia de crecimiento en agar sangre. Por otra parte, en los ensayos enzimáticos (Tabla 2 y Fig. 8) se determinó que G2, G3.2, *Bp-Son*, E2.1, G10 y 32a presentaron actividad proteolítica; la actividad amilolítica solo se observó en los aislados H3M y G2, mientras que la actividad celulolítica se observó en todos los aislados excepto H3M y 32a. La actividad enzimática y antagonista de los aislados fue decisiva en la selección de los aislamientos que se utilizaron para análisis posteriores. Los aislados *Bp-Son*, G2, J1 y E2.1 presentaron la mayor capacidad antagónica contra el patógeno in vitro, así como la producción de enzimas relacionadas con una mejor digestión o absorción de nutrientes, características de interés para denominar a un microorganismo como probiótico.

Tabla 2. Ensayos de actividad hemolítica y enzimática de los aislados.

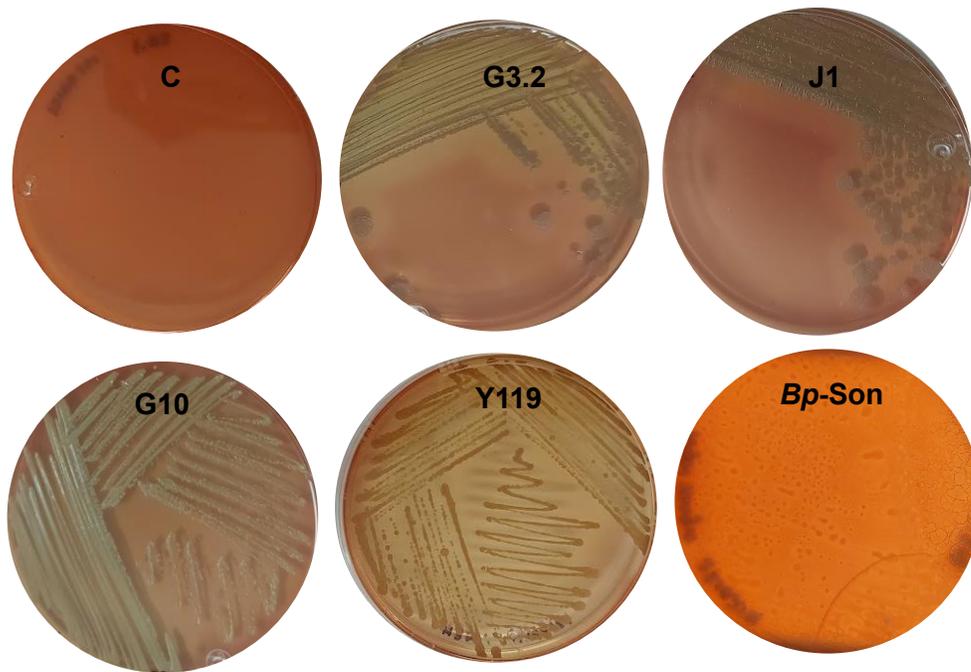
Aislado	Hemólisis	Actividad Enzimática		
		Proteasa	Amilasa	Celulasa
H3M	$\gamma$	-	+	-
J1	$\beta$	-	-	+

H2	$\gamma$	-	-	+
G2.1	$\gamma$	-	-	+
G2	N/D	+	+	+
G3.2	$\alpha$	+	-	+
<i>Bp</i> -Son	$\gamma$	+	-	+
Y119	$\alpha$	-	-	+
E2.1	$\gamma$	+	-	+
G10	$\beta$	+	-	+
HA	$\gamma$	-	-	+
32a	N/D	+	-	-
43	$\gamma$	+	-	+

Positiva (+), Negativa (-), no determinada (N/D)



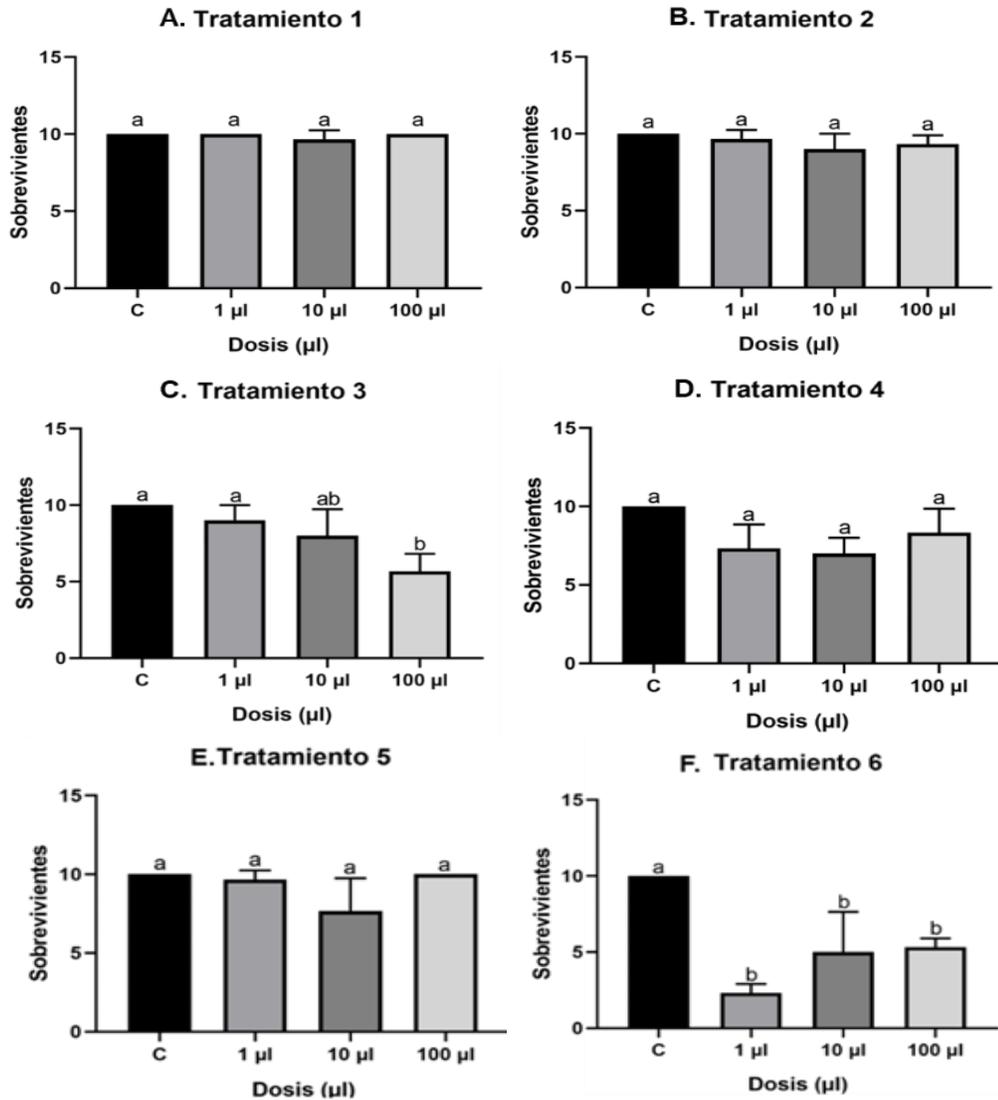
**Figura 8.** Ensayos enzimáticos para producción amilasas, proteasas y células. Se puede observar halos de solubilización por parte de los aislados rotulados. En el caso de *Bp*-Son el aislado es negativo para presencia de amilasas, pero positivo para celulasas y proteasas.



