



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**ESTUDIO DEL MICROBIOMA DE LOS DISTINTOS ESTADOS DEL DESARROLLO DEL
CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931)**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARGOTH LILIANA CASTRO CUBILLOS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ
(FACULTAD DE CIENCIAS)

EN SU CASO, MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR
(INSTITUTO DE ECOLOGÍA)
DRA. SILVIA PAJARES MORENO
(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)
DR. ERNESTO PEREZ RUEDA
(INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM)
DR. MIROSLAV MACEK
(FES IZTACALA)

JUNIO 2017
CD.MX.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**ESTUDIO DEL MICROBIOMA DE LOS DISTINTOS ESTADOS DEL DESARROLLO DEL
CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931)**

TESIS

Que para obtener el grado académico en:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

MARGOTH LILIANA CASTRO CUBILLOS

Director de tesis: DRA. MARIA LETICIA ARENA ORTIZ

Comité tutorial: DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR
DRA. SILVIA PAJARES MORENO
DR. ERNESTO PEREZ RUEDA
DR. MIROSLAV MACEK

MÉXICO 2017

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias a las facilidades de las instalaciones de la Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la UNAM en Yucatán México, en sus campus Sisal y Parque Científico y Tecnológico, bajo la dirección de la Dra. Ma. Leticia Arena Ortiz, en el marco del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM. Financiado en gran medida por el proyecto UNAM-PAPIIT IG200215 de la Dra. Valeria Souza Zaldívar. Y con una beca de maestría del CONACyT. Se agradece el apoyo técnico de la Mtra. En Ciencias Karla Susana Escalante en el laboratorio de biología molecular. Y a los técnicos académicos: Lic. Adriana del Carmen Paredes Medina, Mtra. En Ciencias Iveth Gabriela Palomino Albarrán, Mtro. En Acuicultura Miguel Arévalo, Mtro. En Acuicultura Manuel Valenzuela Jiménez. A la Dra. Gabriela Gaxiola Cortés por permitir realizar las colectas en las diferentes áreas de cultivo de camarón. A la Biol. Valerie Yselle de Anda por su apoyo en el manejo e interpretación de datos de *Illumina*. Al Mtro. En Ciencias Javier Apodaca Hernández por su ayuda en el procesamiento bioinformático de los datos generados en esta tesis. Al señor Carlos Chávez por permitirnos coleccionar los juveniles de camarones en la granja La Marca, bajo la supervisión del Biol. Delfino Serrano. A los miembros de mi comité tutorial Dra. Valeria Souza, Dra. Silvia Pajares, Dr. Miroslav Macek y Dr. Ernesto Pérez Rueda, por sus valiosos comentarios a este documento.

Dedicatoria

Definitivamente este trabajo está dedicado con todo mi amor a mi madre Ana Julia Cubillos Munca, quien con su cariño y apoyo ha sido parte vital en mi vida profesional y personal. También a mi abuela Lilia María Munca de Cubillos por estar presente en mi vida desde que tengo uso de razón, dándome cariño incondicional. A mi tío José Miguel Cubillos Munca que ha sido como un padre para mí, un verdadero ejemplo a seguir. A mi hermana, la pequeña Juliana, que llegó para dar a mi vida otro motivo para seguir luchando.

Agradezco a mis amigos del mundo, desde mis amigas del colegio, pasando por los amigos de universidad y de trabajo. A México donde esta meta se cumple, a la familia que encontré aquí. A doña Silvia y don Antonio, por abrirme las puertas de su hogar en Sisal. A Sol, Sadot, Katina y Fernando por tantos momentos de risas. A mi compañera de carreras Karen, que comparte la misma pasión por el atletismo y por la vida. A Estefy, por orientarme a mí llegada al país y por la amistad que aún se mantiene. A Adriana por su apoyo y amistad desde el pregrado en Colombia. A María Fernanda y Luis Fernel por sus consejos y apoyo en momentos difíciles y por recordarme a la “tierrita” con su comida y charlas.

A mis compañeros de generación Ainhoa, Roberto, Carlos y especialmente a Paulina por ser una gran amiga. A Erika que aunque no pertenecemos a la misma generación, compartimos momentos especiales y nos dimos apoyo mutuo. A Daniela por escucharme, aconsejarme y por la calma que me transmitió en momentos difíciles. A Omar por los momentos compartidos y por las enseñanzas aprendidas. A su familia por su apoyo durante mi estancia en Ciudad de México.

A todos quienes de una forma u otra contribuyeron para que este proyecto se llevara a feliz término. Muchas gracias.

Índice

Agradecimientos	3
Dedicatoria.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Características, ciclo de vida y taxonomía del camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>, Boone, 1931).....	12
1.2 Importancia económica y ecológica del camarón blanco	14
1.3 Microorganismos asociados al ciclo de vida del camarón	15
1.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).....	16
1.5 Secuenciación masiva tipo Illumina.....	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Aplicaciones de la técnica de DGGE en estudios metagenómicos.....	19
2.2 Secuenciación masiva en la identificación de algunos microbiomas marinos	20
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS	22
3.1 Problema de investigación	22
3.2 Objetivos	23
3.2.1 Objetivo general	23
3.2.2 Objetivos específicos.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. METODOLOGÍA.....	25
5.1 Organismos de estudio.....	25
5.2 Recolección de muestras.....	26
5.3 Extracción de ADN metagenómico	27
5.4 Cuantificación de ADN.....	27
5.5 Amplificación de un fragmento del 16S ARNr mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	28
5.6 Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).....	29
5.6.1 PCR y purificación de ADN de bandas obtenidas en DGGE.....	30
5.6.2 Secuenciación de ADN metagenómico y análisis de secuencias DGGE	30

5.6.3 Análisis de la imagen e índices de diversidad	30
5.7 Secuenciación masiva de amplicones del gen 16S en diferentes estadios.....	32
5.7.1 Manejo de datos de secuenciación masiva	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Colecta de muestras	34
6.2. Extracciones y cuantificación de ADN metagenómico del camarón.	34
6.3 PCR de las muestras de camarón	34
6.4 Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) y purificación de ADN .	35
6.5 Análisis de secuencias obtenidas de DGGE	39
6.6 Análisis de la imagen e índices de diversidad.....	42
6.7 Análisis de los datos de secuenciación masiva.....	52
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	61
7.1 Gónadas, huevos y estadios larvales de <i>L. vannamei</i>	61
7.2 Postlarvas de <i>L. vannamei</i> sometidas a cambios de salinidad	63
7.3 Postlarvas, juveniles y probióticos granja La Marca.	65
7.4 DGGE vs. Secuenciación masiva (Illumina)	66
8. CONCLUSIONES	68
9. PERSPECTIVAS	69
10. BIBLIOGRAFÍA	70
11. ANEXOS	80

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida del camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) (FAO, 2015; Martinez, 1999).	14
Figura 2. Etapas de PCR-DGGE. Tomado y modificado de: Nakatsu (2007).....	17
Figura 3. Etapas de secuenciación por Illumina. Tomado y modificado de: (Illumina, 2016).....	18
Figura 4. Sistemas de mantenimiento de reproductores y larvas en laboratorios de maduración, reproducción y cría larvaria de crustáceos.	25
Figura 5. Toma de muestras en estanques granja camaronera “Granjas Acuícolas del Carmen” (Granja La Marca), Sisal (Yucatán).....	26
Figura 6. Montaje de sistema de corrida gel de DGGE.	29
Figura 7. Extracciones de ADN metagenómico de las gónadas de hembras (GH) y machos (GM), huevos fértiles (HF) y nauplios (N) de camarón blanco (<i>L.vannamei</i>). Marcador de 1 kb (M). Las muestras de mala calidad son aquellas que muestran barridos (HF1 y HF3) o que muestran bandas muy claras (NII-2); las muestras de buena calidad están representadas por aquellas con bandas definidas e intensas (por ejemplo GM1, HF2, NII-1).....	34
Figura 8. PCR del 16S ARNr para distintos subestadios de postlarvas de camarón blanco sometidas a descensos de salinidad. Postlarva 12 a 25 de salinidad (PL12-25), postlarva 13 a salinidad de 24 (PL13-24), postlarva 17 a salinidad de 4 (PL17-4), postlarva 18 a salinidad de 3 (PL18-3) y postlarva 15 a 16 de salinidad (PL15-16). Marcador de 100 pb (M), blanco negativo (BCO).....	35
Figura 9. DGGE de muestras por triplicado de gónadas hembras (GH), gónadas machos (GM), huevos fértiles (HF) y nauplios (NII) de <i>L. vannamei</i> . Los números muestran las bandas que fueron elegidas para recuperar el amplicón y mandar a secuenciar.....	36
Figura 10. DGGE de muestras por triplicado de protozoas (P1 a P3), mysis (M1 a 3) y postlarvas (PL1 a 3) de <i>L. vannamei</i> . Los números muestran las bandas representativas cortadas y enviadas a secuenciar.	37
Figura 11. DGGE cambios de salinidad para postlarvas, transición agua salada (36) a agua dulce (24, 16, 12, 4). La numeración muestra las bandas representativas, es decir las que se eligieron y cortaron para secuenciar.	38
Figura 12. DGGE cambios en la comunidad bacteriana en postlarvas y juveniles de <i>L. vannamei</i> en la granja de cultivo antes y después de incorporar probióticos al agua y a la dieta.	39
Figura 13. Análisis de bandas DGGE. Muestras de gónadas machos, gónadas hembras, huevos fértiles y nauplio III. Resumen de análisis de bandas arrojado por Quantity One.....	42
Figura 14. Número de OTUs en el microbioma de gónadas de machos (GM), gónadas de hembras (GH), huevos fértiles (HF), nauplios (N), protozoas (P), mysis (M) y postlarvas (PL).	43
Figura 15. A) Cluster de disimilitud para la comunidad microbiana en gónadas, huevos y estadios larvales de <i>L. vannamei</i> . Rango de disimilitud de 0 a 1, siendo los valores cercanos a 0 muy semejantes y los valores cercanos a 1 muy diferentes. Se tomó a 0.5 como el punto de corte para	

formar los grupos. Las muestras corresponden a: Gónadas hembras (GH), Gónadas machos (GM), Huevos fértiles (HF), Nauplio (N), Protozoa (PZ), Mysis (M) y Postlarva (PL). Los números de 1 a 7 representan orden consecutivo de los estadios larvales. B) MDS para comunidad microbiana en gónadas, huevos y estadios larvales de *L. vannamei*. El *stress* representa una medida de bondad y ajuste, entre más pequeño y cercano a 0 sea más apropiada la representación del conjunto de datos, *k* hace referencia al número de dimensiones en las que se representan los datos. 45

Figura 16. Número de OTUs en la comunidad microbiana de postlarvas de *L. vannamei* en condiciones de salinidad constante (36), PL1 a PL16, y sometidas a descensos en la salinidad (24 a 4). 46

Figura 17. A) Cluster de disimilitud para la comunidad microbiana en postlarvas de *L. vannamei* a salinidad constante y con disminución en la salinidad. Rango de disimilitud de 0 a 1, siendo los valores cercanos a 0 muy semejantes y los valores cercanos a 1 muy diferentes. Se tomó a 0.5 como el punto de corte para formar los grupos. Postlarvas a salinidad constante (salinidad de 36): postlarva 1 (PL1), postlarva 12 (PL12), postlarva 13 (PL13), postlarva 14 (PL14), postlarva 15 (PL15), postlarva 16 (PL16); postlarvas sometidas a descenso de salinidad (24,16,12 y 4): postlarva 13 a 24 (PL13-24), postlarva 15 a 16(PL15-16), postlarva 16 a 12 (PL16-12) y postlarva 17 a 4(PL17-4). B) MDS para la comunidad microbiana en postlarvas de *L. vannamei* postlarvas de *L. vannamei* a salinidad constante y con disminución en la salinidad. El *stress* representa una medida de bondad y ajuste, entre más pequeño y cercano a 0 sea más apropiada la representación del conjunto de datos, *k* hace referencia al número de dimensiones en las que se representan los datos. 48

Figura 18. Número de OTUs en el microbioma de postlarvas y juveniles de la granja La Marca, con y sin adición de probióticos. Postlarva 29 (PL29), juvenil 23 días después de la siembra (J23), juvenil 105 días después de la siembra (J105), probiótico sedimento (PrSe), probiótico agua y alimento (PrA-Al) y probiótico alimento (Pr-Al). 49

Figura 19. A) Cluster de disimilitud para comunidad microbiana en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* cultivados en la granja La Marca. B) MDS para comunidad microbiana en postlarvas y juveniles cultivados en granja La Marca. El *stress* representa una medida de bondad y ajuste, entre más pequeño y cercano a 0 sea más apropiada la representación del conjunto de datos, *k* hace referencia al número de dimensiones en las que se representan los datos. 51

Figura 20. Evaluación de calidad de lecturas en el programa bioinformático FastQC. Lecturas de buena calidad con valores superiores a Q20. La línea roja en la parte central de las barras indica el valor de la mediana, la caja amarilla representa el rango intercuartílico (25 a 75 %), los bigotes superiores e inferiores hacen referencia a los puntos que están al 10 % y al 90 %, la línea azul representa el promedio de la calidad. El eje y representa los valores de calidad, los colores dividen en eje en calidades, el verde representa muy buena calidad, el naranja muestra lecturas con calidad razonable y el rojo aquellas que tienen baja calidad. El eje x hace referencia al número de pares de bases. 52

Figura 21. Curvas de rarefacción para filos y familias bacterianas encontradas en cada una de las siete muestras analizadas. La línea vertical indica el valor mínimo en la riqueza en la muestra con menor número de secuencias para el nivel taxonómico en cuestión (A: Filo, B: Familia). Muestras

provenientes de Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán: Nauplio (N), Nauplio II (NII), Nauplio III (NIII), Protozoa (PZ) y Postlarvas 3 a 6 (PL3-6). Muestras provenientes de la granja La Marca: Juveniles 23 días (J23) y Juveniles 105 días (J105). 54

Figura 22. Filos bacterianos presentes en estadios larvales y juveniles de camarón blanco. Muestras provenientes de Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán: Nauplio (N), Nauplio 2 (N2), Nauplio 3 (N3), Protozoa (PZ) y Postlarvas 3 a 6 (PL3-6). Muestras provenientes de la granja La Marca: Juveniles 23 días (J23) y Juveniles 105 días (J105). A) Abundancia absoluta, B) Abundancia relativa. 55

Figura 23. Familias bacterianas presentes en estadios larvales y juveniles de camarón blanco. Muestras provenientes de Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán: Nauplio (N), Nauplio 2 (N2), Nauplio 3 (N3), Protozoa (PZ) y Postlarvas 3 a 6 (PL3-6). Muestras provenientes de la granja La Marca: Juveniles 23 días (J23) y Juveniles 105 días (J105). A) Abundancia absoluta, B) Abundancia relativa. 58

Figura 24. Heatmap para muestras de larvas y juveniles provenientes de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán y la granja La Marca en relación a las familias bacterianas presentes en las mismas. Los colores representan el valor de Z, donde valores cercanos a 2 (púrpura) representan muestras muy similares, valores cercanos a 0 (blanco) muestras similares y valores cercanos a -2 (naranja) muestras muy poco similares. 60

Figura 25. MDS para la comunidad microbiana en Nauplio (N), Nauplio2 (N2), Nauplio3 (N3), Protozoa (PZ) y Postlarva 3 a 6 (PL3-6) provenientes de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán y Juveniles 23 días de la siembra (J23) y Juveniles 105 días después de la siembra (J105) de la granja camaronera La Marca (tratados con probióticos). El *stress* representa una medida de bondad y ajuste, entre más pequeño y cercano a 0 sea más apropiada la representación del conjunto de datos, *k* hace referencia al número de dimensiones en las que se representan los datos. 60

Índice de tablas

Tabla 1. Identificación de bandas provenientes de DGGE 1 (gónadas hembras, gónadas machos, huevos fértiles y nauplio III).	40
Tabla 2. Identificación de bandas provenientes de DGGE2 (Protozoa, mysis y postlarva).....	40
Tabla 3. Identificación de bandas provenientes de DGGE3 (postlarvas a 36, 24, 16, 12 y 4 de salinidad).	41
Tabla 4. Índices de diversidad microbiana para gónadas, huevos y estadios larvales de <i>L. vannamei</i>	44
Tabla 5. Índices de diversidad para postlarvas de <i>L. vannamei</i> a salinidad constante y con descensos de salinidad.	47
Tabla 6. Índices de diversidad microbiana para postlarvas y juveniles de <i>L. vannamei</i> cultivados en la granja La Marca.	50
Tabla 7. Cantidad de lecturas iniciales obtenidas por Illumina, filtradas por calidad y clasificadas taxonómicamente.	53
Tabla 8. Índices de diversidad para filos en el microbioma de <i>L. vannamei</i>	56
Tabla 9. Índices de diversidad para familias en el microbioma de <i>L. vannamei</i>	57

**“ESTUDIO DEL MICROBIOMA DE LOS DISTINTOS ESTADOS DEL DESARROLLO DEL CAMARÓN
BLANCO (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931)”**

Resumen

El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), es una de las especies marinas de interés comercial más importante en el mundo, representa alrededor del 15 % del total mundial en el mercado de productos de pesca y acuicultura. Este camarón, al igual que otros crustáceos peneideos, afronta distintas fases larvarias a lo largo de su desarrollo y durante su paso por estas tiene contacto con el medio y con la comunidad de microorganismos que los rodea. Hasta el momento los métodos microbiológicos tradicionales han permitido evaluar la composición bacteriana en camarones cultivados y de vida libre de forma relativa, dado que la sección no cultivable queda sin estudiar. No obstante, el empleo de técnicas moleculares se hace más constante debido a las características y bondades que ofrecen. Por lo anterior, en el presente estudio se usó la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) y la secuenciación masiva (MiSeq de *Illumina*) para dar un panorama más amplio de lo que sucede a en el microbioma del camarón blanco en sus diferentes etapas de desarrollo. Se evaluaron los cambios en la comunidad microbiana para las gónadas de reproductores, los huevos, los estadios larvales y los juveniles de *L. vannamei*.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la comunidad bacteriana en los estadios larvales del camarón blanco difiere entre las primeras etapas y las últimas etapas larvales, siendo un periodo crucial el paso del estadio de nauplio a protozoa. Los huevos fértiles y el estadio de nauplio son altamente similares. En cuanto a la diversidad bacteriana en el estadio de postlarva esta tiende a disminuir a medida que incrementan los subestadios, es decir con el paso de los días, a pesar de esto la reducción de la salinidad en el medio de cultivo incrementa la diversidad bacteriana. Los filos bacterianos con mayor cantidad de secuencias fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Chlamydiae, Cyanobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria. Por su parte, las familias bacterianas más representativas fueron Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Alteromonadaceae, Vibrionaceae y Bacillaceae. En relación a las técnicas moleculares, las dos son efectivas. Sin embargo, la secuenciación masiva resulta más informativa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características, ciclo de vida y taxonomía del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931)

El camarón blanco es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, se distribuye desde el Norte de México pasando por Centro y Suramérica hasta el norte de Perú; habita aguas marinas tropicales. Al igual que otros peneideos, estos organismos pasan gran parte de su ciclo de vida en aguas salobres (Edwards, 1977). Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, los juveniles y pre adultos viven en aguas costeras, en ecosistemas como manglar, lagunas costeras y estuarios, llegan a profundidades de hasta 70 m (Valles-Jimenez et al., 2004). Alcanzan su maduración alrededor de los 20 gramos en machos y 28 gramos en hembras, alrededor de los 6 y 7 meses (FAO, 2015)

- **Descripción taxonómica.**

Reino: Animalia

División: Arthropoda

Clase: Malacostraca

Orden: Decápoda

Familia: Penaeidae

Género: *Litopenaeus*

Especie: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

El ciclo de vida de *L. vannamei* se divide en 6 etapas, las cuales se distribuyen en una fase embrionaria, seguida de la etapa larval, posteriormente se desarrollan los juveniles, adultos y preadultos (Figura 1) (Rivera, 1998). Durante la etapa juvenil viven en estuarios y luego como preadultos migran al mar donde maduran y desovan (Rivera-Velázquez et al., 2008). Los desoves y la maduración sexual ocurren en mar abierto, allí transcurren todas las etapas larvarias hasta llegar a postlarva en un talla promedio de 6 mm y, posteriormente, se desarrollan los juveniles que miden entre 100 y 170 mm. La migración hacia el mar ocurre cuando los machos han alcanzado los 180 mm y las hembras alrededor de 220 mm (Edwards, 1977).

Durante la primera etapa, en aguas oceánicas, son planctónicos y se distribuyen horizontalmente por acción de las corrientes marinas. La duración de esta etapa se relaciona con la temperatura. En la segunda fase (estuarina), los camarones juveniles se tornan bentónicos y se distribuyen cerca de la costa donde la temperatura es más cálida. Los adultos, se establecen en mar abierto donde su ubicación horizontal y vertical está determinada por la estación del año (Martinez, 1999).

Fases larvarias:

La diferenciación entre cada etapa larvaria se basa en cambios corporales, básicamente en la aparición de nuevos apéndices. En la etapa de nauplio el camarón presenta tres pares de apéndices, antenas primarias y secundarias, además de mandíbulas. Se alimentan de vitelo, tienen fototactismo positivo, miden de 0.32 mm a 0.58 mm de longitud (nauplio 1 a nauplio 5). Los huevos eclosionan alrededor de 14-16 horas después de la fertilización. El estadio de zoea se divide en 3 subestadios, donde el cuerpo se divide en dos partes compuestas por un caparazón en forma hexagonal, en la parte posterior está el tórax con 6 segmentos y el abdomen aún sin segmentación. Aquí se inicia la etapa de alimentación del medio (fitoplancton). Este estadio se presenta después de 36 horas de la eclosión, en condiciones óptimas mudan tres veces en cinco días. Cuando llegan a mysis tienen el cuerpo alargado y apariencia similar a la de la postlarva. Se alimentan de fitoplancton, zooplancton y materia orgánica. Muestran fototropismo negativo, después de 72 horas pasan a postlarvas. Finalmente, en postlarva desaparecen exopoditos de pereiópodos y se desarrollan setas en los pleópodos. Se alimentan de zooplancton y fitoplancton (Moss y Pruder, 1995). Estas se clasifican en función de los días que han transcurrido después de la transición de mysis a postlarvas o a su estadio de muda (Martínez, 2002; Rivera Rodríguez, 1998).

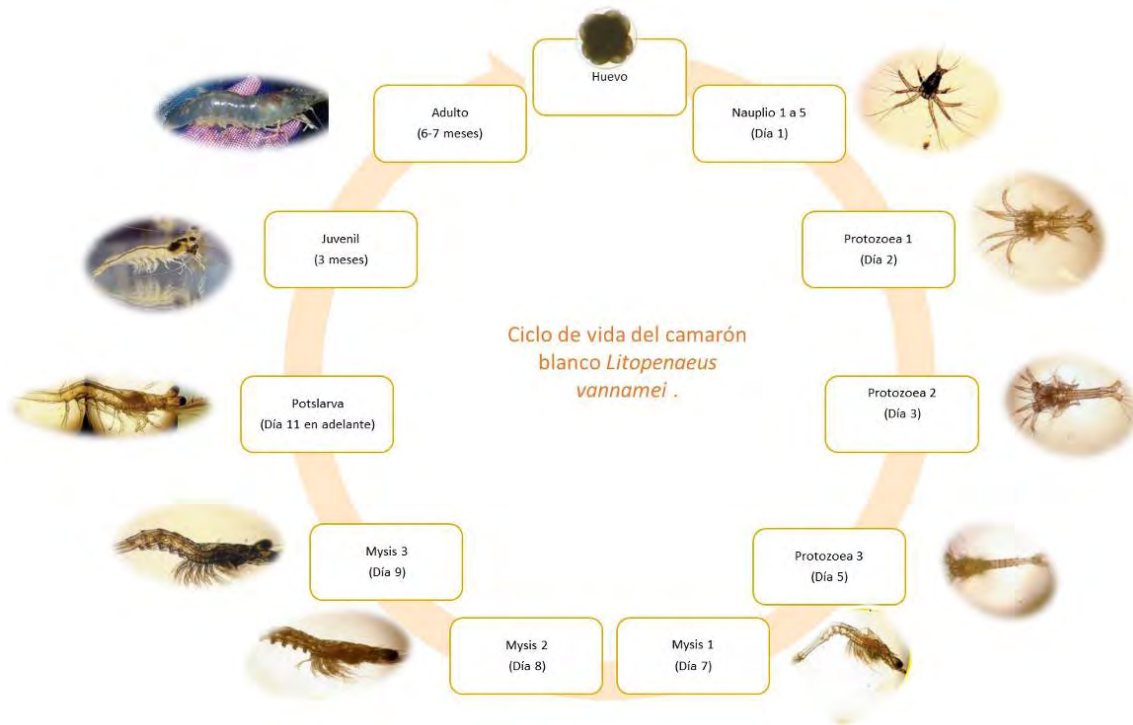


Figura 1. Ciclo de vida del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (FAO, 2015; Martínez, 1999).

1.2 Importancia económica y ecológica del camarón blanco

El camarón representa alrededor del 15 % del total mundial en el mercado de productos de pesca y acuicultura. Además del consumo humano, se destaca el uso de diferentes derivados, como la quitina de su caparazón en la industria cosmética, farmacéutica y de tecnología de alimentos. No obstante, en los años 2012 y 2013 su producción decreció en gran medida por la aparición de diferentes enfermedades en Asia y América Latina (FAO, 2014; Shang et al., 1998).

Para México, el camarón blanco es la especie marina más importante en cuanto a exportación se refiere, representa alrededor del 44 % de los ingresos totales del país en el sector pesquero. El consumo interno de este recurso alcanza el 55 % del total producido en el país, el 45 % restante se exporta. En el país existen dos zonas de producción camaronícola, la región del Golfo de California y del Pacífico y la región del Golfo de México y el Caribe, siendo la primera la de mayor producción en la nación. Las especies más pescadas y cultivadas son el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*), el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y el camarón marrón (*Farfantepenaeus californiensis*)

(Dubay et al., 2008). El país se encuentra en el séptimo lugar en acuicultura de camarón y en el 29 en producción general por acuicultura (Juárez, 2007).

Litopenaeus vannamei representa un excelente recurso pesquero y acuícola, en gran medida gracias a su comportamiento flexible, puesto que puede habitar ecosistemas con características diferentes. Como todos los crustáceos, el camarón blanco es isosmótico y tiene la capacidad de regular hasta cierto punto la concentración iónica en relación con la del medio y su temperatura (Rivera-Velázquez et al., 2008). Los nauplios son osmoconformadores, las postlarvas y adultos muestran regulación osmótica que les permite soportar amplias variaciones de salinidad y pH en las migraciones. Se ha demostrado que los juveniles crecen mejor a salinidades bajas y que la concentración iónica influye en la fertilización de los ovocitos (Martínez, 2002 ;Rivera-Velázquez et al., 2008). Pueden vivir en sistemas con bajas salinidades (1-2) y en ambientes con salinidad alta (hasta 40), lo que permite establecer cultivos tierra dentro sin necesidad de utilizar altos volúmenes de agua de mar, reduciendo así los costos de producción (Liao y Chien, 2011).

1.3 Microorganismos asociados al ciclo de vida del camarón

Muchos factores intervienen en la adquisición de la comunidad bacteriana de los organismos, la dieta por su parte resulta ser uno de ellos. En los seres humanos, como en la mayoría de seres vivos, las bacterias interfieren y actúan como coadyuvantes en procesos tales como la degradación de sustancias, síntesis de aminoácidos y vitaminas. Asimismo, están relacionados con la maduración del sistema inmune, afectan el balance de energía, intervienen en el procesamiento de xenobióticos y realizan otras funciones que no puede llevar a cabo el cuerpo por sí solo (Cryan y Dinan, 2012; Diaz Heijtz et al., 2011; Gill et al., 2006).

En crustáceos el tipo y cantidad de ácidos grasos que incluye la dieta, por ejemplo, determina la comunidad de microorganismos existentes en el tracto digestivo (Zhang et al., 2014). Dentro de los grupos bacterianos dominantes en el tracto digestivo del camarón y en su medio de cultivo están los filos Proteobacteria, Tenericutes y Bacteroidetes. También se han hallado, en organismos silvestres y de cultivo, miembros de algunos géneros como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Alcaligenes*, *Cytophaga* y *Flavobacterium* (Beardsley et al., 2011).

Usando pirosecuenciación en muestras de intestino de *L. vannamei* se encontró que los grupos dominantes son Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y, en menor medida, Firmicutes

(Huang et al., 2014). No obstante, Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria se encuentran en todas las etapas del desarrollo en distintas proporciones. El grupo Comamonadaceae se presenta posiblemente como consecuencia de la alimentación con *Artemia*, lo que demuestra que esta última es un vector. Asimismo, los géneros *Tenacibaculum* y *Tamlana* pertenecientes a las Flavobacterias están en todos los estadios, pero presenta mayor dominancia en los juveniles. Por su parte, el género *Vibrio* suele estar presente en todos los estadios larvales del camarón blanco, en organismos sanos y enfermos, siendo dominante en las últimas etapas del desarrollo (Huang et al., 2014; Vandenberghe et al., 1999). A medida que el camarón crece se incrementa la densidad de organismos en los estanques, la materia orgánica en el medio y disminuyen los niveles de oxígeno, favoreciendo así la proliferación de ciertos grupos bacterianos (Kautsky et al., 2000). También, con el fin de comprobar si existen diferencias entre el microbioma de la musculatura de la cola del camarón blanco se secuenciaron muestras provenientes de cinco países (Honduras, Indonesia, Tailandia, Venezuela y Vietnam), encontrando similitudes significativas en la microbiota de cada una de las localidades (Seetharam et al., 2015).

1.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Los métodos electroforéticos comunes separan fragmentos de ADN por tamaño, por su parte el DGGE lo diferencia por la composición de su secuencia. Inicialmente por PCR se amplifican fragmentos de la misma longitud, posteriormente en el DGGE se distribuyen de forma lineal en un gel de poliacrilamida. Se usa urea y formamida como agentes desnaturizantes (Figura 2). La migración diferencial se produce porque se requiere mayor concentración de componente desnaturizante para separar las secuencias con alta cantidad de guanina (G) y citosina (C), debido a la presencia de más enlaces de hidrogeno entre G y C que entre A (adenina) y T (timina). Las distancias de separación de los fragmentos dependen de las variaciones en la secuencia de bases. Se debe tener en cuenta que la intensidad de las bandas obtenidas refleja la densidad relativa de productos de PCR en una muestra y que no representa la cantidad exacta de poblaciones en la muestra (Nakatsu, 2007).

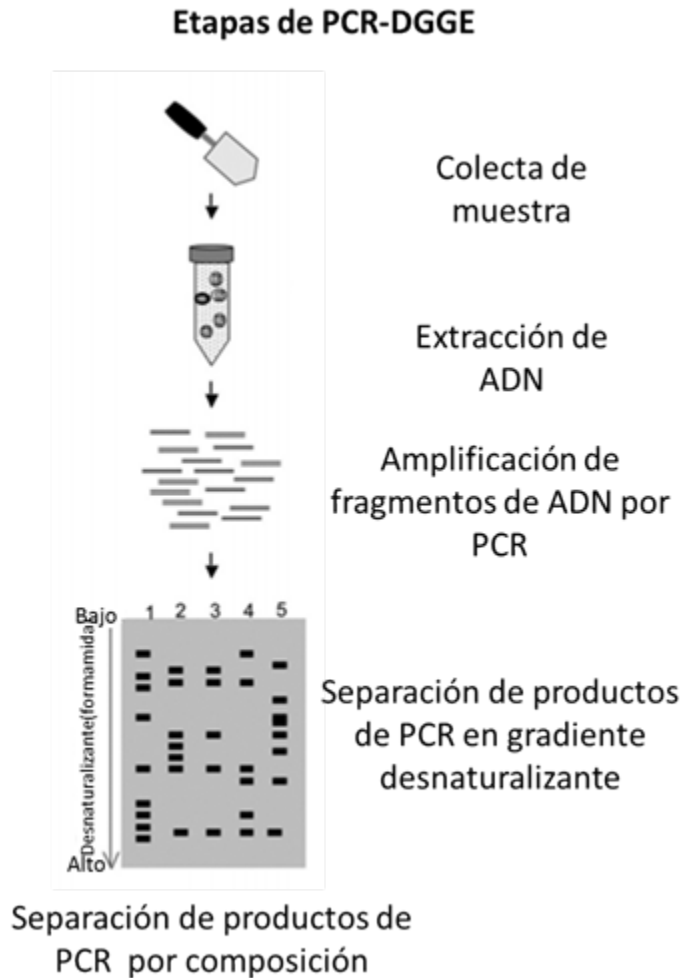


Figura 2. Etapas de PCR-DGGE. Tomado y modificado de: Nakatsu (2007).

1.5 Secuenciación masiva tipo Illumina

En los últimos años se han diseñado y aplicado técnicas novedosas para realizar secuenciaciones de mayor calidad y eficiencia. La secuenciación masiva forma parte de estas técnicas conocidas como de segunda generación, en las cuales se producen gran cantidad de secuencias a bajo costo y en menor tiempo a diferencia de la secuenciación tradicional de *Sanger* (Shendure y Ji, 2008). Sus aplicaciones van desde la secuenciación del genoma humano, pasando por secuenciación de muestras muy antiguas, hasta la secuenciación de muestras ambientales (Mardis, 2008).

Esta técnica utiliza nucleótidos terminadores marcados con moléculas que otorgan fluorescencia de la misma forma que en la secuenciación tipo *Sanger*. Tiene la capacidad de realizar millones de secuencias en una sola corrida. Primero, el ADN se fragmenta y se une a los cebadores, estos

productos se pegan a una placa y posteriormente se da una amplificación de los mismos por acción de la polimerasa y se crean clusters. Luego, las cuatro bases nucleotídicas con terminador reversible se unen a cada cluster, de forma que cada vez que una molécula encuentra su complementaria emite fluorescencia. Las bases que no se unen se lavan y vuelve a iniciar otro ciclo con nuevas bases, así hasta terminar la cadena de ADN. Aquí por cada ciclo se incorpora un solo nucleótido. Cabe destacar que la intensidad de la coloración y la longitud de onda definen qué nucleótido está uniéndose a la cadena, así n veces hasta lograr una lectura o read de longitud x (Figura 3). Finalmente se realiza un alineamiento y posterior unión de reads para comparar con un genoma de referencia e identificar a cual organismo corresponde la secuencia (Illumina, 2016; Shendure y Ji, 2008).

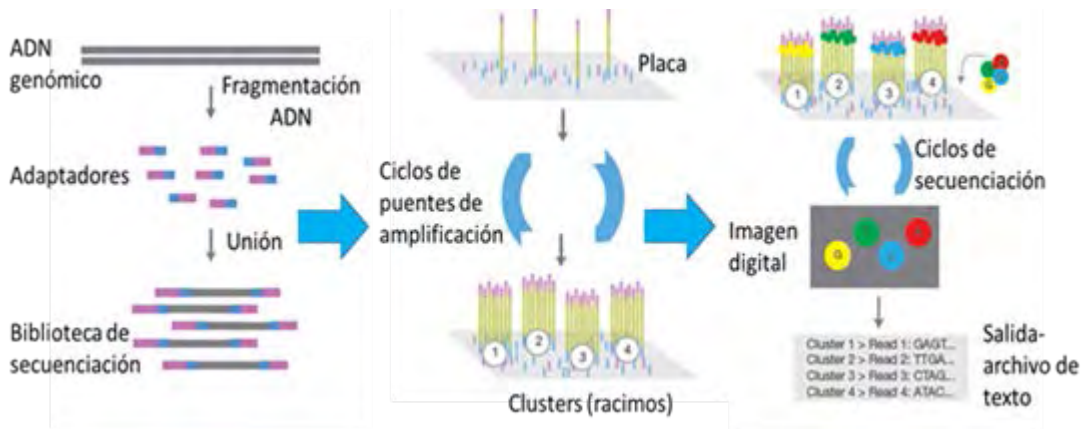


Figura 3. Etapas de secuenciación por Illumina. Tomado y modificado de: (Illumina, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1 Aplicaciones de la técnica de DGGE en estudios metagenómicos

El análisis de PCR-DGGE se ha utilizado para evaluar la comunidad bacteriana presente en muestras metagenómicas de suelos (Nakatsu, 2007), organismos (Gerdt et al., 2013; Li et al., 2010; Liu et al., 2011, 2010; Niu et al., 2012) y productos alimenticios (Ercolini et al., 2004; Nielsen et al., 2005), entre otros. Se ha empleado el análisis de DGGE para comparar organismos en ambientes con diferentes características, por ejemplo zonas mesotróficas y oligotróficas (Mühling et al., 2008). En huevos de *Meloidogyne fallax*, nemátodos parásitos asociados a raíces de tomates y papas, se utilizó DGGE para diferenciar la comunidad bacteriana presente en las raíces y en la masa de huevos, encontrando diferencias entre ambas (Papert et al., 2004).

Diversos estudios sobre comunidades bacterianas asociadas a estadios juveniles de algunos organismos marinos se han llevado a cabo utilizando el análisis de DGGE. Por ejemplo, mediante esta técnica se ha comprobado que en vertebrados, como el bacalao (*Gadus morhua*), la colonización bacteriana se inicia antes de que estos comiencen su alimentación (5 días antes) e influye en la sobrevivencia de los mismos en condiciones de cultivo. También, el ensamble bacteriano sufre modificaciones después de la ingestión de comida (Brunvold et al., 2007). En algunos invertebrados, como las vieiras, se ha estudiado la comunidad bacteriana en los estadios tempranos del ciclo de vida, más exactamente las bacterias que afectan las fases larvianas y que aparentemente no afectan los estadios postlarvales (Torkildsen et al., 2005). En relación con los cnidarios, los corales escleractinios albergan gran cantidad de microorganismos, estos proporcionan defensa contra patógenos. En referencia a este tema, se ha evaluado la diversidad bacteriana asociada a la capa superficial de corales sanos utilizando DGGE (Morrow et al., 2012).

En camarones también se ha estudiado la comunidad bacteriana presente en diferentes órganos usando la técnica PCR-DGGE, como por ejemplo en el intestino del camarón tigre (*Maruspenaeus japonicus*), donde se encontró *Vibrio* sp. como dominante (Liu et al. 2010). Se ha estudiado la comunidad bacteriana del camarón chino por medio de DGGE y librería de clonas, obteniendo resultados similares en las dos técnicas (Liu et al., 2011). En cuanto a la utilización de DGGE para diferenciar la microbiota en los diferentes estadios del camarón blanco (*L. vannamei*), no se han reportado estudios. Sin embargo, Simões (2002) marcaron bacterias *in vivo* con DTAF (5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl] amino)fluoresceína) y observaron que la colonización bacteriana comienza desde el estadio de nauplio V.

2.2 Secuenciación masiva en la identificación de algunos microbiomas marinos

En ambientes marinos, se han realizado varios trabajos para conocer y evaluar la presencia de Procariotas, algunos de ellos incluyen datos genómicos obtenidos a partir de diferentes técnicas como por ejemplo secuenciación de nueva generación. En ecosistemas costeros, por ejemplo, se ha estudiado la comunidad bacteriana presente en diferentes tapetes microbianos a lo largo de un gradiente de marea, evaluando ambientes marinos, salobres y de agua dulce (Bolhuis y Stal, 2011). En vertebrados marinos como la tortuga cabezona o gogo (*Caretta caretta*), se describió el microbioma procedente del intestino y de las heces fecales, encontrándose a Bacteroidetes y Firmicutes como los filos más abundantes (Abdelrhman et al., 2016). También, para organismos como esponjas y ascidias marinas se han secuenciado sus microbiomas (Hentschel et al., 2012; Kennedy et al., 2014). En la ostra *Crassostrea virginica* se secuenció el microbioma del intestino y el estómago en especímenes colectados en dos lugares diferentes, llegándose a la conclusión que su microbioma es más parecido al de otros moluscos que al de otros invertebrados como crustáceos decápodos, poliquetos o peces (King et al., 2012).

En crustáceos, más exactamente en los copépodos de las especies *Acartia longiremis*, *Centropages amatus* y *Calanus finmarchicus*, se estudió el microbioma dando como resultado a Gammaproteobacteria como el grupo más abundante, al igual que el género *Pseudoalteromonas*. Aquí, las bacterias ayudan en la transferencia de nutrientes de la red alimenticia y del ciclo biogeoquímico e influyen en su salud. No obstante, las especies presentes en la comunidad bacteriana se encuentran fuertemente influenciadas por el tipo de dieta consumida, el periodo climático y otros cambios temporales (Moisander et al., 2015). En el camarón tigre negro (*Penaeus monodon*), se evaluó la composición de la comunidad microbiana en heces fecales de diversos organismos en dos ambientes diferentes, siendo el filo Proteobacteria el dominante, seguido de Bacteroidetes, Fusobacteria y Firmicutes (Oetama et al., 2016).

En *L. vannamei* se ha identificado, por medio de secuenciación masiva, la comunidad bacteriana a nivel intestinal y en el agua de cultivo luego de someter organismos a diferentes dietas, aquí Proteobacterias y Firmicutes dominaron el tracto digestivo del camarón independientemente del tipo de dieta. En resumen, el ambiente imperante en el intestino del hospedero ejerce una importante presión sobre la comunidad bacteriana que se establece allí (Zhang et al., 2014). También se ha estudiado la relación entre la presencia de una enfermedad (brote de mortalidad), el efecto de esta sobre los animales y la composición bacteriana en el intestino del camarón

blanco, dando como resultado una fuerte asociación entre el grado de la enfermedad y la comunidad bacteriana presente en los organismos (Xiong et al., 2015). Por otro lado, se ha analizado la composición bacteriana en tanques de cultivo mixtos con organismos marinos como cangrejos, camarones y almejas en comparación con tanques control sin cultivar, allí se llegó a la conclusión que la maricultura contribuye al cambio en la estructura de la comunidad bacteriana en los sistemas, siendo Proteobacteria el filo dominante en los dos escenarios (Li et al., 2016). También, se ha estudiado la resistencia a algunos virus mediante el análisis del transcriptoma del camarón blanco, es el caso del virus del Taura, donde se ven afectados un total de 697 genes asociados con la resistencia al virus, estos están relacionados con el reconocimiento patógeno/antígeno, la coagulación, la antioxidación y las proteasas (Sookruksawong et al., 2013). Los resultados obtenidos en el estudio citado pueden ayudar a mejorar las estrategias de vacunación en acuicultura. En conclusión, hasta el momento se sabe para adultos y para algunos estadios larvales, que grupos bacterianos están presentes y cuales dominan, pero no se conoce el comportamiento de los mismos en el ciclo de vida completo del camarón. Por lo tanto, la secuenciación masiva resulta ser una herramienta que otorga resultados potentes.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Problema de investigación

Los camarones han demostrado ser un grupo exitoso en lo que a cultivo se refiere. El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es la especie de crustáceos más cultivada en el mundo (Gaxiola et al., 2006), siendo México uno de los países con mayor producción. El ciclo de vida de este peneido afronta diferentes fases larvares, la primera es el nauplio, luego se desarrolla la protozoa, la mysis y la postlarva temprana, las cuales siguen siendo planctónicas hasta las postlarvas que cambian sus hábitos y se tornan bentónicas (FAO, 2015). Durante su paso por estas fases los organismos silvestres y cultivados tienen contacto con el medio y por ende con la comunidad de microorganismos que los rodea. Cabe destacar que la comunidad bacteriana en las especies de importancia comercial es relevante ya que interviene directamente en su desarrollo y sobrevivencia. Muchos factores influyen en la abundancia y composición de especies de bacterias que habitan en los diferentes sistemas funcionales en invertebrados acuáticos. Varios de esos están relacionados a la anatomía y fisiología de los invertebrados anfitriones, incluyendo la estructura del sistema digestivo y cambios ontogénicos exhibidos por el hospedero. Por lo anterior, la caracterización de la microbiota resulta ser esencial en animales de cultivo para conocer el balance entre microorganismos benéficos y perjudiciales cuyo desequilibrio puede causar distintas enfermedades y también para la evaluación de posibles probióticos (Rungrassamee et al., 2014).