**Figura 9.** Actividad hemolítica de los aislados. Se muestran a los aislados que generaron  $\alpha$ -hemólisis (G3.2 y Y119),  $\beta$ -hemólisis (G10 y J1) y a *Bp-Son* que mostro  $\gamma$ -hemólisis (ausencia de lisis).

#### **6.4 Toxicidad de los aislados con potencial probiótico sobre *A. salina***

Se determinó que la combinación de los aislados y las dosis utilizadas resultaron ser seguras para el tratamiento 1 – 5 (Fig. 10), ya que se presentó una mortalidad de ~1 nauplio en dichos tratamientos. El tratamiento 6 fue descartado ya que presentó una mayor mortalidad de nauplios.



**Figura 10.** Sobrevivencia de nauplios de *A. salina* inoculados con diferentes combinaciones de aislados como probióticos potenciales. Los datos que se muestran son medias de tres repeticiones y las barras de error representan la desviación estándar de la media. Se realizó una ANOVA con un nivel de significancia de  $P < 0.05$  y el método de Tukey como prueba post hoc. Las medidas que no comparten letra son significativamente diferentes. A. Tratamiento 1: aislados G2, 32a, *Bp*-Son, E 2.1, J1, 36R; B. Tratamiento 2: aislados 32a, *Bp*-Son, G2, J1; C. Tratamiento 3: aislados 36R, E2.1, G2, J1, 32a; D. Tratamiento 4: aislados E 2.1, *Bp*-Son, G2, J1, 32a; E. Tratamiento 5: aislados J1, *Bp*-Son, 32a, E2.1; F. Tratamiento 6: aislados HA, E 2.1, 32a, J1, G2.

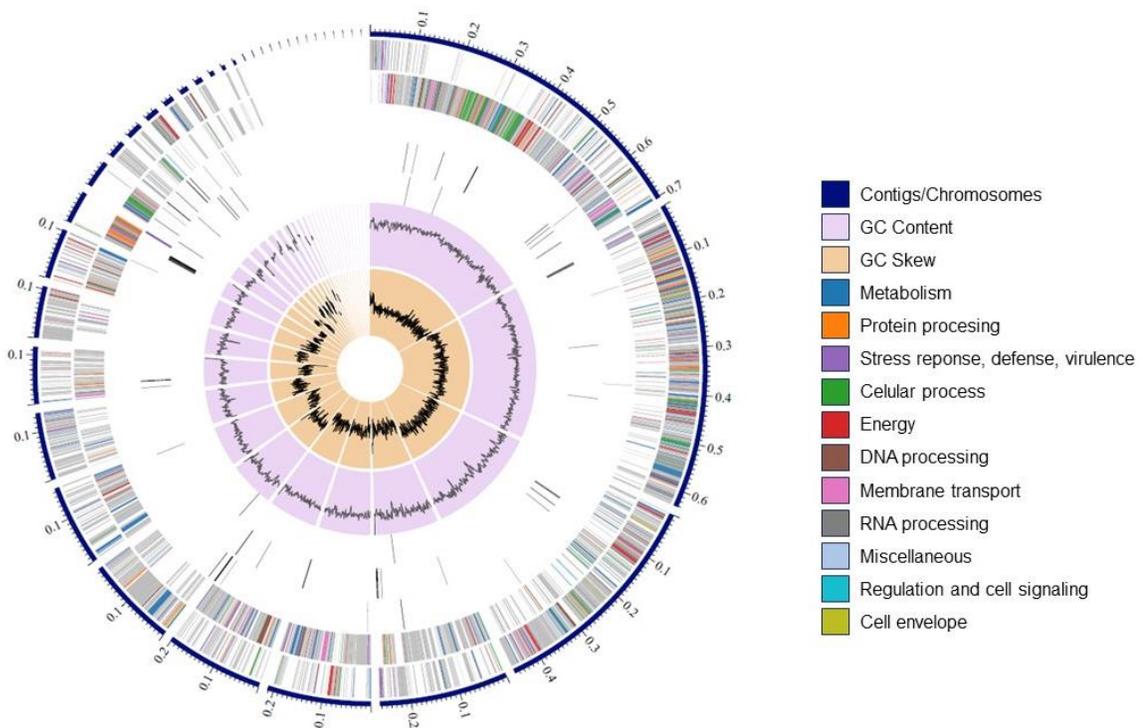
## 6.5 Ensamblaje *de novo*, anotación y análisis filogenético de *Bp-Son*.

Las características del genoma del aislado *Bp-Son* están contenidas en la Tabla 3. Después de filtrar las secuencias con TrimGalore para eliminar secuencias adaptadoras de secuenciación y ensamblar *de novo* siguiendo el pipeline a5, se obtuvieron un total de 37 contigs, un genoma con una longitud de 3,600,890 pb, con un contenido de 41.74% de GC, un N<sub>50</sub> de 264,060 y una cobertura media de 190. Después de su ensamblaje, la anotación del genoma completo se realizó mediante Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) v2.0.