Los patógenos han demostrado ser una amenaza seria en la acuicultura y en la pesca mundial, llegando a producir la pérdida total del lote cultivado (Alavandi y Poornima, 2012). Por lo general, las enfermedades producidas en los organismos cultivados no son detectadas antes de la muerte de los mismos, por lo que no es posible realizar un tratamiento preventivo sobre estos (Ng et al., 2013). Por su parte, el conocimiento del microbioma asociado a los primeros estadios de vida del camarón blanco aún no se ha definido. Hasta el momento se cree que la asociación con bacterias se inicia desde su primera alimentación, por el contacto con el ambiente circundante, la secreción hormonal y la aparición de proteínas y enzimas digestivas (Tzuc et al., 2014). Según algunos trabajos de investigación, la colonización bacteriana del tracto digestivo comienza en el estadio nauplio 5, en el momento en el que el poro anal tiene contacto con el exterior y el organismo adquiere las bacterias de la columna de agua, incluso antes de iniciar algún contacto con el medio circundante (Simões et al., 2002). Dentro de la comunidad bacteriana del camarón blanco se han

encontrado géneros como *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*, siendo este último el más abundante (Tzuc et al., 2014).

Hasta el momento los métodos microbiológicos tradicionales han permitido evaluar la composición bacteriana en los ambientes de cultivo del camarón de forma relativa, dado que la sección viable pero no cultivable en medios tradicionales se queda sin estudiar. No obstante, técnicas moleculares como el DGGE se han utilizado para distinguir las comunidades bacterianas en el tracto digestivo y el medio de cultivo (Li et al., 2010). En esta técnica las bandas obtenidas por DGGE permiten hacer una reamplificación y posterior secuenciación de los fragmentos de ADN para identificar las bacterias presentes en la muestra. La búsqueda de cambios en el patrón y número de bandas de un gel permite conocer la dinámica de la composición bacteriana de una manera rápida y económica. Esta técnica se ha utilizado en la detección de la comunidad de microorganismos de estadios tempranos de diferentes especies como el pez *Gadus morhua*, en el que se comprobó que su biota bacteriana estaba presente antes de iniciar su alimentación (Brunvold et al., 2007). Por otro lado, el empleo de técnicas moleculares de nueva generación, como la secuenciación masiva, se hace más constante debido a las características y bondades que ofrecen, puesto que a gran escala resultan más económicas e informativas que otros tipos de secuenciación. Por esto, en el presente estudio se usa la técnica de DGGE y la secuenciación masiva para dar un panorama más amplio de lo que sucede a en el microbioma del camarón blanco en sus diferentes etapas de desarrollo, puesto que aún no se conoce la riqueza y diversidad bacteriana presente en los primeros estadios de vida de estos individuos de forma general.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Describir la estructura del microbioma bacteriano asociado a los distintos estadios del desarrollo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* utilizando herramientas de biología molecular (DGGE y secuenciación masiva).

3.2.2 Objetivos específicos

1. Conocer y analizar la composición de la comunidad bacteriana en las gónadas de parentales, huevos, estadios larvales y juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* utilizando herramientas de biología molecular.

2. Comparar la estructura de la comunidad bacteriana presente en las diferentes etapas del desarrollo larval del camarón blanco en relación al cambio de estadio.
3. Relacionar la composición de la comunidad bacteriana de algunos subestadios presentes en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* con cambios en la salinidad del sistema de cultivo.

4. HIPÓTESIS

El microbioma de los diferentes estadios de desarrollo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en sistemas de cultivo se modifica en relación al cambio de estadio y de salinidad.

5. METODOLOGÍA

5.1 Organismos de estudio

Los camarones blancos, identificados como *L. vannamei*, utilizados en este estudio provienen de sistemas cerrados de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán, localizada en Sisal, Yucatán (México). Allí se disponen tanques de maduración de 12 m³, con sistemas de recirculación, control de temperatura, luz y salinidad. Además, este laboratorio cuenta con tinas de desove y eclosión, las primeras de 100 litros y las segundas de 40 litros para eclosión individual. Por otro lado, en el área de cultivo larvario se disponen los organismos en tinas de 3000 litros para postlarvas y unidades experimentales de 1 a 10 litros con condiciones de temperatura controladas (Figura 4).



Figura 4. Sistemas de mantenimiento de reproductores y larvas en laboratorios de maduración, reproducción y cría larvaria de crustáceos.

Los parentales permanecieron en una densidad de 4 a 6 organismos/m² en tanques de fondo negro de 4 m de diámetro, con recirculación de agua, la temperatura del sistema fue de 28 °C. La alimentación estuvo basada en poliquetos, mejillones, calamar y biomasa de *Artemia* sp.

También se tomaron muestras de postlarvas y juveniles de *L. vannamei* (PL29, juveniles de 23 y 105 días), procedentes de la granja camaronera “La Marca”, perteneciente a la empresa “Granjas Acuícolas del Carmen” (Figura 5), en el oriente de la población Sisal, a 16 km aproximadamente del centro del municipio.



Figura 5. Toma de muestras en estanques granja camaronera “Granjas Acuícolas del Carmen” (Granja La Marca), Sisal (Yucatán).

5.2 Recolección de muestras

Se colectaron muestras de los estadios de vida del camarón blanco *L. vannamei* en cautiverio durante el mes de octubre y noviembre del año 2014. Se lavaron con agua destilada para eliminar restos de materia u organismos adheridos al caparazón y se conservaron en etanol al 70% para su posterior análisis. Cabe resaltar que de cada desove se tomó una sección de muestra y se dejó otra en desarrollo hasta el siguiente estadio, donde se volvió a seleccionar una parte y se dejó otra para que llegara al estadio próximo, así hasta postlarvas.

Para el caso de la granja La Marca, se tomaron muestras de postlarvas y juveniles (PL29, juveniles de 23 y 105 días) durante los meses de julio, agosto, septiembre y octubre del año 2015. Estas también se lavaron con agua destilada y se guardaron en tubos eppendorf en etanol al 70%. También se tomaron muestras de los probióticos en estado sólido utilizados en el cultivo.

- Probióticos usados en sistemas de cultivo de la Granja La Marca.

Probiótico BA (Biogestor de desechos orgánicos de uso acuícola): Este producto contiene una mezcla de microorganismos, enzimas y estimulantes que actúan sobre desechos contaminantes en la columna de agua y en el fondo de los estanques. Básicamente, el ingrediente activo es un conjunto de cerca de 94 especies de microorganismos microencapsulados y algunos en forma de esporas. Dentro de las especies que contiene este probiótico están *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Rhodobacter capsulatus*, *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp., entre otros. Como vehículo fijador se usa tierra diatomea. Estas cepas no presentan modificaciones genéticas, son anaerobias y

facultativas. Crecen en condiciones de pH entre 6 y 8.5, en temperaturas entre 16 °C y 38 °C (BIOPLANET, 2016a).

Probiótico BG (Probiótico de alto desempeño en salud y nutrición): Este probiótico contiene un grupo de microorganismos que tienen un efecto positivo en la salud de los organismos de cultivo y potencializan el crecimiento de los mismos. Impide o limita el crecimiento no deseado de algunos microorganismos de potencial patogénico como *Vibrio*, *Aeromonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *E. coli* y *Clostridium* que impiden la correcta absorción de nutrientes o producen perturbaciones intestinales. Los microorganismos que contiene este producto permiten la exclusión competitiva, es decir que las bacterias buenas dominan sobre las patógenas. El compuesto activo es un conglomerado de *Lactobacillus sp*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus sp* en un vehículo fijador de tierra diatomea. Puede usarse directamente en el agua o en el alimento de los camarones (BIOPLANET, 2016b).

5.3 Extracción de ADN metagenómico

Se empleó el protocolo de extracción de ADN de *lisis in situ* y absorción de sílice (Rojas-Herrera et al., 2008) (véase anexo 1). En un tubo eppendorf de 1.5 ml se coloca alrededor de 0.5 gramos de la muestra. Para las gónadas se tomó con una espátula una sección del tejido. En cuanto a los huevos, nauplios, protozoas y mysis no se tuvo en cuenta la cantidad de individuos, puesto que su tamaño es tan pequeño que no se pueden ver y diferenciar a simple vista. En cuanto a las postlarvas y juveniles se tomaron alrededor de 10 individuos. Cada muestra fue macerada en su totalidad, para así obtener el ADN del microbioma de todo el camarón.

Se verificó la presencia de ADN al correr un gel de agarosa al 1% el cual se tiñó con SYBR Green (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se tomó una foto en el fotodocumentador BioRad GelDocXR, con el programa Quantity One.

5.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó con el espectrofotómetro de la marca Genesys, 10 UV-Thermo scientific. Se tomaron 498 µl de agua PISA® (agua desionizada y pentadestilada) y 2 µl de ADN, se utilizó agua pisa como blanco. Estas muestras se colocaron en celdas de cuarzo para espectrofotómetro y se midió absorbancia a 260 nm y 280 nm. Posteriormente se calculó la concentración de ADN con la siguiente fórmula:

5.6 Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).

Se hicieron un total de 4 geles de poliacrilamida para DGGE. El primero contenía gónadas de hembra, gónadas de macho, huevos y el estadio de nauplio. Para el segundo, se utilizaron protozoas, mysis y postlarvas. En el tercer gel se tomaron postlarvas en agua salada (36) y en agua dulce (24, 16, 12 y 4). Finalmente, el cuarto gel contenía postlarvas de camarón en PL29, juveniles 23 días después de su siembra, juveniles 105 después de su siembra, probiótico usado en el sedimento, probiótico usado en el agua y el alimento y probiótico usado solamente en el alimento, todas estas provenientes de la granja camaronera La Marca. Estos geles se hicieron con una concentración de poliacrilamida del 6%, con un gradiente del 30% al 60% (Brunvold et al., 2007; Liu et al., 2011).

Se corrió a 90 V durante 18 horas. Después de este tiempo, se tiñó el gel con SYBR[®]safe (Thermo Fisher Scientific[®]) de 30 a 40 minutos (Figura 6). Finalmente, se observó el gel en un fotodocumentador o en una cámara UV, se cortaron las bandas de interés y se colocaron en agua destilada estéril durante 16-24 horas para la elución del ADN (Fernández y Le, 2005).

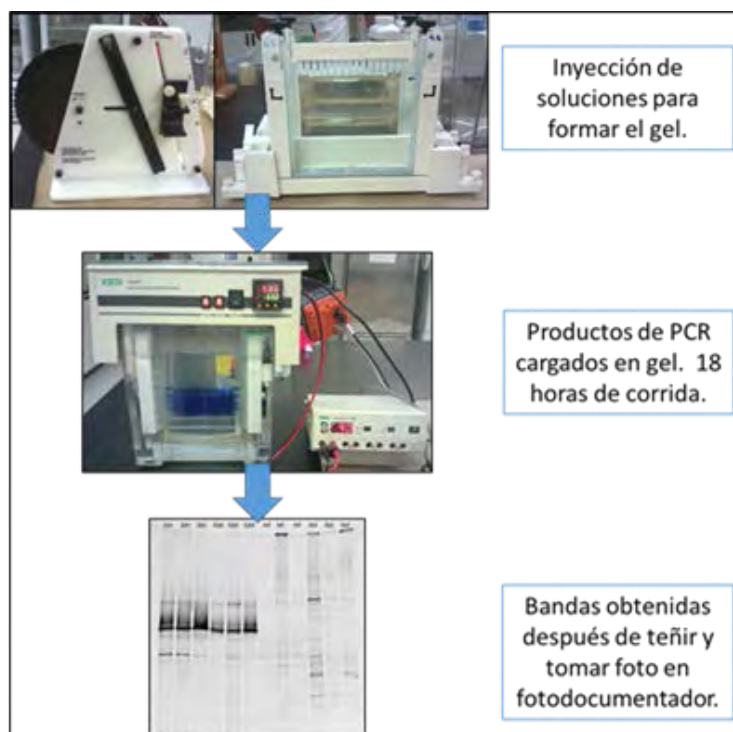


Figura 6. Montaje de sistema de corrida gel de DGGE.

5.6.1 PCR y purificación de ADN de bandas obtenidas en DGGE

Después de eluir el ADN de las bandas se procedió a realizar una PCR, con las mismas condiciones de las reacciones anteriores, ya que lo que se pretendía era amplificar los fragmentos separados para poder secuenciar posteriormente, en este caso el primer forward no presentó cola de poli GC. Luego se corrió un gel de agarosa al 1 % con el total del producto de PCR y se cortó la banda obtenida.

Para la purificación de las bandas se tomó la banda y se colocó en un tubo eppendorf, luego se siguió el protocolo de purificación de ADN metagenómico en columna de Wizard Purification Systems (Wizard®SV Gel and PCR Clean -Up System), de la casa comercial Promega.

5.6.2 Secuenciación de ADN metagenómico y análisis de secuencias DGGE

Los productos purificados fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología-IBT, UNAM. Posteriormente las secuencias obtenidas se analizaron en la bases de datos disponible en el NCBI (National Center for Biotechnology Information), usando la herramienta BLASTN® 2.2.32 (Basic Local Alignment Search Tool)(Zhang et al., 2000) para identificar el nivel de correspondencia con secuencias de 16S rRNA para bacterias y arqueas. De cada match se seleccionaron los cinco mejores hits, teniendo en cuenta para ello el porcentaje de cobertura, el E value y la identidad de cada uno de ellos con la secuencia dada. Posteriormente, se corroboró el resultado usando la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP), específica para RNA ribosomal, con la herramienta RDP's Classifier (Wang et al., 2007). Cabe destacar que, para las secuencias cortas (aprox 50 pb) no se muestran resultados significativos, puesto que la cantidad de datos fue insuficiente para clasificar.

5.6.3 Análisis de la imagen e índices de diversidad

Para cada uno de los geles obtenidos se realizó el análisis de la imagen con el programa informático Quantity One (Bio-Rad Laboratories®). Se marcaron las bandas de interés y se obtuvo la intensidad de las mismas para el posterior análisis de diversidad.

Para cada uno de los geles se hizo una matriz de presencia ausencia con las bandas identificadas, que fue posteriormente utilizada para calcular los índices de diversidad (Shannon-Weaver y Simpson) y realizar análisis de agrupamientos (Cluster) y MDS. Estos análisis se realizaron

utilizando el programa informático R (R Core Team, 2016) con los paquetes Vegan (Oksanen et al., 2016) y Xlsx (Dragulescu, 2014).

Índice de Shannon-Weaver

Es uno de los índices más utilizados para describir biodiversidad. Este muestra la heterogeneidad de la comunidad a partir de dos factores, el número de especies presentes y la abundancia relativa. Se basa en la siguiente fórmula:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2(p_i)$$

Donde **p_i** representa la abundancia relativa de cada especie (**n_i/N**), **S** hace referencia al número de especies o riqueza de las mismas, **n_i** es igual al número de individuos de la especie y **N** es el número de individuos de todas las especies (Bravo-Nunez, 1991; Pla, 2006).

Índice de Simpson

El índice de Simpson, es un índice de dominancia lambda. Este se ve influenciado por la abundancia de las especies más comunes y expresa la probabilidad de que dos individuos tomados al azar pertenezcan a la misma especie. Al igual que otros índices de diversidad, se ve también influenciado por el tamaño de la muestra. Este índice se distribuye entre 0 y 1, representando valores cercanos a cero altas diversidades y poca dominancia de especies y valores próximos a 1 alta dominancia y poca diversidad (Bravo-Nunez, 1991).

Cluster

Esta herramienta agrupa elementos similares en grupos (clusters), de esta forma los objetos similares pertenecen a un mismo grupo (Pascual Gonzalez, 2010). Es una herramienta para análisis exploratorio de los datos, por lo tanto dos objetos fuertemente relacionados o con valores similares en cierta variable o variables van a permanecer cercanos en el plano de visualización. Para establecer tal similitud se usó el índice de *Bray-Curtis*, que no se ve afectado por la presencia o ausencia de especies raras en las muestras ni por la inclusión de nuevas muestras en el análisis.

En este caso se mide la disimilitud, donde se obtienen valores entre 0 y 1, cuando estos se acercan a 0 las muestras son más similares y por el contrario cuando se acercan a 1 son más diferentes. Da más peso a las especies abundantes y menos a las raras (Field et al., 1982).

Escalamiento No- Métrico Multidimensional (NMDS)

Los métodos de escalamiento multidimensional en general buscan una representación parsimoniosa de los individuos en un espacio de baja dimensionalidad. La parsimonia hace referencia a que las distancias entre los individuos representan óptimamente sus similitudes en el espacio variable. Existen dos tipos de escalamiento, el métrico (MDS) y el no métrico (NMDS). El Escalamiento No-Métrico Multidimensional (NMDS) se basa en el *ranking* de distancias entre los puntos para ordenar muestras o individuos espacialmente. Este no establece una relación lineal entre las proximidades y las distancias, sino que supone una relación monótona creciente entre ambas. Tanto para el análisis métrico (MDS) como para el NMDS se hace necesario el uso de un coeficiente que permita evaluar la bondad del modelo, el valor mínimo es 0 y el límite superior es $\sqrt{1-(2/n)}$. Por lo tanto: 0.2= pobre, 0.1= aceptable, 0.05= bueno, 0.025= excelente y 0.0 =perfecto (Carrión, 1985; Kenkel et al., 1986).

5.7 Secuenciación masiva de amplicones del gen 16S en diferentes estadios

Se realizó la extracción de ADN por el método de extracción de *lisis in situ* y absorción de sílice (Rojas-Herrera et al., 2008) en las muestras de nauplios, protozoa postlarvas (1 a 3) provenientes de los sistemas de cultivo de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán y juveniles de la granja camaronera La Marca. Posteriormente, se comprobó la calidad de ADN con una electroforesis en gel de agarosa y la cantidad del mismo con el fluorómetro Quantus™ (Promega®). El análisis de estas muestras se hizo por plataforma de secuenciación en síntesis, con el sistema MiSeq de Illumina (Caporaso et al., 2012), el cual requiere el producto PCR de la muestra a secuenciar en una concentración no inferior 5 ng/μl, limpio e íntegro. Esta secuenciación fue realizada por el laboratorio de Servicios Genómicos del Cinvestav- Langebio.

Con el fin de amplificar las regiones hipervariables V3 y V5 del gen 16S ARNr se usaron los primers 357F (5' CTCCTACGGGAGGCAGCAG 3') (Turner et al., 1999) y CD (R), (5' CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC) (Rudi et al., 1997). La región amplificada tiene una longitud de 578 pb (Rudi et al., 1997; Turner et al., 1999; Yang et al., 2016).

5.7.1 Manejo de datos de secuenciación masiva

Cada uno de los archivos con las secuencias obtenidas para cada una de las muestras fue sometido a análisis de calidad con la herramienta FastQC (Andrews S, 2010). Posteriormente, se seleccionaron las secuencias con un valor de calidad de Phred 33 superior a Q20 mediante el programa Prinseq (Schmieder y Edwards, 2011). Luego los archivos con las lecturas de cada muestra fue subido a la plataforma de identificación One Codex (<https://app.onecodex.com/>) (Minot et al., 2015). Después de obtener la clasificación taxonómica de cada grupo de secuencias se analizaron los índices de diversidad en el programa estadístico R, con el paquete Vegan (Oksanen et al., 2016).

One Codex:

Esta, plataforma en línea usa apareamiento de *k-mers* para encontrar la asignación más correcta de cada secuencia utilizando la aproximación de ancestro común más bajo (Lindgreen et al., 2016). Cada lectura se rompe en trozos y se forman *k-mers* de 31 pb, la secuencia construida a partir del proceso anterior es comparada con la base de datos que contiene *k-mers* conocidos y únicos para cada grupo taxonómico, posteriormente cada *contig* se asigna al clado microbiano que más se asemeja (Minot et al., 2015). Se ha reportado que esta herramienta es más precisa y está más curada que otras herramientas como Kraken o MG-RAST (Brown et al., 2017).

6. RESULTADOS

6.1 Colecta de muestras

Se colectó un total de 91 muestras, dentro de las cuales se encuentran representantes de los diferentes estadios del ciclo de vida del camarón blanco. Estos se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 ml que contenían alcohol al 70 % y se guardaron para usos posteriores.

6.2. Extracciones y cuantificación de ADN metagenómico del camarón.

Se realizaron 91 extracciones de diferentes muestras de camarón en los estadios descritos con anterioridad. Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación de ADN y se usaron los ADNs que mostraron mejor calidad (cociente entre los valores de absorbancia a 260nm y a 280 nm entre 1.8 y 2.0) y cantidad (Figura 7).

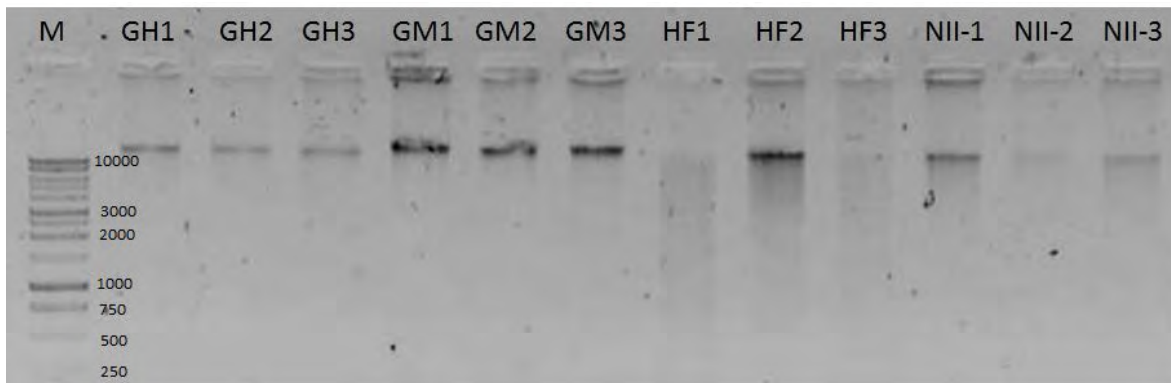


Figura 7. Extracciones de ADN metagenómico de las gónadas de hembras (GH) y machos (GM), huevos fértiles (HF) y nauplios (N) de camarón blanco (*L.vannamei*). Marcador de 1 kb (M). Las muestras de mala calidad son aquellas que muestran barridos (HF1 y HF3) o que muestran bandas muy claras (NII-2); las muestras de buena calidad están representadas por aquellas con bandas definidas e intensas (por ejemplo GM1, HF2, NII-1).