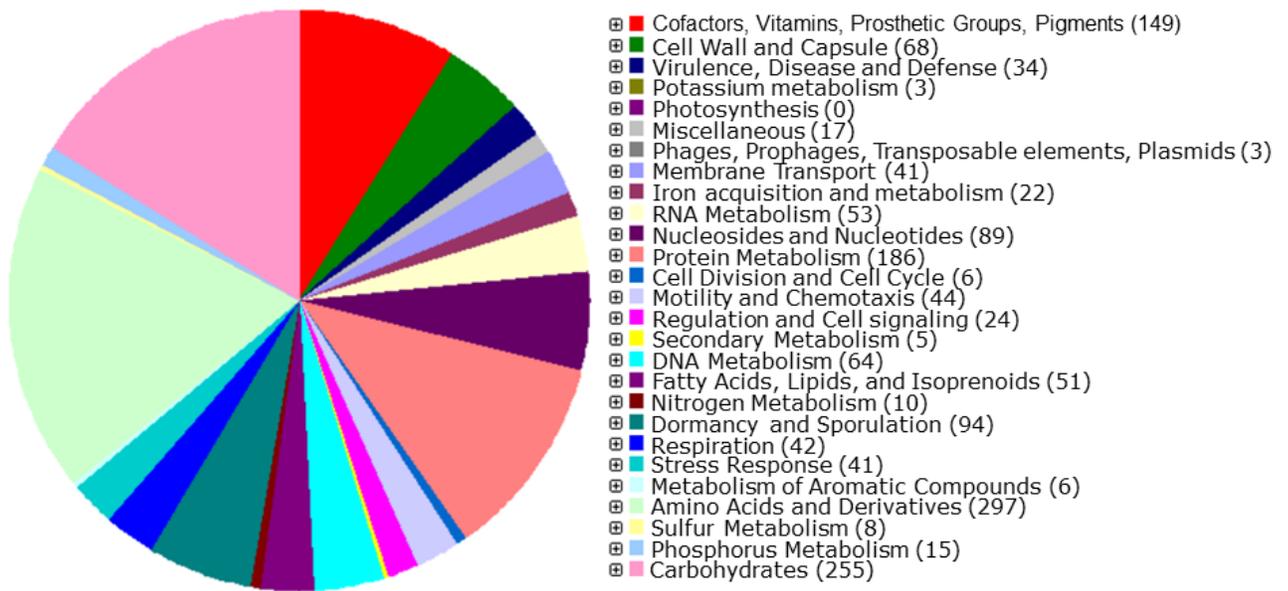
**Tabla 3.** Características del genoma de *Bacillus pumilus* Sonora

<i>Bacillus pumilus</i> Sonora ( <i>Bp-Son</i> )	
Características	Valores
Longitud del Genoma	3,600,890 pb
Contenido GC	41.74%
Plásmidos	0
Conting L <sub>50</sub>	4
Contig N <sub>50</sub>	264,060
Cobertura EC	213.32
Cobertura Promedio	190
Numero de secuencias codificantes	3,734
Numero de subsistemas	327
tRNA	70

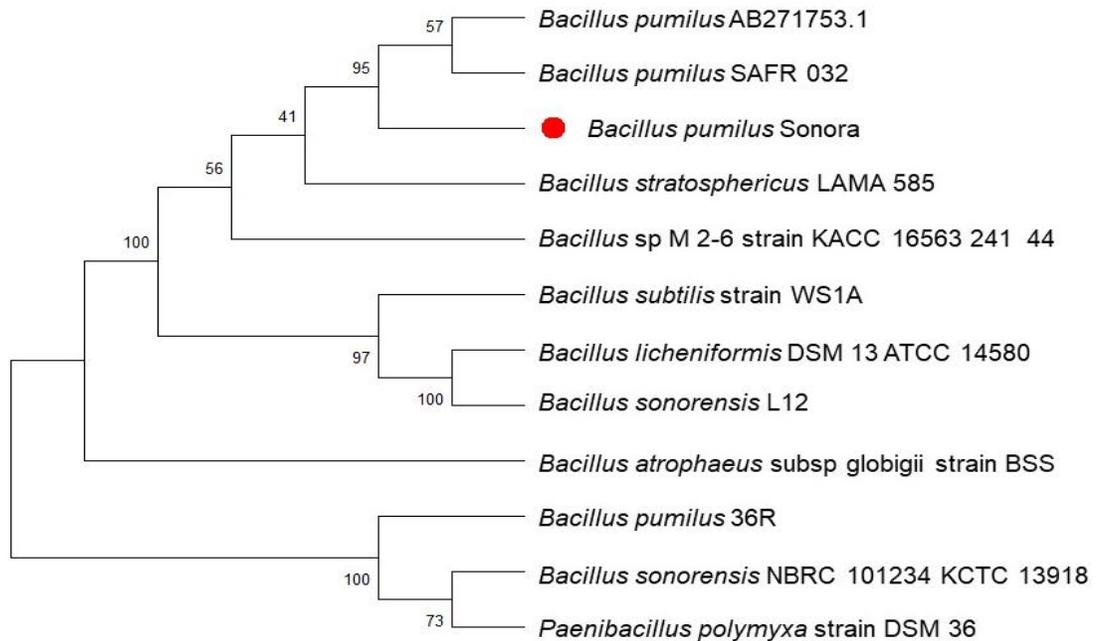
Se predijeron un total de 3.734 genes codificadores de proteínas que se identificaron en 327 subsistemas (Fig. 11 y 12) de los cuales 7 genes están relacionados con la biosíntesis de bacteriocinas y péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente (bacitracina), 6 genes relacionados con la homeostasis del cobre, 2 asociados con la resistencia a cobalto-zinc-cadmio, 5 posibles genes relacionados con el metabolismo secundario (alquilpirona sintasa y biosíntesis de auxinas), 10, 11 y 41 genes involucrados con el metabolismo del nitrógeno, fósforo y respuesta al estrés, respectivamente. En total, el genoma del aislado *Bp*-Son contiene 80 secuencias codificantes de RNA, siendo 70 tRNA y 10 rRNA. La bacteria no tiene plásmidos (Tabla 3). El análisis filogenético utilizando el gen 16S rRNA mostró que el aislado *Bp*-Son se relaciona con *Bacillus pumilus* (Fig. 13).



**Figura 11.** Gráfico circular del genoma de *B. pumilus* Sonora (*Bp*-Son). Incluye, del anillo exterior al anillo interior, los contigs, CDS de la hebra + (forward), CDS de la hebra – (reverse), genes de RNA, contenido GC, y sesgo GC. Los colores de los CDS en la hebra forward y reverse indican el subsistema a los cuales pertenecen estos genes.



**Figura 12.** Subsistemas contenidos en el genoma de *Bp*-Son obtenidos con RAST. Cada color representa un subsistema y los números contenidos en los paréntesis la cantidad de genes relacionados a dicho subsistema.



**Figura 13.** Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA y en el método de máxima verosimilitud (ML), construido por el modelo evolutivo Tamura-Nei con 1000 réplicas.