6.3 PCR de las muestras de camarón

Antes de realizar las PCR se tomaron alícuotas de todas las extracciones de ADN y se llevaron a una concentración de 75 ng/μl. Luego se realizó la PCR de acuerdo con las condiciones descritas con anterioridad (Figura 8). Para cada reacción de PCR se corrió un blanco negativo, con el fin de comprobar que no hubo contaminación de las muestras y por lo tanto falsos positivos.

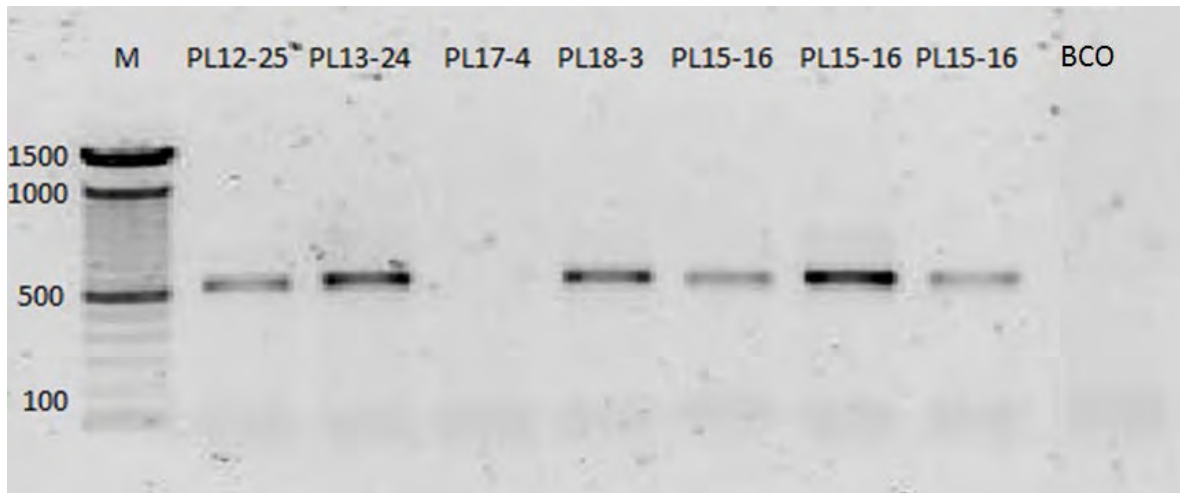


Figura 8. PCR del 16S ARNr para distintos subestadios de postlarvas de camarón blanco sometidas a descensos de salinidad. Postlarva 12 a 25 de salinidad (PL12-25), postlarva 13 a salinidad de 24 (PL13-24), postlarva 17 a salinidad de 4 (PL17-4), postlarva 18 a salinidad de 3 (PL18-3) y postlarva 15 a 16 de salinidad (PL15-16). Marcador de 100 pb (M), blanco negativo (BCO).

6.4 Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) y purificación de ADN

En total se realizaron 4 geles en los cuales se distribuyeron los diferentes estadios. En el primero se encuentran las gónadas de hembra, gónadas de macho, huevos y el estadio de nauplio (Figura 9). En el segundo se ubican las protozoemas, mysis y postlarvas (Figura 10).

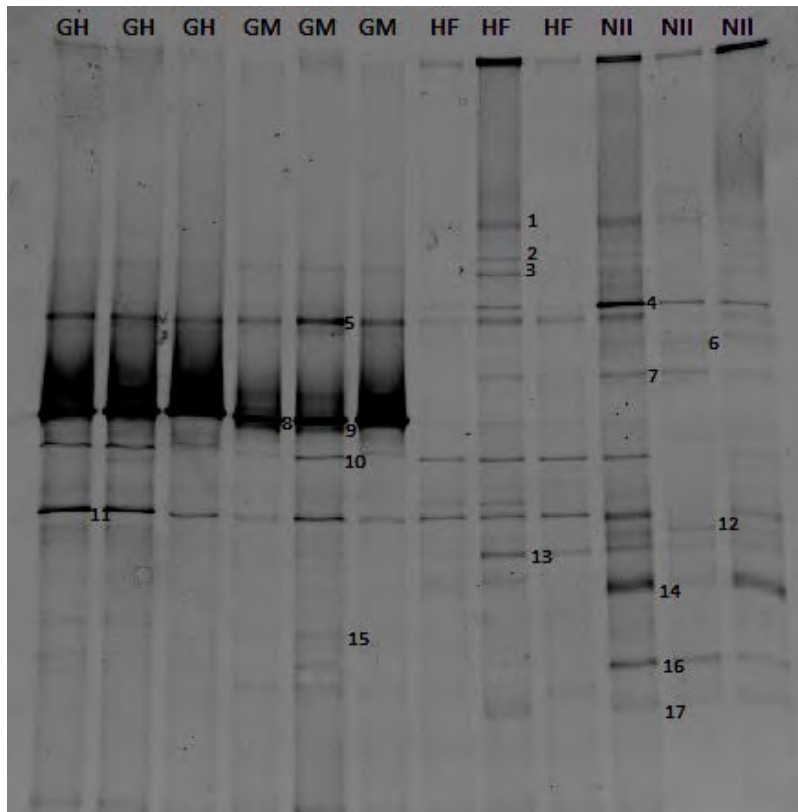


Figura 9. DGGE de muestras por triplicado de gónadas hembras (GH), gónadas machos (GM), huevos fértiles (HF) y nauplios (NII) de *L. vannamei*. Los números muestran las bandas que fueron elegidas para recuperar el amplicón y mandar a secuenciar.

Para el primer gel se encontraron un total de 17 bandas representativas, para el segundo gel se obtuvo un total de 16 bandas representativas. De las bandas representativas obtenidas para el primer gel se logró obtener ADN de 7 y de las pertenecientes al segundo gel se recuperaron otras 7. Lo anterior, teniendo en cuenta que una banda representativa es aquella que presenta alta intensidad, está en todas las muestras analizadas o es una banda única (diferente) en alguna de las muestras.

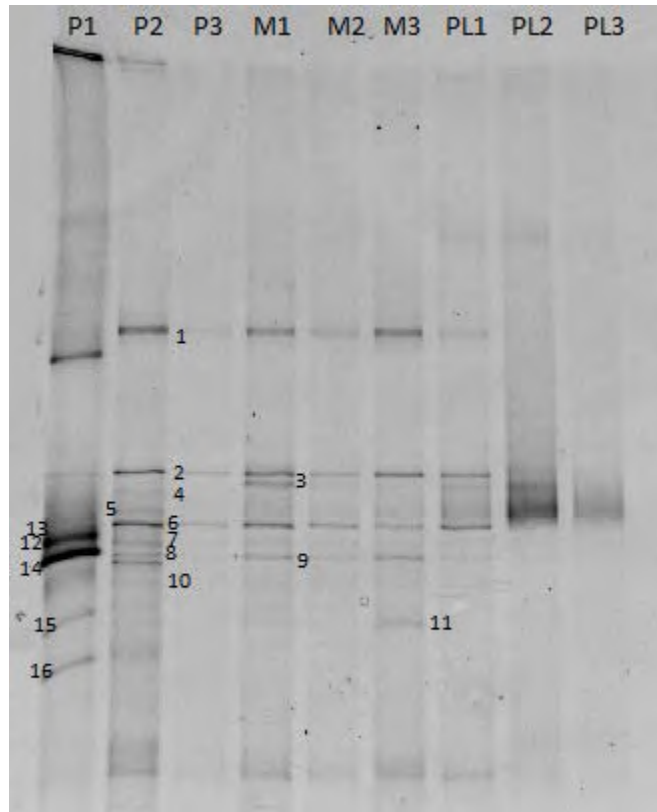


Figura 10. DGGE de muestras por triplicado de protozoas (P1 a P3), mysis (M1 a 3) y postlarvas (PL1 a 3) de *L. vannamei*. Los números muestran las bandas representativas cortadas y enviadas a secuenciar.

Para el tercer gel se tomaron postlarvas en agua salada (36) y en agua dulce (24,16, 12 y 4). Allí se presentaron 33 bandas representativas (Figura 11), de las cuales se logró amplificar 17.

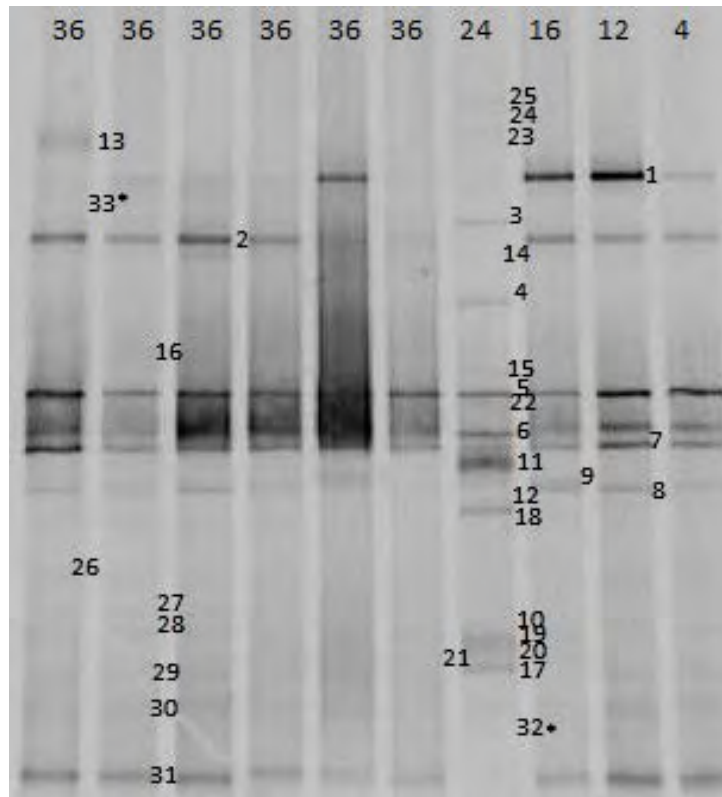


Figura 11. DGGE cambios de salinidad para postlarvas, transición agua salada (36) a agua dulce (24, 16, 12, 4). La numeración muestra las bandas representativas, es decir las que se eligieron y cortaron para secuenciar.

Para el cuarto gel se usó ADN proveniente de camarones de la granja camaronera La Marca y los probióticos utilizados en estos cultivos. Estas muestras se distribuyeron de la siguiente forma: postlarvas de camarón en PL29, juveniles 23 días después de su siembra, juveniles 105 después de su siembra, probiótico usado en el sedimento (Probiótico BA: Biogestor de desechos orgánicos de uso acuícola), probiótico usado en el agua y el alimento y probiótico usado solamente en el alimento, estas por duplicado, para un total de 12 muestras en el gel de DGGE, se tomaron 30 bandas representativas (Figura 12). Se destaca que para los juveniles de 23 y 105 días después de su siembra fueron adicionados los probióticos antes mencionados, ya sea en el alimento o en el sistema de cultivo.

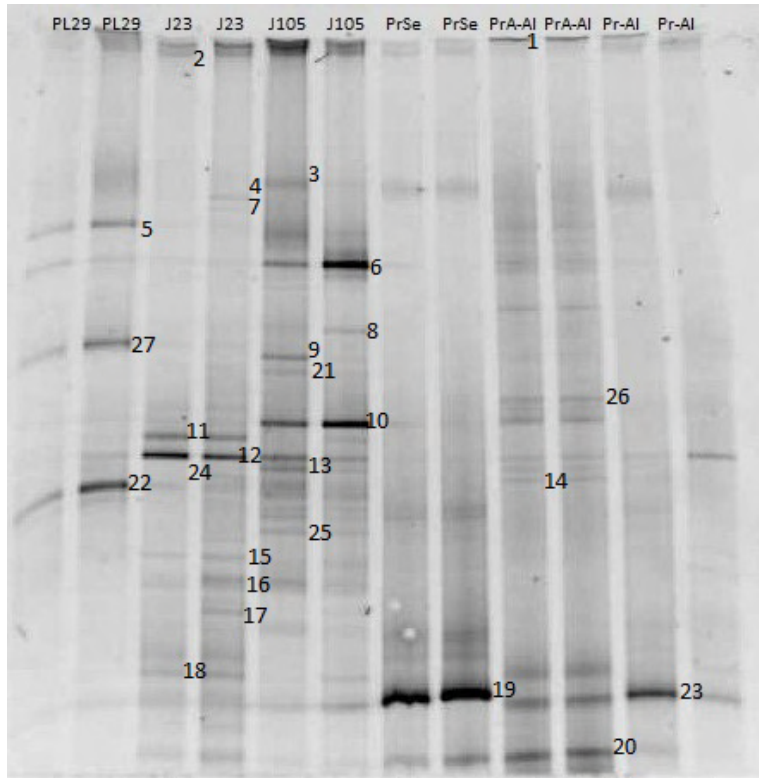


Figura 12. DGGE cambios en la comunidad bacteriana en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* en la granja de cultivo antes y después de incorporar probióticos al agua y a la dieta.

Cada una de las bandas se consideró como un OTU (Unidad Taxonómica Operacional, por sus siglas en ingles).

6.5 Análisis de secuencias obtenidas de DGGE

Para el gel número 1, se identificaron 5 OTUs, presentándose los géneros *Tenacibaculum* y *Aurespira* en huevos fértiles y nauplio. Para gónadas de hembra y de macho no se pudo identificar los OTUs, puesto que las bandas correspondientes no amplificaron mediante PCR (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de bandas provenientes de DGGE 1 (gónadas hembras, gónadas machos, huevos fértiles y nauplio III).

Banda	Longitud de la secuencia	Clasificación	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)	Acceso
1	545	<i>Tenacibaculum xiamenense</i> cepa WJ-1	97	0	95	NR 109729.1
2	547	<i>Bacteroidetes</i>				
3	551	<i>Bacteroidetes</i>				
4	477	<i>Aureispira maritima</i> cepa 59SA	98	0	96	NR_041537.1
5	54	No se encuentra similitud significativa				
6	211	<i>Flavobacteriales</i>				
7	59	No se encuentra similitud significativa				

En el gel número 2 se pudieron identificar 4 OTUs, la primera banda corresponde a *Bacteroidetes* y la segunda banda corresponde a *Burkholderia*, están presentes en protozoa, mysis y postlarva. La tercera banda representa al género *Nautella* y sólo se encuentra en mysis y postlarva. Por su parte, la cuarta banda que corresponde al número 7 en el gel pertenece al género *Roseovarius* (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de bandas provenientes de DGGE2 (Protozoa, mysis y postlarva).

Banda	Longitud de la secuencia	Clasificación	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)	Acceso
1	550	<i>Mucilagibacter daejeonensis</i> cepa Jip 10	98%	2.00E-175	87%	NR_041505.1
2	556	<i>Burkholderia cepacia</i> cepa NBRC 14074	97%	0	94%	NR_113645.1
3	199	<i>Nautella italica</i> cepa LMG 24365	92%	6.00E-91	99%	NR_042673.1
4	88	No se encuentra similitud significativa				
5	92	No se encuentra similitud significativa				
6	59	No se encuentra similitud significativa				
7	201	<i>Roseovarius halotolerans</i> cepa HJ50	92%	1.00E-87	97%	NR_116320.1

Por su parte, el gel 3 muestra los cambios en la composición bacteriana en postlarvas de camarón blanco a medida que se reduce la salinidad. Se identificaron 8 OTUs y en todas las salinidades estudiadas se observan los géneros *Ralstonia*, *Roseovarius* y *Novosphingobium*. *Aurespira* solamente se encuentra a una salinidad de 24, *Pseudoruegeria* se puede ver en PL15 a 36 y 4 de salinidad (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de bandas provenientes de DGGE3 (postlarvas a 36, 24, 16, 12 y 4 de salinidad).

Band a	Longitud de la secuencia	Clasificación	Cobertura a (%)	Valor E	Identidad (%)	Acceso
1	538	<i>Bacteroidetes</i>				
2	553	<i>Bacteroidetes</i>				
3	546	<i>Aureispira maritima</i> cepa 59SA	99	0	99	NR_041537. 1
4	552	<i>Bacteroidetes sin clasificar</i>				
5	560	<i>Ralstonia pickettii</i> cepa 12J	93	0	99	NR_102967. 1
6	200	<i>Roseovarius halotolerans</i> cepa HJ50 16S	97	7.00E-96	98	NR_116320. 1
7	550	<i>Novosphingobium capsulatum</i> cepa NBRC 12533	88	0	97	NR_113591. 1
8	106	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i> cepa GJMS-35	93	1.00E-40	95	NR_134142. 1

Para el cuarto gel de DGGE, que representa a las postlarvas, juveniles y probióticos utilizados en la granja La Marca, no se logró amplificar ninguna de las bandas seleccionadas, por lo tanto no fue posible realizar la identificación bacteriana de los mismos.

6.6 Análisis de la imagen e índices de diversidad

Con las lecturas obtenidas de las bandas y su respectiva foto (Figura 13), se evaluó la riqueza y se hicieron los respectivos análisis de ordenación y diversidad.

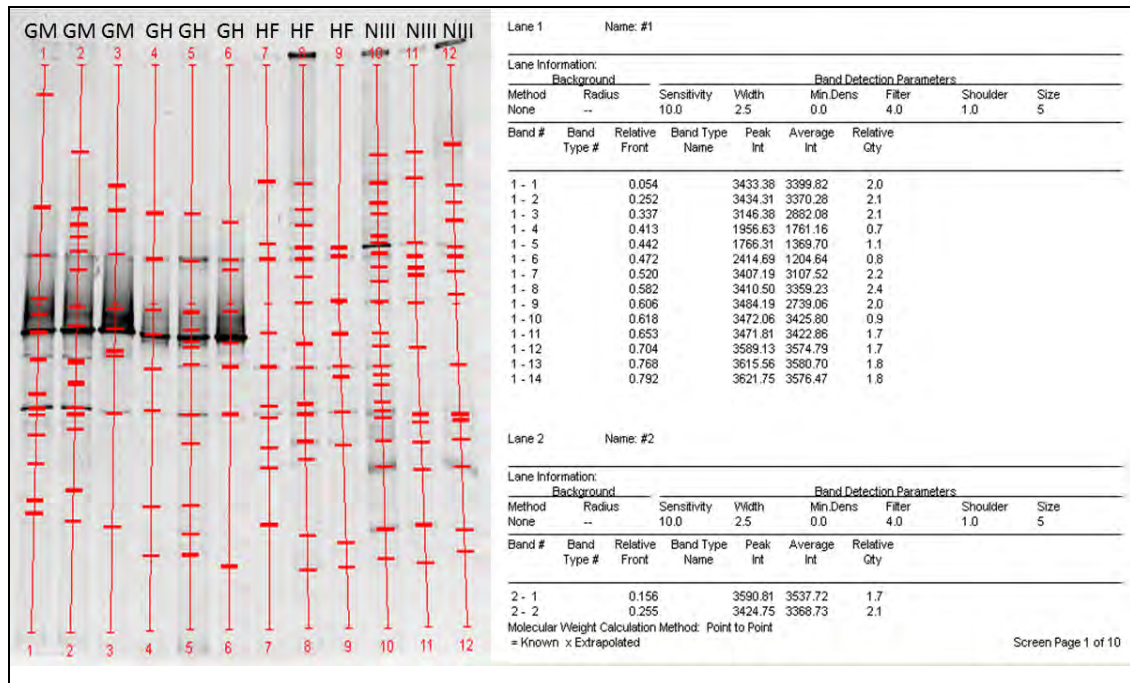


Figura 13. Análisis de bandas DGGE. Muestras de gónadas machos, gónadas hembras, huevos fértiles y nauplio III. Resumen de análisis de bandas arrojado por Quantity One.

En cuanto al parámetro de riqueza de bandas (número de OTUs), la muestra con mayor número fue la correspondiente a las gónadas de hembras con 27 bandas, seguida por la muestra de nauplio con 24 bandas, protozoa y huevos fértiles con 18 OTUs (Figura 14).

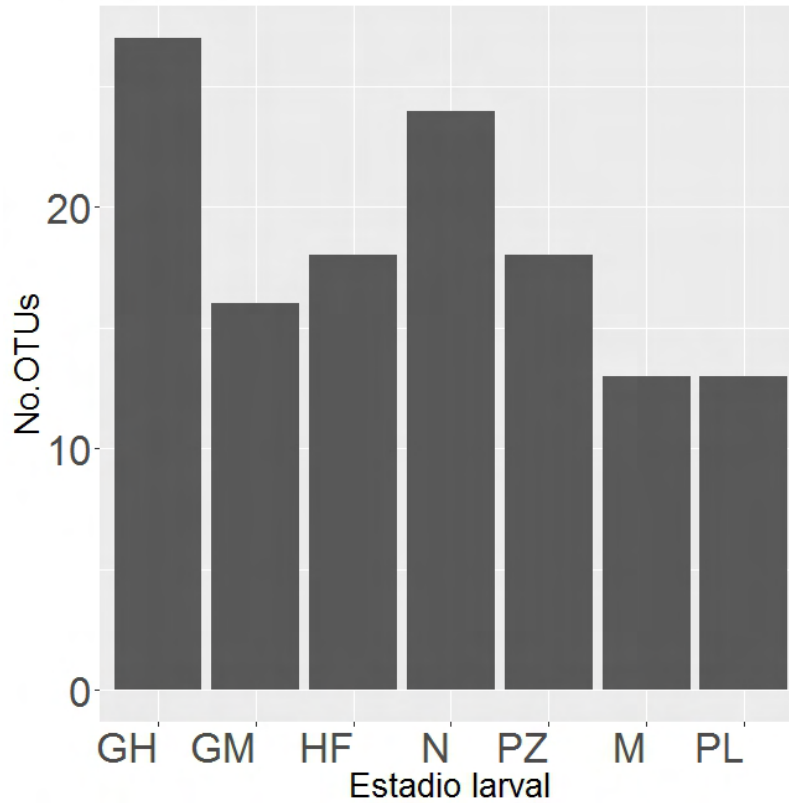


Figura 14. Número de OTUs en el microbioma de gónadas de machos (GM), gónadas de hembras (GH), huevos fértiles (HF), nauplios (N), protozoos (P), mysis (M) y postlarvas (PL).