Basado en el análisis de antiSMASH versión 3.0 (Tabla 4), los antimicrobianos predichos en el genoma de *Bp*-Son consiste en un NRPS (non-ribosomal peptide synthetase; péptido sintetasa no ribosomal) parecido al clúster biosintético de genes (BGC = Biosintetic Gene Cluster) de surfactina, una betalactona con BGC similar a Fengicina, un clúster híbrido de NI-sideróforo y terpeno con un BGC similar a esquizoquina, NRP-metaloporo similar a Bacillibactina, clúster híbrido NRPS y PKS (policétido sintasa) tipo 1 (T1PKS) similar a Paenilamicina, dos NRPS similares a Liquenisina; se determinó otro tipo de metabolito secundario con un BGC similar a Bacilisina. Se determinaron cinco BGC no identificados: Terpeno, un BCG conteniendo un elemento precursor de reconocimiento RiPP, betalactona (RRE-containing), uno parecido a péptidos sintetizados ribosolamente y modificados postraduccionalmente (RiPP), y PKS tipo 3.

**Tabla 4.** Clúster Biosintético de genes relacionados a la síntesis de antimicrobianos contenidos en el genoma de *Bp*-Son.

<b>Biosíntesis de Metabolitos Secundarios de <i>Bp</i>-Son</b>	
<b>Tipo</b>	<b>Clúster Biosintético de Genes similar conocido</b>
NRPS	Surfactina
Betalactona	Fengicina
Terpeno	N/D
NI-sideróforo, terpeno	Esquizoquinas
RRE-containing	N/D
Betalactona	N/D
RiPP-like	N/D
T3PKS	N/D
NRP-metaloporo	Bacillibactina

NRPS, T1KPKS	Paenilamicina
(2) NRPS	Liquenisina
Otros	Bacilisina

N/D = No Determinado

## 7. DISCUSIÓN

A nivel mundial, el cultivo de camarón ha contribuido significativamente a la acuicultura, ya que su producción ha ido incrementándose, sin embargo, como se ha mencionado, su cultivo se ve afectado por diversas enfermedades generando pérdidas económicas importantes (Zheng y Bossier, 2023). Uno de los patógenos más relevantes es *Vibrio parahaemolyticus* (*VpAHPND*), causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda, considerada como una constante amenaza en la industria camaronera (Kumar et al. 2021). Se han identificado varias alternativas para su tratamiento, agentes que no sean antibióticos, debido a la resistencia que este patógeno ha generado, por lo que la aplicación de microorganismos probióticos ha sido una alternativa a la utilización de estos ya que, además de proteger al camarón contra enfermedades también tienen otros efectos benéficos en su crecimiento y respuesta inmunitaria, entre otros. En este estudio se analizaron varios aislados microbianos para determinar su capacidad antagónica contra *VpAHPND*, y además de determinar varias características de interés para ser considerado como un probiótico potencial y, posteriormente realizar análisis genómicos del mismo.

Se determinó, mediante distintas metodologías, la actividad antagónica contra *VpAHPND*-756 de 13 aislados bacterianos, y encontramos que *Bp*-Son presentó la mejor capacidad inhibitoria de los aislados, a excepción del ensayo de doble capa, sin embargo, continuó siendo uno de los principales inhibidores del patógeno. Se han presentado reportes sobre la actividad antagónica de bacterias contra diferentes cepas de *Vibrio* sp., siendo esta una estrategia alternativa a diversos agentes químicos y antibióticos para el control del patógeno en camarones (Chahad et al. 2012; Zokaeifar et al. 2012). Burks et al. (2017) identificaron metabolitos secundarios que pueden contribuir a la capacidad antagónica a través de la producción de compuestos como las bacteriocinas que, a través de diferentes condiciones como la competencia bacteriana, liberan estas moléculas, e inhiben a otras bacterias.

Se realizaron ensayos enzimáticos de proteasas, celulasas, amilasas, y la actividad hemolítica de los aislados. En el caso de *Bp*-Son, presentó actividad celulítica y proteolítica, por lo que además de ser antagonista de *VpAHPND*-756 posee enzimas que podrían mejorar la actividad digestiva al descomponer macromoléculas complejas

haciendo que los nutrientes sean más accesibles para el camarón (Kewcharoen y Srisapoome, 2019). Dawood et al. (2019) menciona que el incremento de la secreción de enzimas digestivas, como lo son las proteasas, amilasas y lipasas puede contribuir al proceso digestivo y la producción de nutrientes, resultando en la utilización de estos por el hospedero para su crecimiento, mejorando su supervivencia y salud. El aislado *Bp*-Son presentó hemólisis gamma, por lo que su utilización en humanos y camarones no tendría un efecto negativo (Partida-Arangure et al. 2013).

Los tratamientos 1-5 resultaron ser seguros para su utilización en los ensayos *in vivo* con camarones, ya que presentaron una menor mortalidad de nauplios de *Artemia salina*. En un estudio realizado por Quiroz et al. (2013), utilizando *Artemia franciscana* y una metodología similar al presente trabajo, proponen este ensayo como un criterio importante para demostrar que estas cepas que serán utilizadas como probióticos potenciales son seguras de utilizar con organismos cultivados.

Basados en los análisis filogenéticos, se identificó al aislado como *Bacillus pumilus*. Entre las diversas especies de probióticos descubiertas, las especies del género *Bacillus* poseen las mejores propiedades probióticas debido a que producen sustancias antimicrobianas que tienen actividad contra muchas bacterias de interés en la acuicultura, además su capacidad de esporulación, característica que hace a las bacterias pertenecientes a este género extender su periodo de efectividad, dándoles una doble ventaja en términos de supervivencia en diversos ambientes comparado a otros probióticos (Kuebutornye et al. 2019). Algunos de los mecanismos por los cuales las especies de *Bacillus* inhiben patógenos, además de la síntesis de antimicrobianos son mediante la competición por sitios de adhesión, inhibición de expresión de genes de virulencia por *quorum quenching* y la producción de enzimas líticas (Pinchuk et al. 2001; Musthafa et, al 2011, Suva et al. 2017). La cepa de *Bacillus pumilus* con los que *Bp*-Son comparte mayor similitud es *Bacillus pumilus* SAFR-032. Éste último produce esporas con una alta resistencia la radiación UV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, derivado a la presencia de enzimas como es una fotoliasa que repara los dímeros de ciclobutano-pirimidina, catalasas, que son enzimas que convierten el peróxido en agua y oxígeno, y peroxiredoxinas y peroxidasas las cuales reducen el peróxido en agua (Gioia et al. 2007), sin embargo, esta bacteria no se ha evaluado como

probiótico en la acuicultura. Estudios de genómica comparativa entre *B. pumilus* SAFR-032 y *Bp*-Son podrían brindar información sobre la existencia de genes de resistencia a peróxido de hidrógeno en *Bp*-Son ya que le podría ser utilizado como un antioxidante aliviando el estrés oxidativo en el cultivo de camarón.