Después de unir los resultados de los triplicados para cada una de las muestras se obtuvo que las gónadas de hembras contenían el mayor número de OTUs, entendidos también como número de bandas, seguidas del estadio de nauplio, huevos fértiles y protozoos se ubicaron en el tercer lugar. En relación a la diversidad de Shannon, los valores obtenidos mostraron que la muestra más diversa es la de gónadas de hembras y en segundo lugar la de nauplios. En cuanto a la dominancia de Simpson todas las muestras presentan valores altos que tienden a 1 (Tabla 4).

Tabla 4. Índices de diversidad microbiana para gónadas, huevos y estadios larvales de *L. vannamei*.

<i>Muestra</i>	<i>Riqueza (No. OTUs)</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
<i>Gónadas Hembras</i>	27	3.19	0.95
<i>Gónadas Machos</i>	16	2.69	0.93
<i>Huevos Fértiles</i>	18	2.81	0.94
<i>Nauplio</i>	24	3.07	0.95
<i>Protozoa</i>	18	2.80	0.93
<i>Misys</i>	13	2.44	0.91
<i>Postlarvas</i>	13	2.48	0.91

Posteriormente, se realizó un análisis *Cluster*, utilizando resultados obtenidos a partir de la matriz de similitud de *Bray-Curtis*, para determinar qué muestras son más similares en cuanto a diversidad de OTUs. Se encontró que el grupo más similar fue el compuesto por huevos fértiles y nauplio con un valor de disimilitud inferior a 0.5 (50%), seguido por el conformado por gónadas de hembras y protozoas, estos estableciendo una disimilitud mayor, aun cuando se comparan las gónadas de macho. El ordenamiento realizado para estas muestras da a conocer una notable cercanía entre las muestras de huevos fértiles y el estadio de nauplio, al igual que las muestras de gónadas de hembras y protozoa, apoyando así el análisis de *Cluster* hecho con anterioridad (Figura 15).

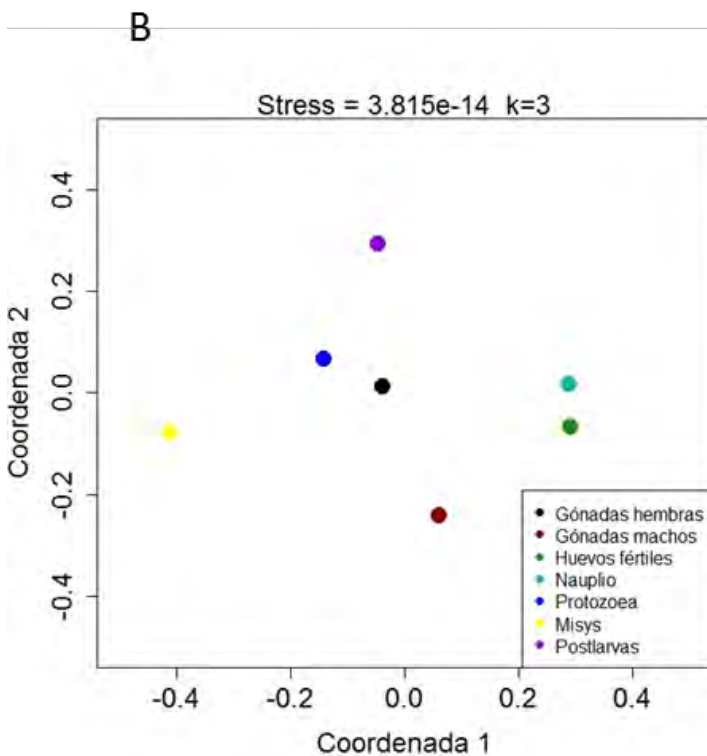
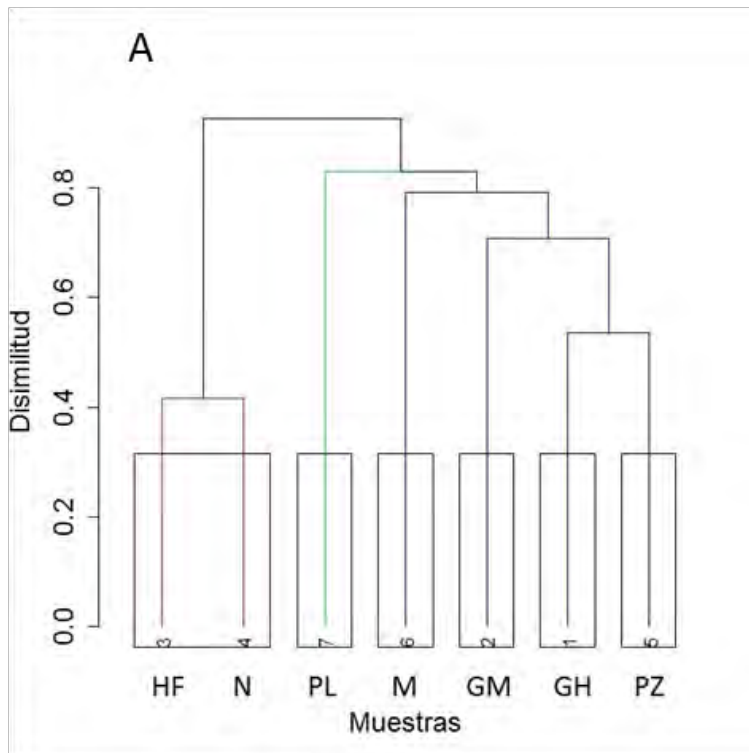


Figura 15. A) Cluster de disimilitud para la comunidad microbiana en gónadas, huevos y estadios larvales de *L. vannamei*. Rango de disimilitud de 0 a 1, siendo los valores cercanos a 0 muy semejantes y los valores cercanos a 1 muy diferentes. Se tomó a 0.5 como el punto de corte para formar los grupos. Las muestras corresponden a: Gónadas hembras (GH), Gónadas machos (GM), Huevos fértiles (HF), Nauplio (N), Protozoa (PZ), Mysis (M) y Postlarva (PL). Los números de 1 a 7 representan orden consecutivo de los estadios larvales. B) MDS para comunidad microbiana en gónadas, huevos y estadios larvales de *L. vannamei*. El stress representa una medida de bondad y ajuste, entre más pequeño y cercano a 0 sea más apropiada la representación del conjunto de datos, *k* hace referencia al número de dimensiones en las que se representan los datos.

En relación con los OTU's obtenidos en el DGGE realizado para los cambios de salinidad en postlarvas de *L. vannamei*, se encontró que las muestras con mayor número de bandas fueron la de postlarva 1 a 36 de salinidad con 15 bandas, seguida de la postlarva 13 a 24 de salinidad (Figura 16). No obstante, se observa en general que a medida que avanzan los días o el estadio se disminuye el número de bandas.

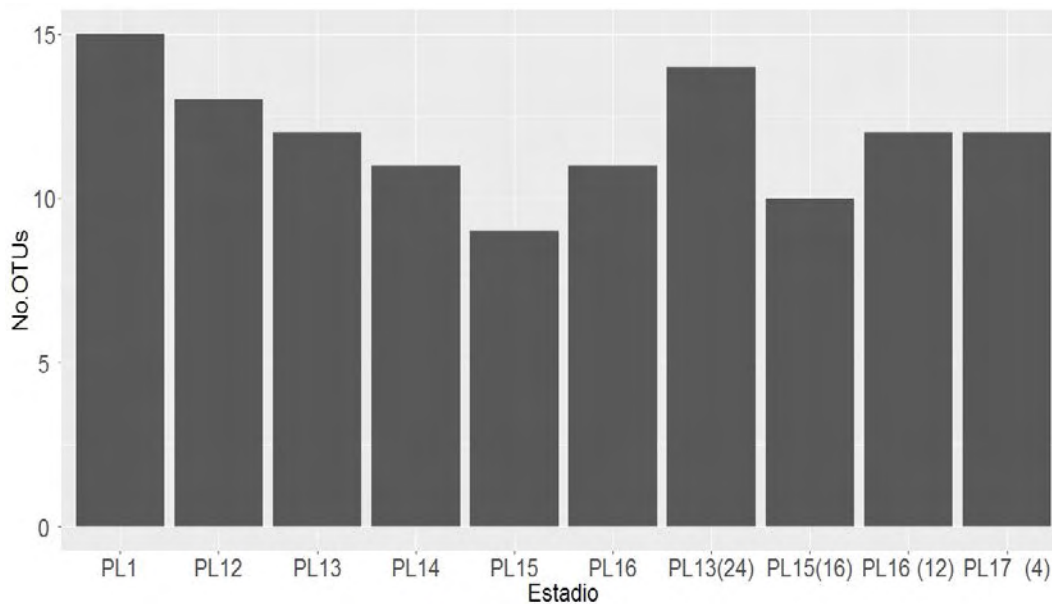


Figura 16. Número de OTUs en la comunidad microbiana de postlarvas de *L. vannamei* en condiciones de salinidad constante (36), PL1 a PL16, y sometidas a descensos en la salinidad (24 a 4).

Por su parte, la diversidad para las distintas muestras con diferentes valores de salinidad fue muy similar, al igual que la medida de dominancia (Tabla 5). Es decir, las muestras fueron muy parecidas ya que hubo una dominancia marcada por ciertas especies, en este caso entendidas como bandas u OTUs.

Tabla 5. Índices de diversidad para postlarvas de *L.vannamei* a salinidad constante y con descensos de salinidad.

	<i>Muestra</i>	<i>Salinidad</i>	<i>Riqueza (No. OTUs)</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
<i>Salinidad constante</i>	<i>Postlarva 1</i>	36	15	2.71	0.93
	<i>Postlarva 12</i>	36	13	2.56	0.92
	<i>Postlarva 13</i>	36	12	2.48	0.92
	<i>Postlarva 14</i>	36	11	2.40	0.91
	<i>Postlarva 15</i>	36	9	2.19	0.89
	<i>Postlarva 16</i>	36	11	2.40	0.91
<i>Cambios de salinidad</i>	<i>Postlarva 13</i>	24	14	2.64	0.93
	<i>Postlarva 15</i>	16	10	2.30	0.90
	<i>Postlarva 16</i>	12	12	2.48	0.92
	<i>Postlarva 17</i>	4	12	2.48	0.92

Pese a que la diversidad fue parecida entre las muestras, se formaron ciertos grupos en relación a la medida de disimilitud entre las mismas. Por lo tanto, las postlarvas que se mantienen en salinidad constante formaron un grupo marcado y las postlarvas que sufrieron un descenso de salinidad otro, a excepción de la muestra a 24 de salinidad (PL13), que se ubicó por fuera de estos dos grandes grupos, y la postlarva 16 a salinidad. En el MDS realizado para estas muestras se puede observar la proximidad presentada por los subestadios 16 y 17 (a 12 y 4 de salinidad, respectivamente). Las muestras cultivadas a salinidad constante también presentaron cercanía, a excepción de la postlarva 16 (Figura 17).

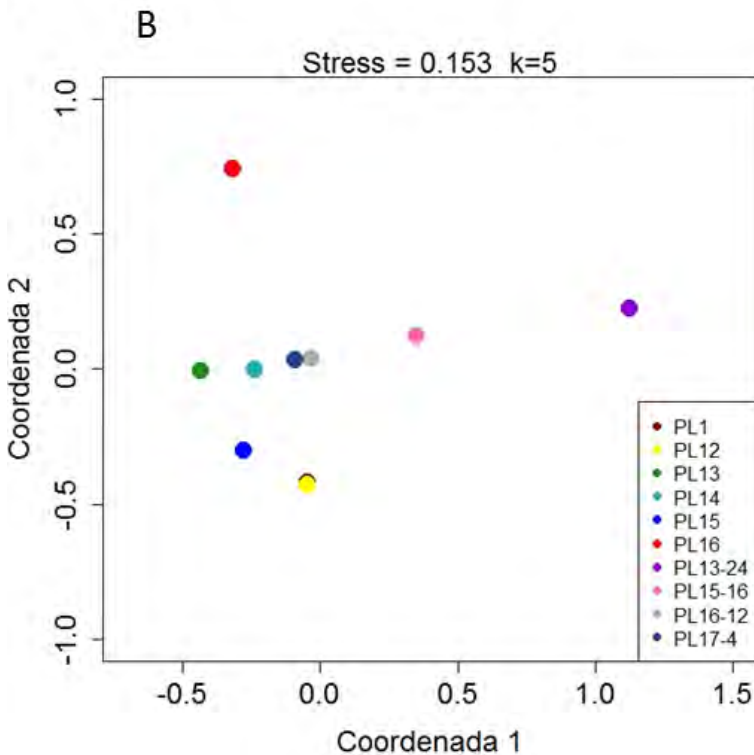
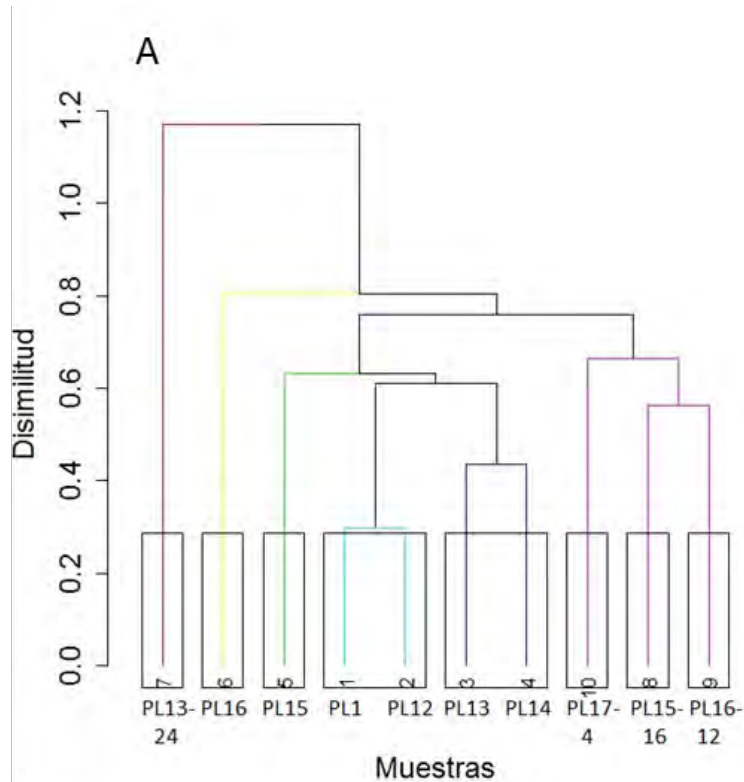


Figura 17. A) Cluster de disimilitud para la comunidad microbiana en postlarvas de *L.vannamei* a salinidad constante y con disminuci3n en la salinidad. Rango de disimilitud de 0 a 1, siendo los valores cercanos a 0 muy semejantes y los valores cercanos a 1 muy diferentes. Se tom3 a 0.5 como el punto de corte para formar los grupos. Postlarvas a salinidad constante (salinidad de 36): postlarva 1 (PL1), postlarva 12 (PL12), postlarva 13 (PL13), postlarva 14 (PL14), postlarva 15 (PL15), postlarva 16 (PL16); postlarvas sometidas a descenso de salinidad (24,16,12 y 4): postlarva 13 a 24 (PL13-24), postlarva 15 a 16(PL15-16), postlarva 16 a 12 (PL16-12) y postlarva 17 a 4(PL17-4). B) MDS para la comunidad microbiana en postlarvas de *L. vannamei* postlarvas de *L.vannamei* a salinidad constante y con disminuci3n en la salinidad. El *stress* representa una medida de bondad y ajuste, entre m3s peque1o y cercano a 0 sea m3s apropiada la representaci3n del conjunto de datos, *k* hace referencia al n3mero de dimensiones en las que se representan los datos.

En cuanto a las larvas y juveniles muestreados en la granja La marca, se observa que los estadios con mayor número de OTU's fueron los de juveniles 23 días y 105 después de la siembra. A diferencia de las postlarvas (29) sin probiótico y los probióticos usados por separado (Figura 18).

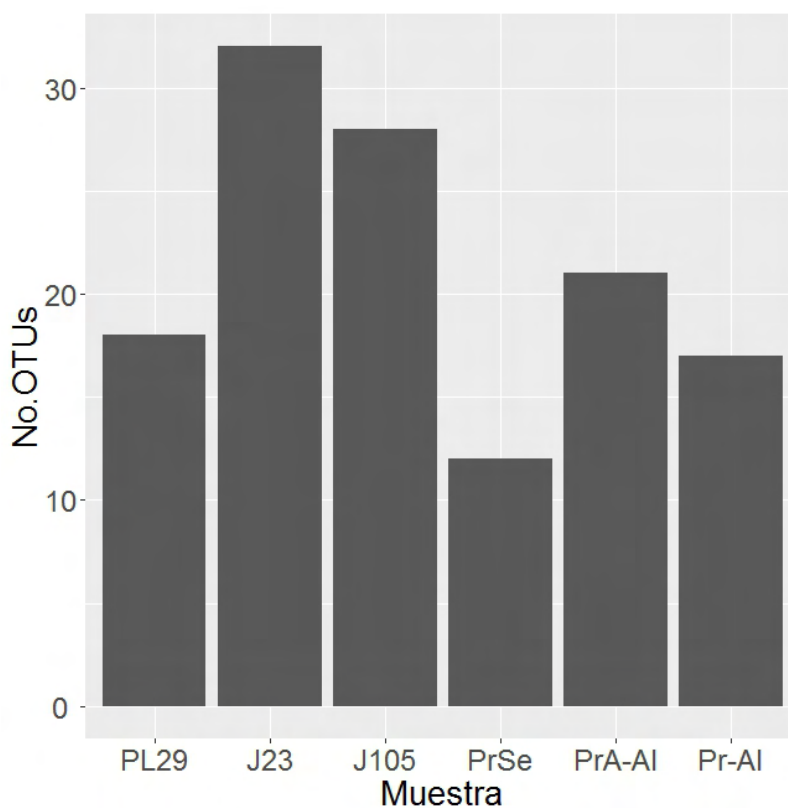


Figura 18. Número de OTUs en el microbioma de postlarvas y juveniles de la granja La Marca, con y sin adición de probióticos. Postlarva 29 (PL29), juvenil 23 días después de la siembra (J23), juvenil 105 días después de la siembra (J105), probiótico sedimento (PrSe), probiótico agua y alimento (PrA-AI) y probiótico alimento (Pr-AI).

En cuanto a las medidas de diversidad para estas muestras, los valores más altos se observan en los juveniles 23 y 105 días después de la siembra y en el probiótico agregado al agua y al alimento. Por otro lado, para todas las muestras se obtuvo valores altos de dominancia de Simpson (Tabla 6).

Tabla 6. Índices de diversidad microbiana para postlarvas y juveniles de *L. vannamei* cultivados en la granja La Marca.

<i>Muestra</i>	<i>Riqueza (No. OTUs)</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
<i>Postlarva29</i>	18	2.87	0.94
<i>Juvenil23</i>	32	3.42	0.97
<i>Juvenil105</i>	28	3.28	0.96
<i>Probiótico Sedimento</i>	12	2.45	0.91
<i>Probiótico Agua-Alimento</i>	21	3.00	0.95
<i>Probiótico Alimento</i>	17	2.79	0.94

En cuanto al análisis de disimilitud y la agrupación por esta misma medida, se observó que los juveniles 23 días después de la siembra y el probiótico agregado al agua-alimento establecen una relación muy cercana, conformando un gran grupo junto con las postlarvas 29 en el momento de la siembra y los juveniles 105 después de la misma con adición de probióticos. Por fuera, pero en la base de este grupo se halla el probiótico usado en el alimento y más lejano el probiótico agregado al sedimento. Cabe destacar que si se usa el criterio de similitud o disimilitud del 50%, todas las muestras serían diferentes. Lo anterior también puede verse en el MDS generado para este grupo de muestras, aquí la muestra de probiótico agregado al agua y al alimento presenta mayor afinidad con las muestras de juveniles (Figura 19).

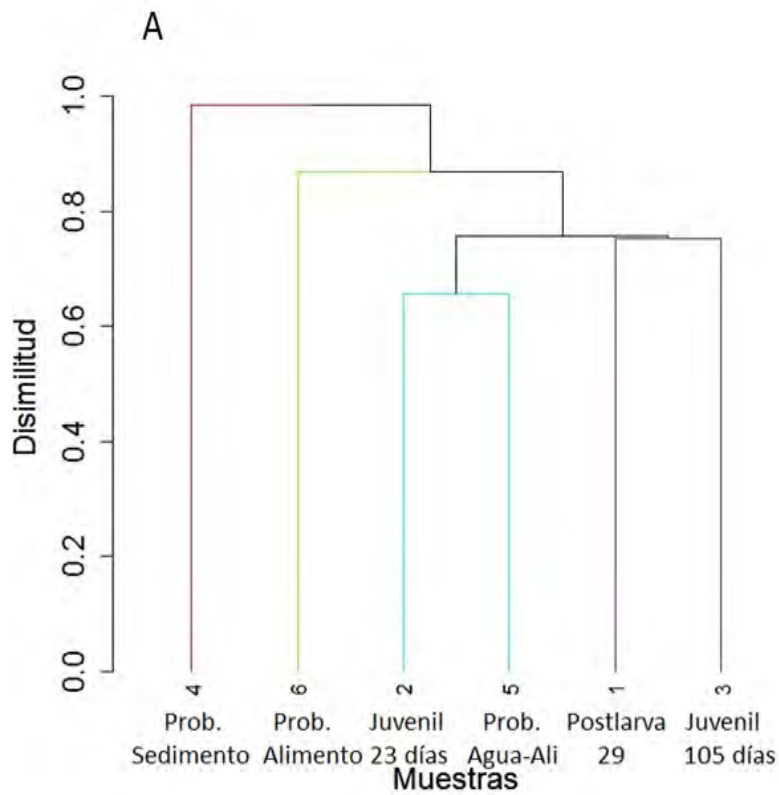
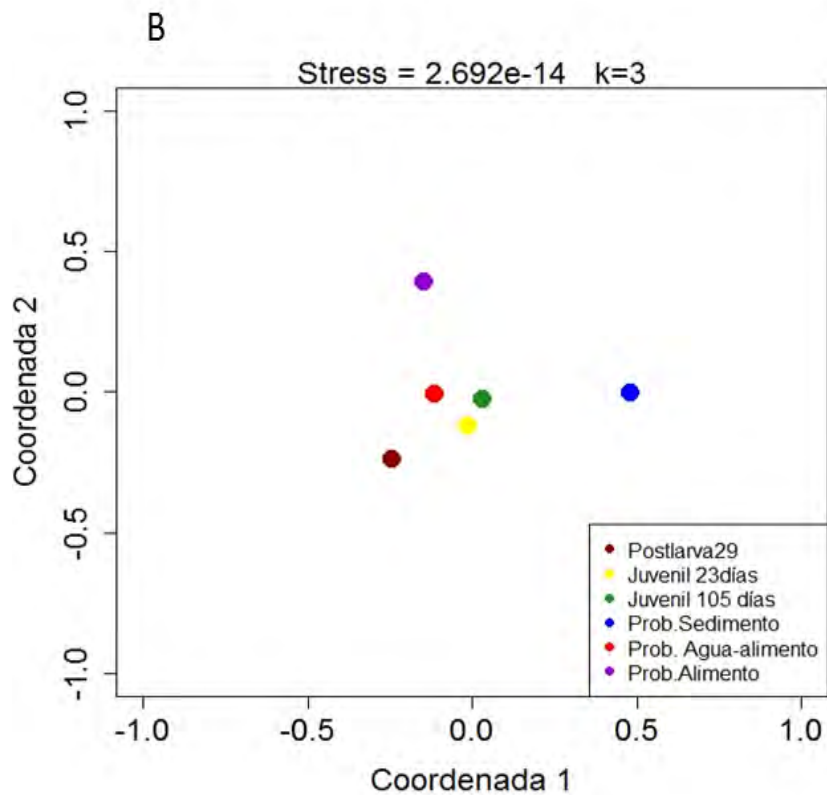


Figura 19. A) Cluster de disimilitud para comunidad microbiana en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* cultivados en la granja La Marca. B) MDS para comunidad microbiana en postlarvas y juveniles cultivados en granja La Marca. El *stress* representa una medida de bondad y ajuste, entre más pequeño y cercano a 0 sea más apropiada la representación del conjunto de datos, *k* hace referencia al número de dimensiones en las que se representan los datos.