En el caso del genoma de *B. pumilus* SAFR-032 (Stepanov et al. 2016) tras la anotación del genoma, este contenía 3710 genes codificantes para proteínas, 21 rRNA y 72 tRNA. En el caso de *Bp*-Son se determinaron 3734 secuencias codificantes, 70 tRNA y 10 rRNA, comparado con los datos anteriores, *Bp*-Son contiene 24 genes codificantes más que SAFR-032, sin embargo, esta última contiene 11 rRNA ribosomales y 2 tRNA más comparado a *Bp*-Son. En otro estudio realizado por Sánchez-Díaz et al. (2022), en el caso de *Bacillus pumilus* 36R ATNSAL, aislada de sedimentos salinos, presentó un tamaño de genoma de 3,941,096 bp, con un contenido GC del 41.1%, fue ensamblado en 283 contigs, presentaba un N50 49.07 kbp, un total de genes codificantes de 3947, 14 rRNA y 70 tRNA. En comparación al genoma de *Bp*-Son su genoma presentó una longitud de 3,600,890 bp, un contenido GC de 41.74%, N50 de 26.4 kbp y tiene una variación de 4 rRNA y 240 secuencias codificantes menos comparado con 36R ATNSAL.

Basados en el análisis de antiSMASH, *Bp*-Son contiene un clúster de genes biosintético de surfactina. La bacteria *Bacillus velezensis* FZB42, conocida por ejercer un efecto antagonista contra patógenos de plantas mediante la producción de diversos agentes antimicrobianos (Rabbee y Baek, 2020), entre ellos la surfactina, el cual es un lipopéptido anfífilo cíclico no ribosomal, consistiendo en un péptido metamérico acíclico unido a una cadena de ácido graso beta-hidroxi e interactúa con la membrana celular. Las surfactinas inhiben el crecimiento de la biopelícula (biofilm) de *Salmonella* sp. e inhibe la adhesión de *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens* en más de un 54% (Kumar et al. 2023). Por otro lado, el genoma contiene un BGC parecido a Fengicina, el cual es un lipopéptido cíclico que se utiliza como fungicida, sintetizado por *Bacillus subtilis* como una respuesta inmunitaria contra la infección fúngica dañando la membrana celular del blanco (Sur et al. 2018). Otro BGC predicho es similar al sideróforo esquizoquina. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que actúan como quelantes de hierro, muchos microorganismos los secretan para recoger hierro férrico del

ambiente (Stintzi et al. 2000). Las esquizoquinas son sideróforos del tipo hidroxamato con un poderoso quelante de  $Fe^{3+}$  y antioxidante (Wang et al. 2022), a pesar de estas características, este sideróforo no ha sido estudiado en la acuicultura. Se predijo también un BGC similar a Bacilisina, el cual es un alguicida que causa cambios en la pared celular de algas y las membranas celulares de organelos, resultando en su lisis, por lo que se utiliza para suprimir el crecimiento de especies de algas peligrosas, así como también tiene actividad anticianobacteriana lo que ayuda a mitigar los efectos peligrosos de los brotes de algas (Wu et al. 2014). En un estudio realizado por Wang et al. (2021), determinaron que *B. velezensis* GY65 posee un núcleo de genes codificantes para la síntesis de bacilisina, defensinas, macrolactinas y surfactinas lo que le confiere a la bacteria capacidad antagónica contra bacterias patogénicas, además de ayudar a la prevención y control de enfermedades en animales acuáticos. El genoma de *Bp*-Son también contiene un BGC similar a bacillibactina. En el caso de las bacillibactinas E y F provenientes de *Bacillus* sp., el cual fue aislado de una esponja marina, son sideróforos bacterianos que contienen fracciones de ácido nicotínico y bezoico (Wu et al. 2022). La bacillibactina, detectada en *Bp*-Son es un agente con potencial antimicrobiano que puede utilizarse contra patógenos multidrogoresistentes como lo son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Chakraborty et al. 2021), por lo que podría ser uno de los mayores responsables de actividad antagónica contra *VpAHPND*.

La secuenciación del genoma completo de *B. subtilis* BSXE-1601, la cual anteriormente se había reportado como antagonista contra varias especies patógenas del género *Vibrio* incluyendo *VpAHPND*, también indica que alberga otros genes que codifican para bacillibactina, fengicina, surfactina and subtilosina A, ya reportados con actividad antagónica contra cepas patogénicas (Wang et al. 2020). Algunos de los metabolitos producidos por *B. subtilis* BSXE-1601 también son producidos por *Bp*-Son la cual, en el presente trabajo, se ha determinado su capacidad antagónica contra *VpAHPND*, por lo que los metabolitos responsables de esta inhibición podrían ser los antes mencionados, además esta bacteria podría tener un alto potencial para ser utilizada como un agente biológico multifuncional en la acuicultura contra diferentes microorganismos de interés acuícola. Para comprobar si la capacidad biosintética de los compuestos antimicrobianos

encontrados en *Bp*-Son es específica en esta bacteria, se necesitan realizar estudios de genómica comparativa para esta y otras especies de *Bacillus* y cepas de *B. pumilis*. En el caso de *B. pumilis* y otras tres especies (*Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* y *Micrococcus luteus*) están incluidas en los probióticos comerciales para acuicultura (Prowins Biotech Private Ltd., India), aunque no se han probado contra *Vp*AHPND ni específicamente en la acuicultura de camarón, donde las bacterias que se han utilizado con éxito como probióticos pertenecen a los géneros *Vibrio* y *Bacillus* (Ninawe y Selvin 2009). También se ha informado que algunos aislados bacterianos de sedimento salino, como es el caso de la fuente de aislamiento de *Bp*-Son, son excelentes probióticos para eliminar *Vp*AHPND, incluidos *B. safensis* 13L LOBSAL y *B. pumillus* 36R ATNSAL; adicionalmente, las especies de *Bacillus* se han utilizado frecuentemente como probióticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en plantas, humanos y animales debido a su producción de bacteriocinas, tripsina, lipasa, amilasa y péptidos antimicrobianos (Sánchez-Díaz et al. 2022 ), similar a los resultados reportados aquí para la *Bp*-Son.

## 8. CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró que el aislado bacteriano *Bp*-son, identificado posteriormente como *Bacillus pumilus* tiene potencial probiótico en camarón porque presentó actividad antagónica *in vitro* contra uno de los patógenos más importantes en la acuicultura del camarón *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (*Vp*AHPND) el cual tiene alta tasa de mortalidad y resistencia a antimicrobianos usados comúnmente en este ámbito. Además, presentó características deseables para ser considerado como probiótico, tales como la producción de enzimas proteasas y celulasas que, como se mencionó anteriormente, ayudan a los organismos acuáticos a tener una mejor captación de nutrientes y digestión, conllevando a su ganancia en peso y longitud.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el estudio del genoma proveen el conocimiento de antimicrobianos producidos y los posibles mecanismos por los cuales *Bp*-Son antagoniza al patógeno *Vp*AHPND, por lo que las secuencias genómicas y su análisis son una prueba inequívoca que apoya el potencial antagonista de la bacteria, y su alto potencial para ser aplicado como un agente biológico multifuncional en la acuicultura.