6.7 Análisis de los datos de secuenciación masiva.

Se obtuvo un total de 285,638 lecturas, de estas un 63.3% (181,750) presentaron una calidad mayor de Q20 (Figura 20). Estas lecturas, tenían una longitud aproximada de 250 pb. Con las lecturas de buena calidad se procedió a realizar la clasificación taxonómica con el programa One Codex, logrando clasificar un total de 137,536 reads, este valor representa 75.7 % de las lecturas filtradas por calidad (Tabla 7).

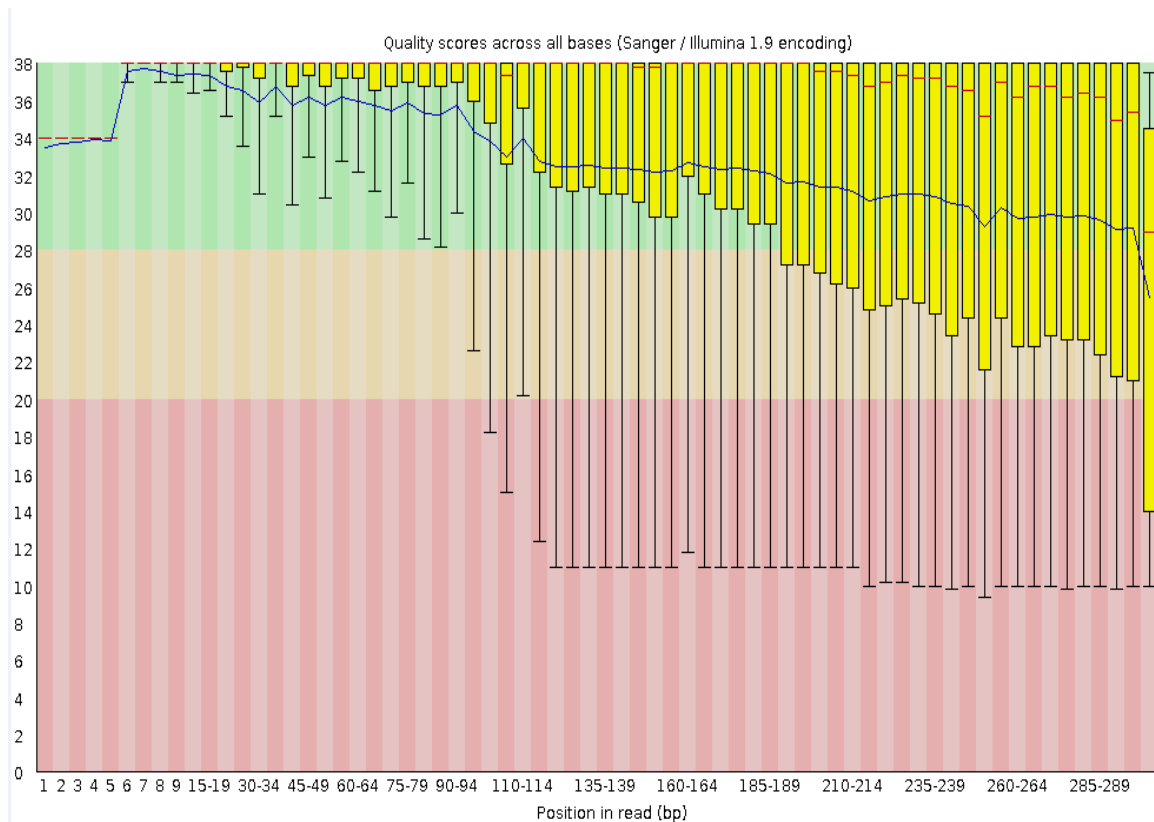


Figura 20. Evaluación de calidad de lecturas en el programa bioinformático FastQC. Lecturas de buena calidad con valores superiores a Q20. La línea roja en la parte central de las barras indica el valor de la mediana, la caja amarilla representa el rango intercuartílico (25 a 75 %), los bigotes superiores e inferiores hacen referencia a los puntos que están al 10 % y al 90 %, la línea azul representa el promedio de la calidad. El eje y representa los valores de calidad, los colores dividen en eje en calidades, el verde representa muy buena calidad, el naranja muestra lecturas con calidad razonable y el rojo aquellas que tienen baja calidad. El eje x hace referencia al número de pares de bases.

Al procesar los archivos arrojados por One Codex, en relación a la clasificación taxonómica de las lecturas de cada una de las muestras analizadas, se obtuvo un gran archivo con diferentes niveles;

de estos se tuvo en cuenta el conjunto de datos obtenidos a nivel de filo y familia. De este modo, se calculó la diversidad en cada una de las muestras, no sin antes realizar un análisis de rarefacción, en el cual se definió 949 lecturas como punto de partida para analizar los índices de diversidad a nivel de filo y 827 a nivel de familia (Figura 21). Lo anterior, con el fin de evitar estimaciones erróneas dadas por la diferencia en el número total de secuencias de las muestras. No obstante, se resalta que las muestras de juveniles 23 días y juveniles 105 días pertenecen a organismos provenientes de la granja La Marca y son independientes de las demás muestras analizadas.

Tabla 7. Cantidad de lecturas iniciales obtenidas por Illumina, filtradas por calidad y clasificadas taxonómicamente.

<i>Muestra</i>	<i>Grupo de secuencias</i>	<i>Antes del corte de calidad</i>	<i>Después del corte de calidad (Q20)</i>	<i>% lecturas de buena calidad</i>	<i>Lecturas clasificadas</i>	<i>% lecturas clasificados</i>
<i>Nauplio</i>	A55_R1	9368	6668	71.2	5914	88.7
<i>Nauplio</i>	A55_R2	9368	5695	60.8	5121	89.9
<i>Nauplio2</i>	A49_R1	34459	19009	55.2	15458	81.3
<i>Nauplio2</i>	A49_R2	34459	24224	70.3	20665	85.3
<i>Nauplio3</i>	A50_R1	27761	16137	58.1	12434	77.1
<i>Nauplio3</i>	A50_R2	27761	18080	65.1	14285	79.0
<i>Protozoa</i>	A56_R1	9963	6306	63.3	5745	91.1
<i>Protozoa</i>	A56_R2	9963	6578	66.0	6173	93.8
<i>Postlarva (3-6)</i>	A53_R1	25783	13674	53.0	9702	71.0
<i>Postlarva (3-6)</i>	A53_R2	25783	17374	67.4	13411	77.2
<i>Juveniles 23</i>	A51_R1	24302	16903	69.6	9272	54.9
<i>Juveniles 23</i>	A51_R2	24302	15704	64.6	7037	44.8
<i>Juveniles 105</i>	A52_R1	11183	8357	74.7	6669	79.8
<i>Juveniles 105</i>	A52_R2	11183	7041	63.0	5650	80.2
TOTAL		285638	181750	63.6	137536	75.7

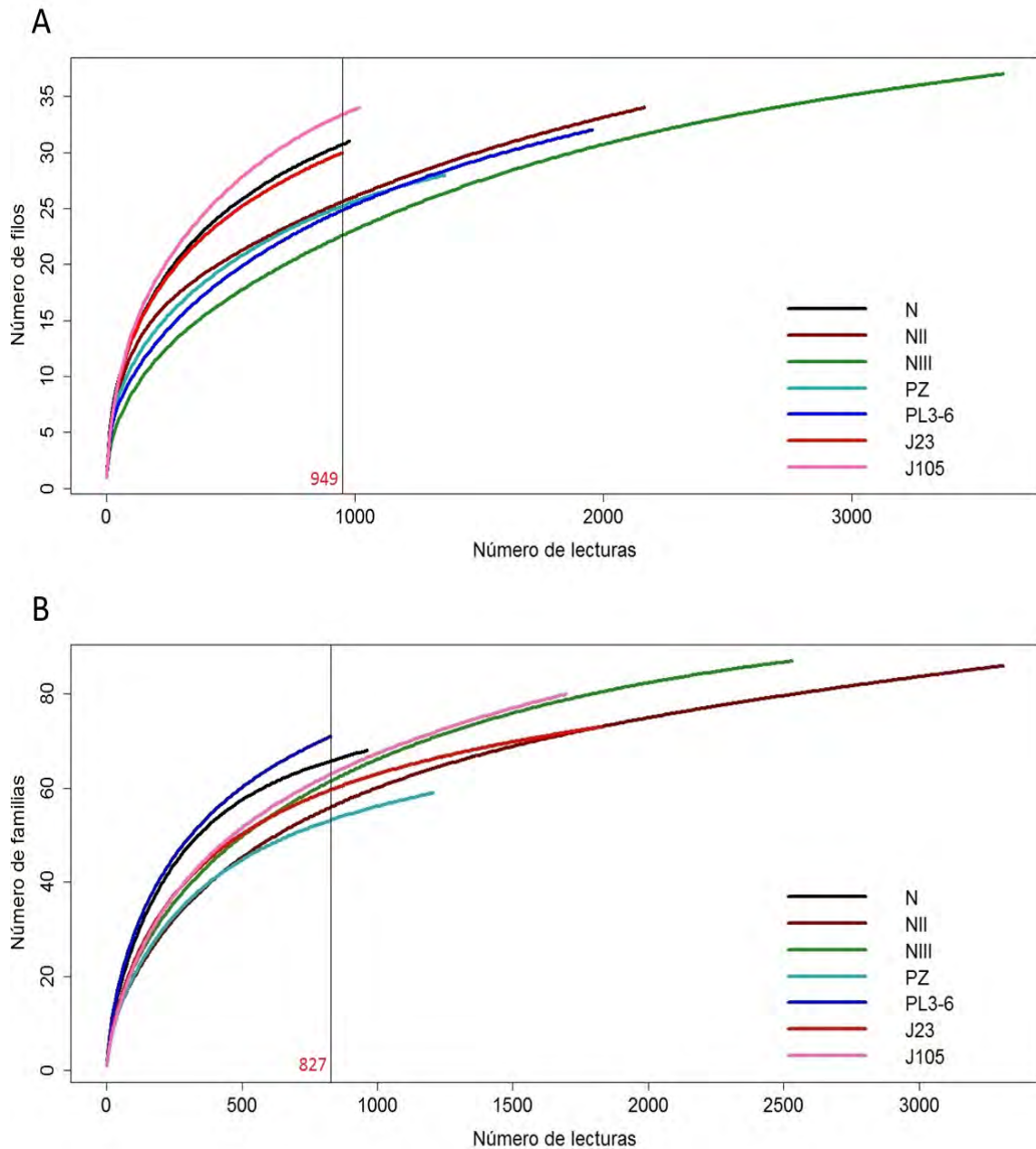


Figura 21. Curvas de rarefacción para filos y familias bacterianas encontradas en cada una de las siete muestras analizadas. La línea vertical indica el valor mínimo en la riqueza en la muestra con menor número de secuencias para el nivel taxonómico en cuestión (A: Filo, B: Familia). Muestras provenientes de Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán: Nauplio (N), Nauplio II (NII), Nauplio III (NIII), Protozoa (PZ) y Postlarvas 3 a 6 (PL3-6). Muestras provenientes de la granja La Marca: Juveniles 23 días (J23) y Juveniles 105 días (J105).

Por su parte, las muestras de los estadios nauplio, protozoa y postlarva presentaron una composición similar en cuanto a filos. Siendo los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Chlamydiae, Cyanobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria los más dominantes (Figura 22).

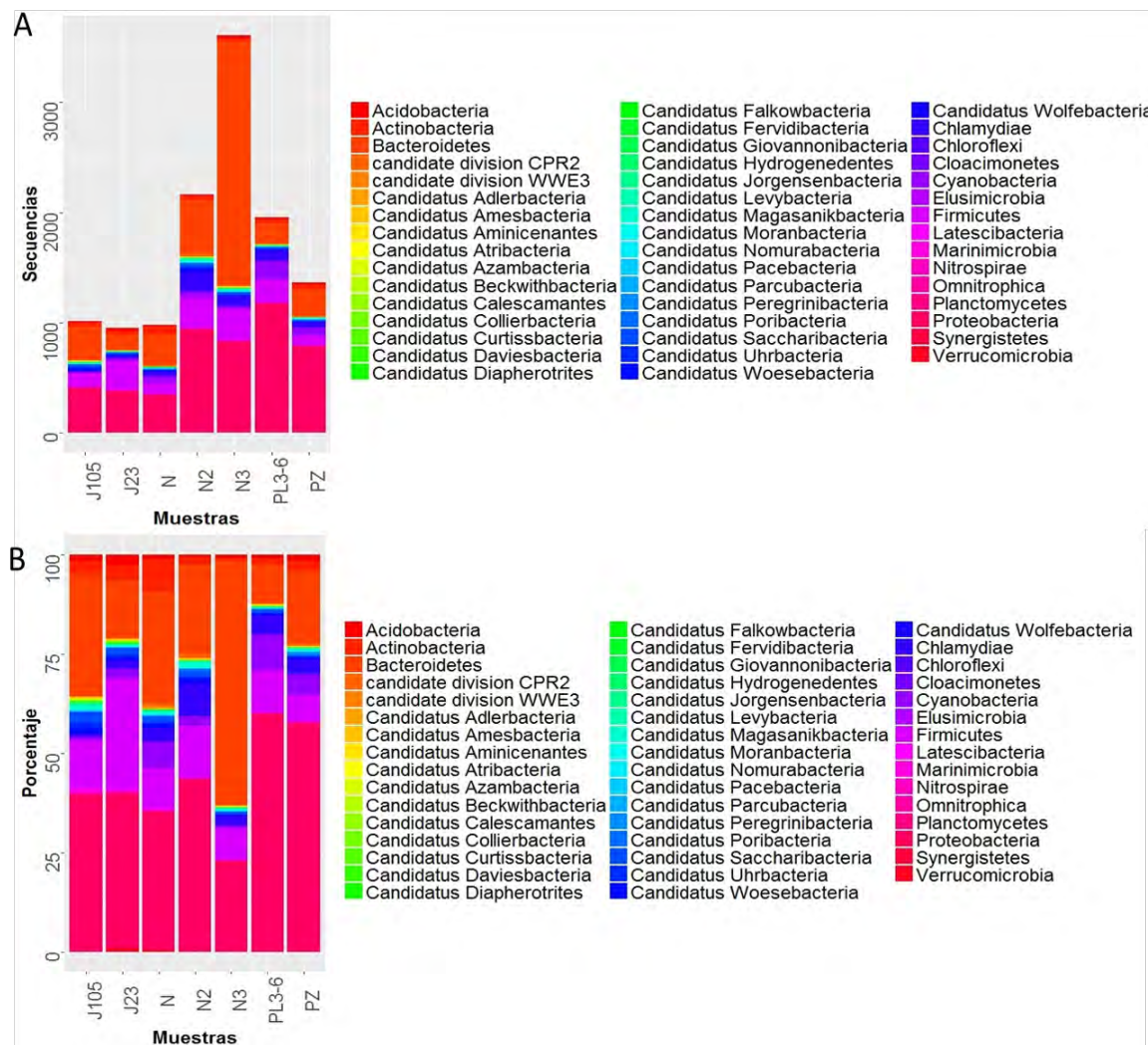


Figura 22. Filos bacterianos presentes en estadios larvales y juveniles de camarón blanco. Muestras provenientes de Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán: Nauplio (N), Nauplio 2 (N2), Nauplio 3 (N3), Protozoa (PZ) y Postlarvas 3 a 6 (PL3-6). Muestras provenientes de la granja La Marca: Juveniles 23 días (J23) y Juveniles 105 días (J105). A) Abundancia absoluta, B) Abundancia relativa.

En cuanto a la diversidad de filos para las muestras de larvas provenientes de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán, se observa una disminución en el índice de diversidad de Shannon a medida que pasan los estadios, al igual que una disminución en la dominancia de las

familias. Por otro lado, para las muestras de postlarvas de la granja La Marca la riqueza en las muestras de 105 días después de la siembra es mayor que la presente en las muestras de 23 días después de la siembra, no obstante la diversidad y la dominancia presentan valores similares (Tabla 8).

Tabla 8. Índices de diversidad para filos en el microbioma de *L. vannamei*.

<i>Muestra</i>	<i>Riqueza</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
<i>Nauplio</i>	31	1.93	0.78
<i>Nauplio2</i>	25	1.77	0.74
<i>Nauplio3</i>	22	1.17	0.54
<i>Protozoa</i>	27	1.56	0.64
<i>Postlarvas 3 a 6</i>	27	1.46	0.61
<i>Juvenil 23</i>	30	1.82	0.75
<i>Juvenil 105</i>	33	1.82	0.74

En relación a la diversidad de familias para las muestras provenientes del laboratorio de camarones de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán, se observa que en cuanto a la riqueza de las mismas la muestra de postlarvas 3 a 6 presenta un mayor número, seguido por la muestra de nauplio y nauplio3 (Tabla 9). Aunque el índice de diversidad de Shannon disminuye a medida que se cambia de estadio, se produce un cambio abrupto en las postlarvas 3 a 6 las cuales muestran el valor más alto en relación a este índice. También se puede ver un valor de dominancia de Simpson alto para todas las muestras. Por su parte, los juveniles provenientes de la granja La Marca muestran riquezas similares con una pequeña diferencia, es decir que los juveniles 23 días después de la siembra con inclusión de probiótico presentan menor número de especies identificadas que la muestra de juveniles 105 días después de la siembra. Pero la diversidad de Shannon se comporta de forma contraria a la riqueza, esta disminuye en la muestra de más días, cabe aclarar que esta diferencia es mínima al igual que la que se presenta con la dominancia de Simpson.

Tabla 9. Índices de diversidad para familias en el microbioma de *L. vannamei*.

<i>Muestra</i>	<i>Riqueza</i>	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
<i>Nauplio</i>	65	2.81	0.87
<i>Nauplio2</i>	51	2.40	0.84
<i>Nauplio3</i>	62	2.43	0.81
<i>Protozoa</i>	57	2.09	0.69
<i>Postlarvas 3 a 6</i>	71	2.96	0.89
<i>Juvenil 23</i>	61	2.28	0.75
<i>Juvenil 105</i>	63	2.17	0.73

Las familias bacterianas encontradas en las diferentes muestras de larvas procedentes de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán se vieron mayormente representadas los grupos Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Alteromonadaceae, Vibrionaceae y Bacillaceae. Para las muestras de nauplio, nauplio 2 y nauplio 3 la familia Flavobacteriaceae presentó mayor número de lecturas, no obstante en protozoa y postlarvas 3 a 6 se observó mayor número de secuencias correspondientes con Rhodobacteraceae. En los juveniles de la granja La Marca, las familias dominantes fueron Rhodobacteraceae y Bacillaceae para los juveniles 23 días después de ser sembrados y con probióticos, y para los juveniles 105 después de la siembra las familias con mayor número de secuencias fueron Rhodobacteraceae y Flavobacteriaceae (Figura 23).

Se realizó un heatmap o mapa de calor para observar la distribución de las familias bacterianas entre los estadios y para ver qué tan similares fueron las muestras analizadas (Figura 24). También, se hizo un MDS para apoyar la ordenación anterior dada por el heat map (Figura 25). De las siete muestras secuenciadas, cinco provenientes de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán y 2 de la granja La Marca, se distinguen dos grupos importantes al comparar la abundancia de las familias. Cabe destacar que este análisis se realizó con datos rarificados y un total de 118 familias bacterianas. El primer grupo lo componen las muestras de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán, correspondientes a Nauplio 2, Nauplio 3 y Postlarva 3-6 en un subgrupo, y Nauplio y Protozoa en otro subgrupo. El segundo grupo lo conforman las dos muestras de juveniles provenientes de la granja La Marca.

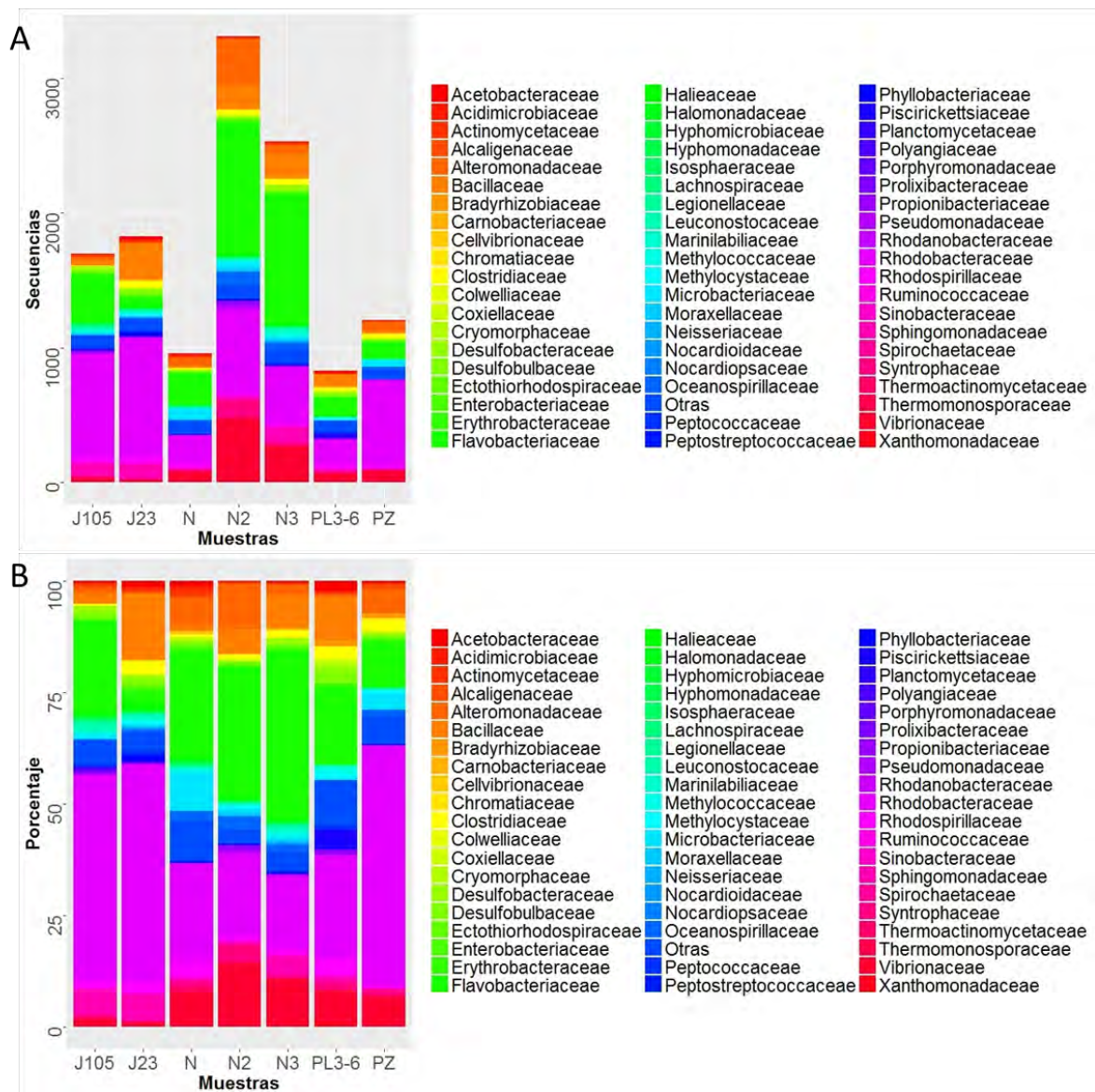


Figura 23. Familias bacterianas presentes en estadios larvales y juveniles de camarón blanco. Muestras provenientes de Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán: Nauplio (N), Nauplio 2 (N2), Nauplio 3 (N3), Protozoa (PZ) y Postlarvas 3 a 6 (PL3-6). Muestras provenientes de la granja La Marca: Juveniles 23 días (J23) y Juveniles 105 días (J105). A) Abundancia absoluta, B) Abundancia relativa.

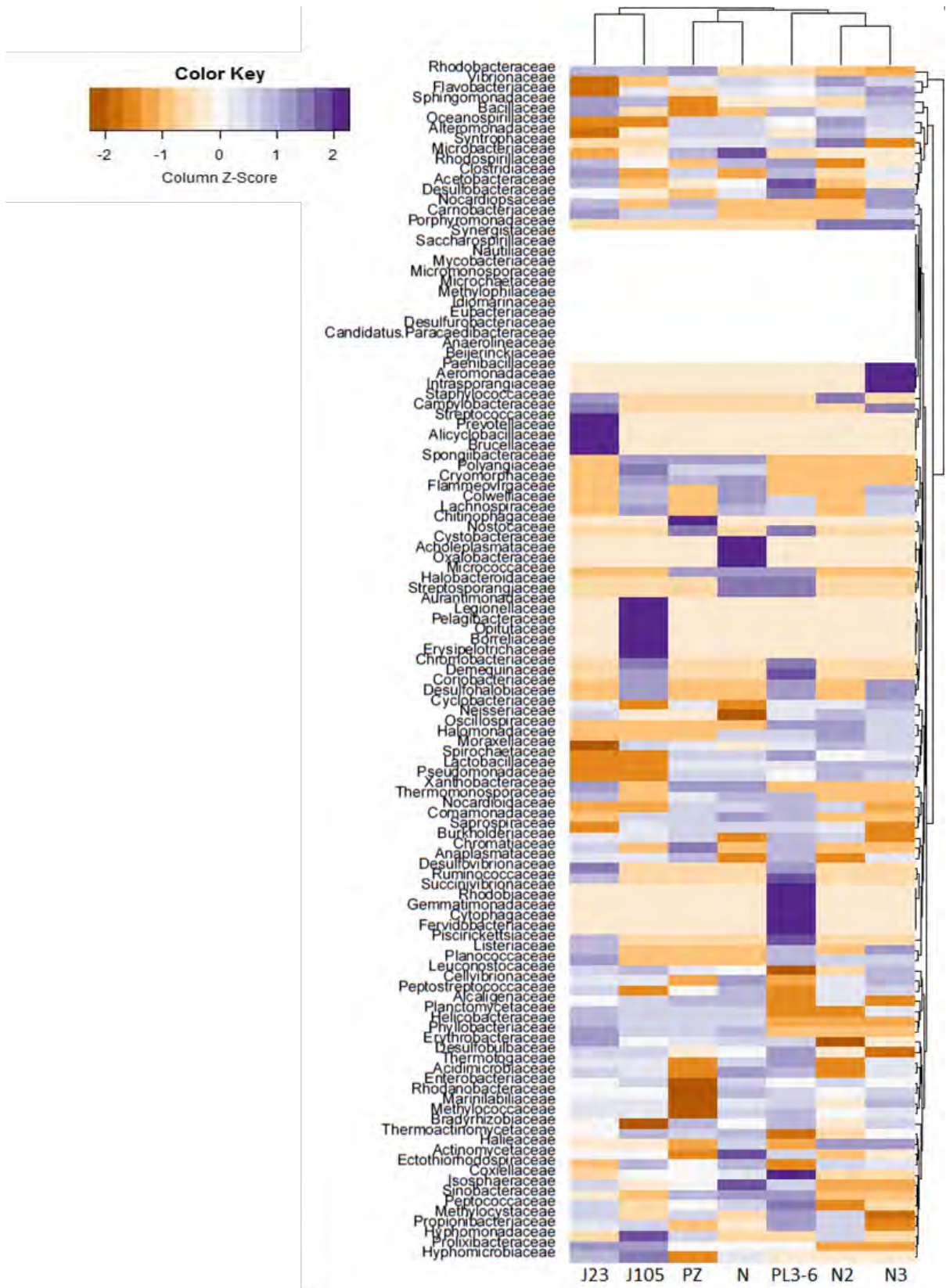


Figura 24. Heatmap para muestras de larvas y juveniles provenientes de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán y la granja La Marca en relación a las familias bacterianas presentes en las mismas. Los colores representan el valor de Z, donde valores cercanos a 2 (púrpura) representan muestras muy similares, valores cercanos a 0 (blanco) muestras similares y valores cercanos a -2 (naranja) muestras muy poco similares.

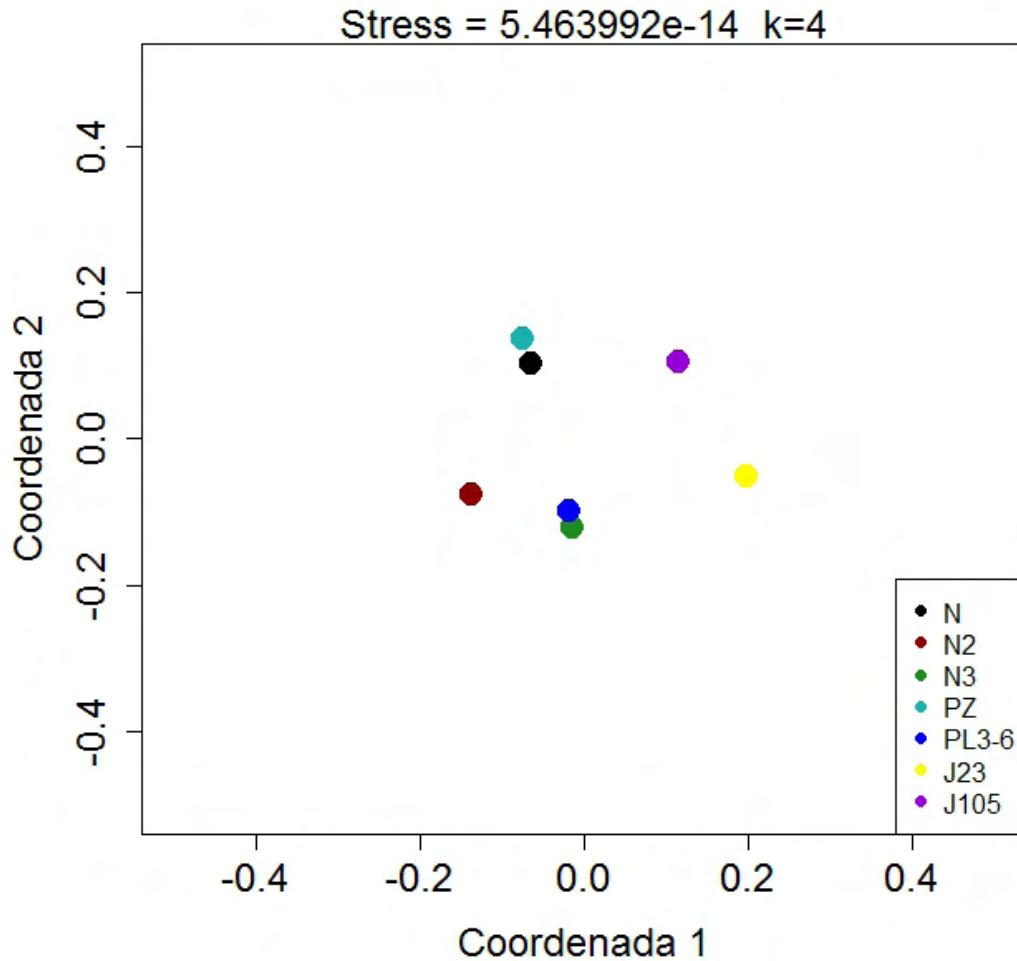


Figura 25. MDS para la comunidad microbiana en Nauplio (N), Nauplio2 (N2), Nauplio3 (N3), Protozoa (PZ) y Postlarva 3 a 6 (PL3-6) provenientes de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán y Juveniles 23 días de la siembra (J23) y Juveniles 105 días después de la siembra (J105) de la granja camaronera La Marca (tratados con probióticos). El *stress* representa una medida de bondad y ajuste, entre más pequeño y cercano a 0 sea más apropiada la representación del conjunto de datos, *k* hace referencia al número de dimensiones en las que se representan los datos.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Gónadas, huevos y estadios larvales de *L. vannamei*

Diversos estudios han caracterizado el microbioma de diferentes sistemas acuícolas, ya sea cultivos en los que interfiere una sola especie o varias de interés comercial. Se ha encontrado que en policultivos la diversidad bacteriana es más alta que en monocultivos (Li et al., 2010). En vertebrados, como el bacalao se han caracterizado las comunidades bacterianas asociadas a estadios tempranos del desarrollo, obteniendo como resultado colonización bacteriana incluso antes de que se presente la primera alimentación por parte de las larvas (Brunvold et al., 2007). En crustáceos, más exactamente en el caso de los camarones, se ha estudiado la comunidad microbiana presente en los tanques de cultivo (Johnson et al., 2008; Li et al., 2016; Srithep et al., 2014) y en el tracto digestivo (Liu et al., 2011; Niu et al., 2012; Rungrassamee et al., 2014; Xiong et al., 2015; Zhang et al., 2014). Sin embargo, no se habían realizado estudios que comprometieran al todo el organismo en general; por ello, para el presente estudio se tomó todo el individuo y se realizó la extracción de DNA para realizar perfiles de DGGE y secuenciar algunos estadios con el sistema MiSeq de Illumina. Por lo tanto, la comunidad microbiana analizada obedece a todo el organismo en su conjunto.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede evidenciar una fuerte relación de similitud en la comunidad bacteriana entre las gónadas de hembras y machos, al igual de estas con el estadio de protozoa. Lo anterior también se presenta en otros invertebrados, como el molusco *Argopecten purpuratus*, donde se han hallado dentro de los géneros bacterianos predominantes en gónadas y gametos a *Pseudomonas*, al igual que presencia de *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* y *Moraxella*. Al comparar óvulos y esperma se ha encontrado que los primeros son los mayores responsables de transmitir bacterias de adultos a larvas (Riquelme et al., 1994). En el caso de la microbiota intestinal, esta presenta un cambio gradual, respecto a los grupos bacterianos que la componen, desde el nacimiento de los organismos hasta su edad adulta. En seres humanos, el microbioma materno juega un papel importante en la posterior salud de los hijos. Por ejemplo, la comunidad microbiana en el intestino de los bebés está fuertemente influenciada por el microbioma de la madre, es así como los hijos nacidos por parto vaginal adquieren el microbioma de la vagina de la madre y los que nacen por cesárea adoptan el de la piel circundante (Dunlop et al., 2015). En el presente estudio también se observa una fuerte relación de similitud entre los huevos fértiles y los nauplios, este último es el primer estadio larval después de que los huevos

son fecundados. Cabe destacar que la mayoría de las bacterias pertenecientes a la comunidad bacteriana de los camarones se transmiten verticalmente vía huevos (Pangastuti et al., 2010). Por lo anterior, no resulta raro encontrar una alta similitud entre estos dos estadios.

Por su parte, los estadios de Mysis y Postlarva son los que presentan menor similitud en el microbioma con el resto de los estadios. Sin embargo, entre estos dos hay una fuerte similitud, quizá dada por la inclusión de nauplios de *Artemia* sp. en su dieta. Estas diferencias se pueden atribuir también al tipo de alimentación suministrado a las larvas y a la estructura de sucesión bacteriana natural del cultivo (García y Olmos, 2007). Se ha comprobado que el paso de nauplio a protozoa es un acontecimiento crucial para las larvas de camarones peneidos, puesto que aquí se produce una muda que puede conducir a nueva colonización bacteriana proveniente del medio, causando efectos benéficos y perjudiciales al organismo. También, durante la etapa final del estadio de nauplio los tejidos internos del intestino posterior entran en contacto con el medio externo y por ende con la columna de agua, permitiendo así la colonización de bacterias provenientes del medio (Simões et al., 2002).

En relación a la diversidad entre este grupo de muestras, las gónadas de hembras resultan ser las más diversas, seguidas del estadio de nauplio. Cabe destacar que a medida que pasan los días o cambia el estadio la diversidad incrementa, tanto en muestras analizadas con DGGE como en las analizadas con MiSeq de Illumina.

Haciendo referencia a los grupos bacterianos presentes en estas muestras analizadas con DGGE, se encontraron en mayor abundancia a las Alphaproteobacteria. Dentro de estas bacterias, el linaje *Roseobacter* se ha encontrado en la mayoría de ambientes marinos, desde aguas costeras hasta el océano abierto. Este grupo muestra un amplio rango de diversidad metabólica y características fisiológicas, que le permiten formar biopelículas (Oh et al., 2009; Vandecandelaere et al., 2009). Las especies *Nautella italica* cepa LMG 24365, que se encontró en los estadios de mysis y postlarvas, y *Roseovarius halotolerans* cepa HJ50, que se halló en protozoas, mysis y postlarvas forman parte del microbioma de *L. Vannamei*, según los resultados de este estudio. En relación a las Betaproteobacterias, la especie *Burkholderia cepacia*, conocida anteriormente como *Pseudomonas cepacia*, también se encontró en protozoas, mysis y postlarvas. Esta bacteria en humanos actúa como patógeno aunque también se usa en biorremediación (Govan et al., 1996;

Mahenthiralingam et al., 2005), no obstante no se ha reportado algún efecto patógeno de esta especie sobre camarones (Nimrat et al., 2008).

En cuanto a los Bacteroidetes, en los percebes se ha encontrado *Aureispira maritima* cepa 59SA, al igual que en los huevos fértiles, nauplios y protozoas en el presente estudio. Esta bacteria se desarrolla a diferentes temperaturas entre 3 y 37 °C, en distintas salinidades. Forma parte de la familia Saprospiraceae, aislada de ambientes marinos, y está fuertemente asociada con sedimentos y organismos eucariotas. Cabe destacar que requiere de fuentes mínimas de nutrientes y se ha comprobado que tiene la capacidad de controlar poblaciones de cianobacterias y algas en ambientes acuáticos (JonMcIlroy y Nielsen, 2006); por lo tanto, encontrarla en estas muestras no resulta sorprendente. Por su parte, la Flavobacteria *Tenacibaculum xiamenense* se encuentra en abundancia en ecosistemas marinos, muchas veces se comporta como patógeno de peces y está ampliamente relacionada con especies de cultivo. Se ha reportado a *T. xiamenense* en muestras de agua de mar cerca y lejos de la costa a diferentes profundidades en la columna de agua. El género *Tenacibaculum*, por su parte, se destaca como uno de los patógenos más agresivos en el cultivo de peces. En crustáceos, más exactamente en camarones *T. Litopenaei*, se ha aislado de agua de cultivo y se ha comprobado su actividad quitinolítica (Habib et al., 2014).

7.2 Postlarvas de *L. vannamei* sometidas a cambios de salinidad

Al igual que otros crustáceos, el camarón blanco es isosmótico y tiene la capacidad de regular hasta cierto punto la concentración iónica en relación con la del medio y su temperatura (Rivera-Velázquez et al., 2008). Los nauplios son osmoconformadores, las postlarvas y adultos muestran regulación osmótica que les permite soportar amplias variaciones de salinidad y pH en las migraciones. Se ha demostrado que los juveniles crecen mejor a salinidades bajas y que la concentración iónica influye en la fertilización de los ovocitos (Martínez, 2002; Rivera-Velázquez et al., 2008). En relación a este parámetro químico, se observó que los estadios postlarvales de *L. vannamei* mantenidos en salinidad de 36 se organizaron en un mismo grupo de acuerdo a la similitud, a diferencia del conjunto de muestras que presentaron descensos en la salinidad, las cuales se ubicaron en otro grupo. Además, se puede evidenciar un pequeño incremento en la diversidad de las postlarvas sometidas a descensos de salinidad por encima de las que se encontraban a salinidad constante. Lo anterior se ha observado en muestras metagenómicas de salineras, donde la cantidad de grupos de bacterias y arqueas desciende a medida que la salinidad incrementa, no obstante uno de ellos se hace dominante con un marcado grado de

microdiversidad (Casamayor et al., 2002). También aparecen grupos nuevos en salinidades menores, mientras que en salinidades altas los clusters disminuyen provocando dominancia de un grupo (Benlloch et al., 2002). En sedimentos expuestos a diferentes salinidades se observa que la comunidad bacteriana es influenciada principalmente por la salinidad, ocasionando diferencias entre los grupos bacterianos presentes en fuentes de agua dulce, manglares y pastos marinos (Ikenaga et al., 2010).

En cuanto a la clasificación bacteriana por medio de secuencias, en el presente estudio a 24 de salinidad apareció una banda en el DGGE que no se encuentra en las otras salinidades, esta corresponde según su identificación en el NCBI a *Aureispira maritima* cepa 59SA. No obstante, esta bacteria si se encontró en los experimentos realizados en los estadios anteriores, lo que puede estar relacionado con la amplificación en el gel de corrida o un posible enmascaramiento de las bandas. Cabe resaltar que esta bacteria crece a distintas salinidades y está fuertemente asociada con sedimentos y organismos eucariotas (Hosoya et al., 2007). Además, requiere de fuentes mínimas de nutrientes y se ha comprobado que tiene la capacidad de controlar poblaciones de cianobacterias y algas en ambientes acuáticos. También, se ha comprobado la presencia de miembros de esta familia en ambientes de agua dulce y su importante actividad en el desglose de fuentes de carbono complejo en sistemas de aguas residuales (JonMcIlroy y Nielsen, 2006). En este gel de DGGE también se encontraron otras bandas asociadas al filo Bacteroidetes, las cuales obedecen a Bacteroidetes sin clasificar. De este grupo se reconoce su capacidad para colonizar todo tipo de ambientes, incluso tracto digestivo y ambientes marinos. También se destaca su papel en la degradación de compuestos de alto peso molecular, su capacidad de establecer transferencia horizontal de genes con otras especies bacterianas, la actividad mutualista con su hospedero y la posibilidad de actuar como patógenos. En ambientes marinos, se encuentran en la superficie, en sedimentos, biopelículas, corales, macroalgas, ventanas hidrotermales y en el bacterioplancton (Thomas et al., 2011).