## 9. PERSPECTIVAS A FUTURO

La producción de probióticos funcionales para la acuicultura es de gran importancia debido a la resistencia a antimicrobianos por parte de patógenos que se presenta actualmente en bacterias de importancia en la industria camaronea. *Bacillus pumilus* Sonora (*Bp*-Son) presentó características deseables como probiótico en camarones por lo que es importante seguir realizando estudios en campo para su futura introducción en granjas camaroneras en México.

Para comprender plenamente el mecanismo de acción de *Bp*-Son y su potencial para prevenir infecciones por *Vp*AHPND, es necesario caracterizar las interacciones entre el probiótico, la microbiota nativa del camarón y el patógeno. Estudios detallados del microbioma del animal permitirán evaluar los cambios en la composición y diversidad microbiana a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones experimentales.

Otro de los principales enfoques a futuro son el aislamiento y caracterización de los compuestos antimicrobianos predichos mediante análisis bioinformáticos, además de comparaciones genómicas con otras bacterias con la finalidad de identificar secuencias únicas en el genoma de *Bp*-Son que puedan conferirle una ventaja competitiva frente a *Vp*AHPND, así como explorar la posibilidad de encontrar secuencias genómicas con potencial biotecnológico para el desarrollo de agentes antimicrobianos más eficientes frente a distintos patógenos importantes en la acuicultura del camarón. .

Por último, se plantea la evaluación de la *Bp*-Son junto a otras bacterias evaluadas en el este proyecto en bioensayos *in vivo* con la finalidad de obtener una formulación que pueda comercializarse en la industria camaronera.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Asche F, Anderson JL, Botta R, Kumar G, Abrahamsen EB, Nguyen LT, Valderrama D. 2021. The economics of shrimp disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 186:107397. DOI: 10.1016/j.jip.2020.107397.

Avendaño-Herrera R, Lody M, Riquelme CE. 2005. Production of inhibitory substances among bacterial biofilms on marine substrates. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40:117–125. DOI: 10.4067/S0718-19572005000200004.

Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114(3-4):173-186. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5):455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, MO. 9th ed., p. 415.

Benela M, Vaiyapuri M, Sivam V, Raveendran K, Monthadaka M, Badireddy M. 2023. Genome characterization and infectivity potential of vibriophage -  $\phi$  LV6 with lytic activity against luminescent vibrios of *Penaeus vannamei* shrimp aquaculture. *Biotechnological Applications of Phage and Phage-Derived Proteins* 15(4): 868. DOI: 10.3390/v15040868.

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. 2012. Probiotic mechanisms of action. *Annals of nutrition and metabolism* 61(2): 160–174. DOI: 10.1159/000342079.

Burks DJ, Norris S, Kauffman KM, Joy A, Arevalo P, Azad RK, Wildschutte. 2017. Environmental vibrios represent a source of antagonistic compounds that inhibit

pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Microbiology Open* 6(5):e00504. DOI: 10.1002/mbo3.504

Chahad QB, Bour ME, Calo-Mata P, Boudabus A, Barros-Velazquez J. 2012. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. *Research in Microbiology* 163(1):44-54. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.08.005

Chakraborty K, Kizhakkekalam VK, Joy M, Chakraborty RD. 2021. Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 106: 329–340. DOI: 10.1007/s00253-021-11632-0.

Chandrakala N, Priya S. 2017. Vibriosis in shrimp aquaculture a review. *Journal of Scientific Research in Science* 3(2):27-33.

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2021. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2021. CONAPESCA, México.

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2024. Se posiciona México como el segundo mejor productor de camarón en Latinoamérica. Recuperado de: <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/se-posiciona-mexico-como-el-segundo-mejor-productor-de-camaron-en-latinoamerica?idiom=es-MX>

Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COSAES). 2009. Programa de trabajo de sanidad acuícola del programa de soporte para camarón, informe del ciclo 2009. COSAES [Online] Disponible en: [https://www.cosaes.org/\\_files/ugd/836e23\\_4203d332780d4646a06d11c688ef08ed.pdf](https://www.cosaes.org/_files/ugd/836e23_4203d332780d4646a06d11c688ef08ed.pdf)

Dawood MA, Koshio S, Abdel-Daim MM, Van Doan H. 2019. Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews Aquaculture* 11(3):907–924. DOI: 10.1111/raq.12272.

Decamp O, Moriarty DJW, Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research* 39(4): 334-338. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x

- Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25: 472–479. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.08.001.
- Devaraja T, Banerjee S, Sariff YM, Khatoon H. 2013. A holistic approach for selection of *Bacillus* spp. as a bioremediator for shrimp postlarvae culture. *Turkish Journal of Biology* 37: 91-100. DOI: 10.3906/biy-1203-19.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340
- Farzanfar A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 48(2):149-158. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x
- Flegel TW. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 166–173. DOI: 10.1016/j.jip.2012.03.004.
- Food And Agricultural Organization of the United Nations. 2001. Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO, Cordoba.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2018. DOI: 10.4055/cc0461en
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. The state of world fisheries and aquaculture 2022. DOI: 10.4060/cc0461en
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology* 66(5): 365–378.
- Galaviz-Silva L., Robles-Valdez A, Sanchez-Diaz R, Ibarra-Gamez JC, Gomez-Gil B, Molina-Garza ZJ. 2021. *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute hepatopancreatic necrosis disease in farming shrimp of Sonora, Mexico and their antibiotic resistance. *Hidrobiológica* 31 (2): 111-123.

Gioia J, Yerrapragada S, Qin X, Jiang H, Igboeli OC. 2007. Paradoxical DNA repair and peroxide resistance gene conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032. PLoS ONE 2(9): e928. DOI:10.1371/journal.pone.0000928

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.

Gómez-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 Announcements. 2(2):e00055-14.

Gonzalez-Gomez JP, Soto-Rodriguez S, Lopez-Cuevas O, Castro-Del Campo N, Chaidez C, Gomez-Gil B. 2020. Phylogenomic analysis supports two possible origins for Latin American strains of *Vibrio parahaemolyticus* associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). Current Microbiology 7(12):3851-3860. DOI: 10.1007/s00284-020-02214-w

Gonzalez-Rivas DA, Tapia-Silva RO. 2023. Estimating the shrimp farm's production and their future growth prediction by remote sensing: case study gulf of California. Frontiers in Marine Science 10(1). DOI: 10.3389/fmars.2023.1130125

Hai NV. 2015. The use of probiotics in aquaculture. Journal of Applied Microbiology 119(4): 917-935. DOI: 10.1111/jam.12886.

Ilango S, Antony U. 2021. Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods. Trends in Food Science and Technology 118(A): 617-638. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.05.034.

Ina-Salwany MY, Al-saari N, Mohamad A, Mursidi FA, Mohd-Aris A, Amal MNA, Kasai H, Mino S, Sawabe T, Zamari-Saad M. 2019. Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. Journal Aquatic Animal Health 31: 3-22. DOI: doi.org/10.1002/AAH.10045.

Jiménez R, Barniol R, de Barniol L, Machuca M. 1999. Infection of IHNV virus in two species of cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Litopenaeus*

*stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Nino 1997-98. *Aquaculture Research* 30(1): 695-705.

Jiravanichpaisal P, Miyazaki Limsuwan TC. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Journal Aquatic Animal Health* 6:27–35.

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.

Kewcharoen W a Srisapoom P. 2019. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish Shellfish Immunology* 94:175-189. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.09.013

Khimmakthong U, Sukkarun P. 2017. The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. *Microbial Pathogenesis* 113: 107-112. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.10.028.

Kua BC, Iar A, Siti Zahrah A, Irene J, Norazila J, Nik Haiha NY, Fadzilah Y, Mohammed M, Siti Rokhaiya B, Omar M, Teoh TP. 2016. Current status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of farmed shrimp in Malaysia. *Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center* [Online]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10862/3090>.

Kuebutornye FKA, Abarike ED, Lu Y. 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 87: 820-828. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.02.010.

Kumar V, Roy S, Behera B, Bossier P, Das B. 2021. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins* 13(8):524. DOI:10.3390/toxins13080524

Kumar V, Roy S, Kumar-Meena D, Kumar-Sarkar U. 2016. Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanism of action, and methods of administration. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 24(4):342-368. DOI: 10.1080/23308249.2016.1193841.

Kumar, RA, Prasad RV, Nagarajan S. 2023. Chapter 23: Antibiofilm activities against food pathogens. In: *Applications of Next Generation Biosurfactants in the Food Sector*. Academic Press, New York, p. 479-508.

Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, AM Kuris, Powell EN, Rondeau D., Saksida SM. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science* 7(1):471-491. DOI: 10.1146/annurev-marine-010814-015646

Lai HC, Ng TH, Ando M, Te Lee C, Chen IT, Chuang JC, Mavichak R, Chang SH, De Yeh M, Chiang YA, Takeyama H, Hamaguchi Ho, Lo CF, Aoki T, Wang HC. 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology* 47: 1006–1014. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.11.008.

Lealem F, Gashe B. 1994. Amylase production by a Grampositive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied. Bacteriolog.* 77: 348–352.

Li P, Kinch LN, Ray A, Dalia AB, Cong Q, Nunan LM, Orth, K. 2017. Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. *Applied and environmental microbiology* 83(13): e00737-17. DOI: 10.1128/AEM.00737-17.

Li Z, Deng H, Zhou Y, Tan Y, Wang X, Han Y, Liu Y, Wang Y, Yang R, Bi Y, Zhi F. 2017. Bioluminescence imaging to track *Bacteroides fragilis* inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* infection in mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 170. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00170.

Lina López DA, Carlos Mejía G. 2012. Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba* 17(3), 3169-3175.

Lui KF, Chiu CH, Shiu YL, Cheng W. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology* 28(5-6): 837-844. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.01.012.

Martínez Cruz P, Ibáñez AL, Monroy Hermosillo OA, Ramírez Saad HC. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology* 1: 916845. DOI: 10.5402/2012/916845.

Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research* 39(Web Server issue): W339–W346. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>

Musthafa KS, Saroja V, Pandian, SK, Ravi, AV. 2011. Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aureginosa* (PAO1). *Journal of Biosciences* 36: 55-67.

Ninawe AS, Selvin J. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Critical Reviews in Microbiology* 35(1):43–66. DOI: 10.1080/10408410802667202.

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. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 49:3-4.

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279–289.

Oh NS, Joung JY, Lee JY, Kim Y. 2018. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PLoS ONE* 13(2): e0192021. DOI: 10.1371/journal.pone.0192021

Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards R A, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research* 42(Database issue): D206–D214. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>

Parker RB. 1974. Probiotics, the other half of antibiotic story. *Animal Nutrition & Health* (29):4-8.

Partida-Arangure B, Luna-Gonzalez A, Fierro-Coronado J, Flores-Miranda C., Gonzalez-Ocampo H. 2013. Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *Academic Journal* 12(21): 3366-3375. DOI: 10.5897/AJB12.1569.

Pérez-Sánchez T, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Balcázar, JL. 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture* 6: 133-146. DOI: 10.1111/raq.12033.

Pinheiro ACAS, Lima APS, de Souza ME, Neto ECL, Adriaio M, Goncalvez VSP, Coimbra MRM. 2007. Epidemiological status of Taura syndrome and infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). *Aquaculture* 262(1):17-22.

Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Mégraud F, Urdaci MC 2001. In vitro Anti-*Helicobacter pylori* activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 is Due to Secretion of Antibiotics. *Antimicrobial Agents Chemother* 45: 3156-3161.

Pui CF, Bilung LM, Zin NBM, Abidin NNBZ, Micky V, Kasing A. 2014. Risk of acquiring *Vibrio parahaemolyticus* in water and shrimp from an aquaculture farm. *Kuroshio Science*, 8, 59–62.

Quiroz-Guzmán E, Balcázar JL, Vázquez-Juárez R, Cruz-Villacorta AA, Martínez-Díaz SF. 2013. Proliferation, colonization, and detrimental effects of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during brine shrimp hatching. *Aquaculture* 406: 85-90. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.03.008.

Rabbee MF, Baek KH 2020. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules* 25(21): 4973. DOI: 10.3390/molecules25214973.

- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews* 16(4): 658–672. DOI: 10.1128/CMR.16.4.658-672.2003.
- Ringo E, Olsen RE, Gifstad TO, Dalmo RA, Amlund H, Hemre GI, Bakke AM. 2010. Prebiotics In aquaculture. *Aquaculture Nutrition* 16(2):117-139. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x
- Roque A, Molina-Aja A, Bolán-Mejía A, Gómez-Gil B. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17(5):383-387.
- Salamoura C, Kontogianni A, Katsipi D, Kandyli P, Varzakas T. 2014. Probiotic fermented milks made of cow's milk, goat's milk and their mixture. *Journal of Biotechnology* 185S: S125. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.262
- Sánchez T, León J, Woolcott J, Arauco K. 2004. Extracellular proteases produced by marine bacteria isolated from sea water contaminated with fishing effluents. *Revista Peruana de Biología* 11(2):179-186.
- Sánchez-Díaz R, Molina-Garza Z, Cruz-Suarez LE, Selvin J, Kiran GS, Gómez-Gil B, Galaviz-Silva L, Ibarra-Gómez JC. 2022. Draft genome sequences of *Bacillus pumilus* 36R ATNSAL and *B. safensis* 131 LOBSAL, two potential candidate probiotic strains for shrimp aquaculture. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 31: 304-308. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.10.002
- Sánchez-Paz A. 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary Research* 41(6):43. DOI: 10.1051/vetres/2010015
- Santos-Beneit F, Cenicerós A, Nikolaou A, Salas JA, Gutierrez-Merino J. 2022. Identification of antimicrobial compounds in two *Streptomyces* sp. strains isolated from beehives. *Frontiers in Microbiology* 13: 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.742168.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7):671–675. DOI:10.1038/nmeth.2089

Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sritunyalucksana K, Thitamadee S, Flegel TW, Mavichak R. 2014. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. [Online] Disponible en : [http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article\\_id=2030&title=newpcr-etection-method-for-ahpnd](http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030&title=newpcr-etection-method-for-ahpnd).

Soo TCC, Bhassu S. 2023. Signature selection forces and evolutionary divergence of immune-survival genes compared between two important shrimp species. PLoS ONE 18(1): e0280250. DOI: 10.1371/journal.pone.0280250.

Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, Betancourt-Lozano M, Morales-Covarrubias MS. 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. Applied and Environmental Microbiology 84(5): 1689-1699. DOI: 10.1128/AEM.03610-14.

Soto-Rodriguez SA, Lozano-Olvera R, Ramos-Clamont Montfort G, Zenteno E, Sanchez-Salgado JL, Vibanco-Perez N, Aguilar-Rendon KG. 2022. New insights into mechanism of action of PirAB from *Vibrio parahemolyticus*. Toxins 14(4): 243. DOI: 10.3390/toxins14040243.

Stepanov VG, Tirumalai MR, Montazari S, Checinska A, Venkateswaran K, Fox GE.V 2016. *Bacillus pumilus* SAFR-032 Genome revisited: sequence update and re-annotation. PLoS ONE 11(6): e0157331. DOI: 10.1371/journal.pone.0157331

Stieglitz JD, Touchton M, Benetti DD, Rothen D, Clark-Hughes A, Haus BK, Zangroniz, A, Suman DO. 2023. Chapter 5: Global marine aquaculture development. In: Ocean and society an introduction to marine studies. Routledge, London, p. 59-78. ISBN: 9781003058151.

Stintzi A, Barnes C, Xu J, Raymond KN. 2000. Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA 97:10691–10696. 10. DOI: 1073/pnas.200318797

Sur S, Romo TD, Grossfield A. 2018. Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide from molecular dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B* 122(8): 2219-2226. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b11889

Suva M, Sureja V, Kheni D. 2011. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: mechanisms of action and clinical application. *Journal of Current Research in Scientific Medicine* 2: 65-72.

Tamilselvan M, Raja S. 2024. Exploring the role and mechanism of potential probiotics in mitigating the shrimp pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences* 31: 103938. DOI: 10.1016/j.sjbs.2024.103938.

Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7):3022-3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120

Van Hai N, Fotedar R. 2010. A Review of probiotics in shrimp aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture* 22(3):251–266. DOI:10.1080/10454438.2010.500597.

Vandenbergh J, Thompson FL, Gomez-Gil B, Swings J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*. 1(4):9-20. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00312-5.

Varela A, Peña N. 2015. Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan el hepatopáncreas de camarones penidos. *Agronomía Mesoamericana* 27(1):73-80.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4):655-671. DOI: 10.1128/membr.64.4.655-671.2000

Vincent A, Lotz J. 2007. Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to Kona stock *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 75:265-268.

Wang D, Li J, Zhu G, Zhao K, Jiang W, Li H, Wang W, Kumar V, Dong S, Zhu W, Tian X. 2020. Mechanism of the potential therapeutic candidate *Bacillus subtilis* BSXE-1601

against shrimp pathogenic vibrios and multifunctional metabolites biosynthetic Capability of the strain as predicted by genome analysis. *Frontiers in Microbiology* 11 : 581802. DOI : 10.3389/fmicb.2020.581802.

Wang J, Zhang D, Wang Y, Lui Z, Lui L, Shi C. 2021. Probiotic effects of *Bacillus velezensis* GY65 strain in the mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Aquaculture Reports* 21: 100902. DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100902.

Wang S, Pearson LA, Mazmoum R, Liu T, Neilan B. 2022. Heterologous expression and biochemical analysis reveal a schizokinen-based siderophore pathway in *Leptolyngbya* (Cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology Journal* 88(7): e02373-21. DOI: 10.1128/aem.02373-21.

Wikumpriya GC, Prabhatha MWS, Lee J, Kim C-H. 2023. Epigenetic modulations for prevention of infectious diseases in shrimp aquaculture. *Genes* 14(9): 1682. DOI: 10.3390/genes14091682.

Wu L, Wu H, Chen L, Xie S, Zang H, Borris R, Gao X. 2014. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species. *Applied and Environmental Microbiology Journal* 80(24): 7512-7520. DOI: 10.1128/AEM.02605-14.

Wu Q, Throckmorton K, Maity M, Chevrette MG. 2022. Bacilibactins E and F from a marine sponge-associated *Bacillus* sp. *Journal of Natural Products* 84(1): 136-141. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c01170

Xu F, Gonzalez-Escalona N, Haendiges J, Myers RA, Ferguson J, Stiles T, Hickey E, Moore M, Hickey JM, Schillaci C, Mank L, DeRosia-Banick K, Matluk N, Robbins A, Sebra RP, Cooper VS, Jones SH, Whistler CA. 2017. Sequence type 631 *Vibrio parahaemolyticus*, an emerging foodborne pathogen in North America. *Journal of Clinical Microbiology* 55(2):645-648. DOI: 10.1128/JCM.02162-16.

Zhang J, Zhang X, Zhou Y, Han Q, Wang X, Song C, Wang S, Zhao S. 2023. Occurrence, distribution and risk assessment of antibiotics at various aquaculture stages in typical aquaculture areas surrounding the Yellow Sea. *Journal of Environmental Science* 126: 621-632. DOI: 10.1016/j.jes.2022.01.024.

Zheng B, Bossier P. 2023. Toxicity assessment and anti-*Vibrio* activity of essential oils: potential for application in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 1–20. DOI: 10.1111/raq.12795.

Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 33(4):683-689. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.05.027