En relación a las Proteobacterias, se ha encontrado que en estuarios las bacterias pertenecientes a α -proteobacteria se encuentran en salinidades superiores a 5 y β -proteobacteria en salinidades inferiores a 10, lo que sugiere que la salinidad puede jugar un papel significativo en la transición de roles entre α y β proteobacteria y en la conformación de la comunidad bacteriana en general (Bouvier, 2002). Dentro de este grupo, *Ralstonia pickettii* cepa 12J, que en el gel de DGGE aparece en todas las muestras analizadas, es característica de ambientes oligotróficos puesto que utiliza

distintos compuestos como fuente de carbono, además degrada gran cantidad de sustancias, lo que le permite ser un buen prospecto en biorremediación (Ryan et al., 2007). También se ha encontrado a *R. pickettii* en fuentes ambientales y se ha descrito su efecto patogénico para humanos en hospitales (Ryan et al., 2006; Yoneyama et al., 2000). En relación a *Roseovarius halotolerans* cepa HJ50, que se encuentra en todas las muestras en el gel de DGGE para este apartado, se describe como bacteria aerobia, gram negativa, se encuentra en sistemas con salinidades desde 3 y puede tolerar más de 20 (Oh et al., 2009). Por su parte, *Novosphingobium capsulatum* es una bacteria gram negativa, aerobia estricta y quimiorganotrofa que habita suelos, muestras clínicas, agua destilada y sedimentos costeros (Takeuchi et al., 2001). *Pseudoruegeria sabulilitoris* cepa GJMS-35 fue aislada de muestras de arena de mar y al igual que los demás miembros de su familia también provienen de muestras marinas de Corea del Sur.

7.3 Postlarvas, juveniles y probióticos granja La Marca.

Con el fin de comprobar la presencia de distintos probióticos en diferentes muestras ambientales y de alimentos se ha utilizado el análisis a partir de productos de PCR en DGGE (Tannock et al., 2000; Taras et al., 2007; Theunissen et al., 2005). En acuicultura se ha usado en el cultivo de peces (Sáenz De Rodríguez et al., 2009) y camarones (Luis-Villaseñor et al., 2013). Con esta técnica se puede evidenciar la aparición de nuevos grupos bacterianos en las muestras de camarones después de agregar el probiótico y por ende se puede corroborar la fijación del mismo. No obstante, en el presente estudio no se pudo identificar taxonómicamente cada una de las bandas aisladas puesto que no amplificaron después de ser cortadas; por lo tanto, solamente se realizaron los análisis de diversidad y agrupamiento a partir de la impresión de los geles de DGGE. Cabe destacar que al momento de muestrear los juveniles de 23 días los estanques en los que se encontraban fueron tratados con probióticos, tanto para el sedimento como para la comida y el agua de cultivo. Por ende, no resulta sorprendente el incremento en la riqueza de OTUs ni en la diversidad de las muestras.

El análisis de cluster con las bandas obtenidas en la DGGE muestra que se formaron cuatro grupos en base a la similitud de las bandas, el primero y más similar está compuesto por la muestra de probiótico agregado al agua y alimento y los juveniles 23 días después de la siembra, lo cual resulta consecuente con lo resaltado anteriormente. Luego, el siguiente grupo se compone de postlarvas 29, es decir al momento de la siembra en los estanques y sin probiótico, y juveniles 105 días después de la siembra con probiótico. El probiótico exclusivo para el alimento se encuentra

ligado a estos dos grupos pero con menor similitud, por último y menos similar a las demás muestras se ubica el probiótico del sedimento. Para la secuenciación por MiSeq de Illumina se pudo observar que las muestras correspondientes a la granja La Marca se ubicaron distantes de las correspondientes a la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán. La diversidad para estas muestras fue muy similar, pero se observa un valor más alto en los juveniles 23 días después de la siembra tal y como sucede con en el DGGE.

7.4 DGGE vs. Secuenciación masiva (Illumina)

El estudio del microbioma de diferentes sistemas y organismos ha llevado a la creación y mejora de distintas técnicas moleculares en los últimos años. Sin embargo la mayoría se basa en la secuenciación de distintos fragmento de interés, como por ejemplo el análisis del gen 16S rRNA, el cual permite establecer relaciones entre microorganismos cultivables y no cultivables aún desconocidos. El DGGE es una de las técnicas que se ha utilizado en los últimos años en estudios metagenómicos, aun así presenta algunos inconvenientes a la hora de realizar el análisis de los geles de corrida. Por ejemplo, aquí las poblaciones dominantes presentan mayor intensidad o son mejor reveladas en comparación con las poco dominantes las cuales pueden esconderse tras otras bandas, dando como resultado sobreestimación o subestimación de la diversidad de la muestra (Fernández y Le, 2005; Tallinn University of Technology, 2012). También la separación de bandas resulta engorrosa y muchas veces no se logran amplificar los productos esperados. La secuenciación masiva tipo Illumina MiSeq resulta ser más poderosa que técnicas que requieren secuenciación tradicional como el DGGE. Esta técnica revela en la identificación taxonómica dos órdenes de magnitud mayor en riqueza en comparación con el DGGE, que por lo general pierde gran número de especies raras (Yu et al., 2015). Es decir que a la hora de comparar diferentes tratamientos o estados, el DGGE permite analizar muestras simultáneamente y ver gráficamente la banda, siendo así una herramienta semi cuantitativa muy rápida (Fraher et al., 2012).

En el presente estudio, se pudo observar tal diferencia entre métodos. En la secuenciación masiva, de un total de 181,750 lecturas de buena calidad obtenidas para 7 muestras se lograron identificar 137,536 (75.7 %). Por otro lado, en el DGGE solamente se pudo identificar 17 (18,3 %) bandas, de un total de 93 bandas reamplificadas. En relación a la identificación taxonómica, solamente se pudo llegar a especie con 10 bandas, el resto obedecieron a Bacteroidetes sin clasificar y Flavobacteriales sin clasificar. En las muestras secuenciadas en Illumina se logró clasificar un total de 46 especies. Según estos resultados, la secuenciación masiva resulta ser más

poderosa que el DGGE a la hora de describir la comunidad bacteriana del camarón blanco. A pesar de esto, se puede observar que el DGGE muestra gráficamente los cambios en los patrones de abundancia en un menor tiempo, pero resulta ser poco eficiente a la hora de identificar taxonómicamente las bandas de interés (OTU). En relación a las medidas de diversidad, con DGGE se sobreestimó la diversidad de las muestras, puesto que se presentan valores superiores a los arrojados con la secuenciación masiva, tanto en diversidad de Shannon como en dominancia de Simpson. Sin embargo, diversos estudios han demostrado buenos resultados con el DGGE en la descripción de la comunidad bacteriana de distintos organismos (Gerdt et al., 2013; Li et al., 2010; Liu et al., 2011, 2010; Niu et al., 2012), sedimentos (Nakatsu, 2007) y productos alimenticios (Ercolini et al., 2004; Nielsen et al., 2005). En camarones, la utilización de DGGE es muy común ya sea para describir la comunidad bacteriana asociada al tracto digestivo (Chaiyapechara et al., 2012; Liu et al., 2011; Niu et al., 2012) y a los sedimentos y agua de cultivo (Li et al., 2010). Con secuenciación Illumina se han analizado muestras de músculo (Seetharam et al., 2015), intestino (Zhang et al., 2014), agua de cultivo (Li et al., 2016) e intestinos de animales enfermos (Xiong et al., 2015). También se ha utilizado esta herramienta para encontrar relación entre ciertos genes y algunas enfermedades como el Taura (Sookruksawong et al., 2013).

Podría decirse que de acuerdo con el objetivo principal del presente estudio, las dos técnicas resultaron efectivas, ya que se pudo describir la estructura de la comunidad bacteriana asociada al microbioma del camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*). Tanto el DGGE como la secuenciación MiSeq con el sistema Illumina permitieron observar las diferencias entre los estadios larvales y algunas condiciones de cultivo tanto de larvales y juveniles de este camarón. Aun así, una de las dos puede resultar más eficiente que la otra de acuerdo al objetivo que se tenga. Si se quisiera identificar grupos funcionales o más exactamente qué grupo causa tales diferencias entre estadios, la secuenciación masiva es la técnica más apropiada. Si solo se pretende ver si difiere o no en su composición algún grupo de muestras, el DGGE podría ser una excelente opción rápida y de menor costo a diferencia que la secuenciación masiva.

8. CONCLUSIONES

La comunidad bacteriana en los estadios larvales del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) difiere entre las primeras etapas y las últimas, siendo una etapa crucial el paso del estadio de nauplio a protozoa. Los huevos fértiles y el estadio de nauplio son altamente similares, lo cual se explica en la transmisión bacteriana vertical vía huevos por parte de los padres.

La diversidad bacteriana en el estadio de postlarva tiende a disminuir a medida que incrementan los subestadios, es decir con el paso de los días, no obstante la reducción de la salinidad en el medio de cultivo incrementa la diversidad bacteriana.

En los camarones tratados con probióticos se observó incremento en la riqueza de las familias bacterianas con el paso de los días, a pesar de esto la diversidad se mantuvo similar en las dos muestras procedentes de la Granja La Marca. Por otro lado, estas muestras formaron un grupo aparte del de las muestras de la Unidad de Ciencia y Tecnología de la UNAM en Yucatán, lo que demuestra que la estructura de la comunidad bacteriana del camarón no necesariamente es igual en las diferentes poblaciones de este crustáceo y que quizá los probióticos agregados a los estanques muestreados favorecieron el dominio de ciertos grupos sobre otros causando diferenciación.

En cuanto a la efectividad de las técnicas utilizadas, las dos son confiables. El recomendar su uso depende del objetivo de la investigación. El DGGE es efectivo si solamente se quiere ver si existen diferencias entre las muestras a nivel de cambios en la diversidad a priori. Por otro lado, si se desea conocer la estructura como tal de la comunidad bacteriana, qué grupos inciden directamente y cuáles no en la diversidad, además de cuantificar de forma más precisa estas diferencias o similitudes lo más apropiado es utilizar secuenciación masiva.

9. PERSPECTIVAS

El presente trabajo resulta relevante ya que permite en cierta medida, describir el comportamiento de la comunidad microbiana del camarón blanco en relación a los cambios que este presenta durante el paso de huevo a larvas y posteriormente a juveniles. También, deja una primera aproximación de la composición del microbioma de las postlarvas mientras experimentan variaciones de salinidad en el medio de cultivo. Además, se ratifica el dominio de las familias Flavobacteriaceae y Rhodobacteraceae en el ciclo de vida de este crustáceo. Otra contribución de este proyecto, es el resultado de la comparación entre las dos técnicas moleculares usadas para describir la comunidad microbiana asociada al camarón blanco. Aunque el DGGE es una técnica menos potente que la secuenciación masiva, permite tener una aproximación de lo que sucede *a priori* en el organismo con la comunidad bacteriana con la que se encuentra asociado. Sin embargo, la secuenciación masiva, en estudios de la naturaleza del presente, resulta ser mucho más informativa y sus resultados permiten responder dudas que dejan sin contestar técnicas como el DGGE.

No obstante, sería interesante utilizar la secuenciación masiva para comparar todas las etapas propias del ciclo de vida de *L. vannamei*, ya que en el presente estudio no se incluyeron las gónadas de parentales, los huevos, el estadio de mysis y los adultos. Lo que si se hizo con la técnica de DGGE. También, podrían analizarse muestras de diferentes localidades, hacer comparaciones con animales de vida libre y de cultivo y con el agua del medio en el que viven los camarones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelrhman, K.F.A., Bacci, G., Mancusi, C., Mengoni, A., Serena, F., Ugolini, A., 2016. A first insight into the gut microbiota of the sea turtle *Caretta caretta*. *Front. Microbiol.* 7, 1060. doi:10.3389/fmicb.2016.01060
- Alavandi, S. V., Poornima, M., 2012. Viral metagenomics: A tool for virus discovery and diversity in aquaculture. *Indian J. Virol.* 23, 88-98. doi:10.1007/s13337-012-0075-2
- Andrews S, 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. [WWW Document]. URL <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Beardsley, C., Moss, S., Malfatti, F., Azam, F., 2011. Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 134-145. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01094.x
- Benlloch, S., López-lópez, A., Casamayor, O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F.L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedrós-alió, C., Rodríguez-valera, F., 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4, 349-360.
- BIOPLANET, 2016a. BioPlanet BA . Biogestor de Desechos orgánicos de uso acuícola [WWW Document]. URL <http://bioplanetmexico.com.mx/productos/ba>
- BIOPLANET, 2016b. BioPlanet BG. Próbico de alto desempeño en salud y nutrición [WWW Document]. URL <http://bioplanetmexico.com.mx/productos/bg>
- Bolhuis, H., Stal, L.J., 2011. Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *ISME J.* 5, 1701-1712. doi:10.1038/ismej.2011.52
- Bouvier, T.C., 2002. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 47, 453-470.
- Bravo-Nunez, E., 1991. Sobre la cuantificación de la biodiversidad ecológica. *Hidrobiológica* 1, 87-93.
- Brown, B.L., Watson, M., Minot, S.S., Rivera, M.C., Franklin, R.B., 2017. MinION™ nanopore sequencing of environmental metagenomes: a synthetic approach. *Gigascience* 6, 1-10. doi:10.1093/gigascience/gix007
- Brunvold, L., Sandaa, R.-A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H., Bergh, Ø., 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* 272, 319-327. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.08.053
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W. a, Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M.,

- Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. a, Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME J. 6, 1621-1624. doi:10.1038/ismej.2012.8
- Carrión, S.J.J., 1985. Introducción al análisis multidimensional No-Métrico. Rev. Esp. Invest. Sociol. 29, 187-216.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodríguez-valera, F., Pedrós-alió, C., 2002. Changes in archaeal , bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. Environ. Microbiol. 4, 338-348.
- Chaiyapechara, S., Rungrassamee, W., Suriyachay, I., Kuncharin, Y., Klanchui, A., Karoonuthaisiri, N., Jiravanichpaisal, P., 2012. Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. Microb. Ecol. 63, 938-953. doi:10.1007/s00248-011-9936-2
- Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Nat. Rev. Neurosci. 13, 701-712. doi:10.1038/nrn3346
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., Pettersson, S., 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 3047-3052. doi:10.1073/pnas.1010529108
- Dragulescu, A.A., 2014. xlsx: Read, write, format Excel 2007 and Excel 97/2000/XP/2003 files. R package version 0.5.7.
- Dubay, K., Tokuota, S., Gereffi, G., 2008. A value chain analysis of the Sinaloa, Mexico shrimp fishery, Duke University.
- Dunlop, A.L., Mulle, J.G., Ferranti, E.P., Edwards, S., Dunn, A.B., Corwin, E.J., 2015. Maternal microbiome and pregnancy outcomes that impact infant health. Adv. Neonatal Care 15, 377-385. doi:10.1097/ANC.0000000000000218
- Edwards, R.R.C., 1977. Field experiments on growth and mortality of *Penaeus vannamei* in a Mexican coastal lagoon complex. Estuar. Coast. Mar. Sci. 5, 107-121. doi:10.1016/0302-3524(77)90076-7
- Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S., 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. J. Appl. Microbiol. 96, 263-270. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02146.x
- Escalante, K., 2014. Extracción de ADN de lisis in situ y absorción de sílice, en: UNAM (Ed.), Manual de técnicas de biología molecular. Yucatán, México, p. 83.
- FAO, 2015. *Penaeus vannamei* [WWW Document]. URL http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es (accedido 3.15.16).

- FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture, food and agriculture organization of the United Nations. doi:92-5-105177-1
- Fernández, R., Le, S., 2005. DGGE : electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, en: UNAM (Ed.), Herramientas moleculares aplicadas en ecología. pp. 149-174.
- Field, J.G., Clarke, K.R., Warwick, R.M., 1982. A practical strategy for analysing multispecies distribution patterns. Mar. Ecol. - Progress Ser. 8, 37-52. doi:10.3354/meps008037
- Fraher, M.H., O'Toole, P.W., Quigley, E.M.M., 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 9, 312-322. doi:10.1038/nrgastro.2012.44
- García, A.T., Olmos, J.S., 2007. Quantification by fluorescent in situ hybridization of bacteria associated with *Litopenaeus vannamei* larvae in Mexican shrimp hatchery. Aquaculture 262, 211-218. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.10.039
- Gaxiola, G., Brito, A., Maldonado, C., Jimenez-Yan, L., Guzmán, E., Arena, L., Brito, R., Soto, L. a, Cuzon, G., 2006. Nutrición y domesticación de *Litopenaeus vannamei*. Av. en Nutr. Acuícola VIII. 139-162.
- Gerdts, G., Brandt, P., Kreisel, K., Boersma, M., Schoo, K.L., Wichels, A., 2013. The microbiome of North Sea copepods. Helgol. Mar. Res. 67, 757-773. doi:10.1007/s10152-013-0361-4
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D. a, Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science (80-.). 312, 1355-1359. doi:10.1126/science.1124234
- Govan, J.R.W., Hughes, J.E., Vandamme, P., 1996. *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. J. Med. Microbiol. 45, 395-407. doi:10.1099/00222615-45-6-395
- Habib, C., Houel, A., Lunazzi, A., Bernardet, J.F., Olsen, A.B., Nilsen, H., Toranzo, A.E., Castro, N., Nicolas, P., Duchaud, E., 2014. Multilocus sequence analysis of the marine bacterial genus *Tenacibaculum* suggests parallel evolution of fish pathogenicity and endemic colonization of aquaculture systems. Appl. Environ. Microbiol. 80, 5503-5514. doi:10.1128/AEM.01177-14
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S.M., Taylor, M.W., 2012. Genomic insights into the marine sponge microbiome. Nat. Rev. Microbiol. 10, 641-654. doi:10.1038/nrmicro2839
- Hosoya, S., Arunpairojana, V., Suwannachart, C., Kanjana-Opas, A., Yokota, A., 2007. *Aureispira maritima* sp. nov., isolated from marine barnacle debris. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1948-1951. doi:10.1099/ij.s.0.64928-0
- Huang, Z., Li, X., Wang, L., Shao, Z., 2014. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Res. 1-10. doi:10.1111/are.12628
- Ikenaga, M., Guevara, R., Dean, A.L., Pisani, C., Boyer, J.N., Bay, F., Actinobacteria, B., 2010.

- Changes in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal everglades marsh – mangrove – seagrass salinity gradient. *Microb. Ecol.* 59, 284-295. doi:10.1007/s00248-009-9572-2
- Illumina, 2016. An introduction to next-generation sequencing technology, Illumina, BaseSpace. doi:Pub No. 770-2012-008
- Johnson, C., Barnes, S., Ogle, J., Grimes, D.J., 2008. Microbial community analysis of water, foregut, and hindgut during growth of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in closed-system aquaculture. *J. World Aquac. Soc.* 39, 251-258. doi:10.1111/j.1749-7345.2008.00155.x
- JonMcIlroy, S., Nielsen, P.H., 2006. The family Saprospiraceae, en: *The Prokaryotes*. pp. 863-889. doi:10.1007/0-387-30741-9
- Juárez, L.M., 2007. Shrimp aquaculture in Mexico. *Glob. Aquac. Advocate* 65-67.
- Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tedengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191, 145-161. doi:10.1016/S0044-8486(00)00424-5
- Kenkel, N.C., Orloci, L., Aug, N., 1986. Applying metric and nonmetric multidimensional scaling to ecological studies : Some New Results. *Ecology* 67, 919-928. doi:10.2307/1939814
- Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S.A., Morrissey, J.P., O’Gara, F., Dobson, A.D.W., 2014. Evidence of a putative deep sea specific microbiome in marine sponges. *PLoS One* 9, 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0091092
- King, G.M., Judd, C., Kuske, C.R., Smith, C., 2012. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. *PLoS One* 7, 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0051475
- Li, L., Yan, B., Li, S., Xu, J., An, X., 2016. A comparison of bacterial community structure in seawater pond with shrimp, crab, and shellfish cultures and in non-cultured pond in Ganyu, Eastern China. *Ann. Microbiol.* 66, 317-328. doi:10.1007/s13213-015-1111-4
- Li, Q., Zhang, Y., Juck, D., Fortin, N., Greer, C.W., Tang, Q., 2010. Phylogenetic analysis of bacterial communities in the shrimp and sea cucumber aquaculture environment in northern China by culturing and PCR-DGGE. *Aquac. Int.* 18, 977-990. doi:10.1007/s10499-009-9316-9
- Liao, I.C., Chien, Y.-H., 2011. The Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Asia: The world’s most widely cultered alien crustacean, en: *In the Wrong Place Alien Marine Crustaceans Distribution Biology and Impacts*. pp. 489-519. doi:10.1007/978-94-007-0591-3
- Lindgreen, S., Adair, K.L., Gardner, P.P., 2016. An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Sci. Rep.* 6, 19233. doi:10.1038/srep19233

- Liu, H., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Jiang, S., Sun, S., Wang, L., 2010. PCR-DGGE analysis of intestinal bacteria and effect of *Bacillus* spp. on intestinal microbial diversity in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Chinese J. Oceanol. Limnol. 28, 808-814. doi:10.1007/s00343-010-9101-7
- Liu, H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., Li, Q., 2011. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses. Aquaculture 317, 32-36. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.008
- Luis-Villaseñor, I.E., Castellanos-Cervantes, T., Gomez-Gil, B., Carrillo-García, Á.E., Campa-Córdova, Á.I., Ascencio, F., 2013. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: Modulation of the bacterial community. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 257-265. doi:10.1007/s11274-012-1177-0
- Mahenthiralingam, E., Urban, T.A., Goldberg, J.B., 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nat. Rev. Microbiol. 3, 144-156. doi:10.1038/nrmicro1085
- Mardis, E.R., 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 9, 387-402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
- Martinez, L., 1999. Cultivo de camarones peneidos: principios y prácticas. México D.F., p. 283.
- Martínez, L.R., 2002. Camaronicultura: Avances y tendencias, en: AGT Editor. S.A. (Ed.), . México D.F., p. 167.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., Garcia-Gil, L.J., 2006. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. Inflamm. Bowel Dis. 12, 1136-1145. doi:10.1097/01.mib.0000235828.09305.0c
- Minot, S.S., Krumm, N., Greenfield, N.B., 2015. One Codex: a sensitive and accurate data platform for genomic microbial identification, bioRxiv. doi:10.1101/027607
- Moisander, P.H., Sexton, A.D., Daley, M.C., 2015. Stable associations masked by temporal variability in the marine copepod microbiome. PLoS One 10, 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0138967
- Morrow, K.M., Moss, A.G., Chadwick, N.E., Liles, M.R., 2012. Bacterial associates of two caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6438-6449. doi:10.1128/AEM.01162-12
- Moss, S.M., Pruder, G.D., 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 187, 175-191. doi:10.1016/0022-0981(94)00179-H
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J.C., Joint, I., 2008. Improved group-specific PCR primers

- for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* 2, 379-392. doi:10.1038/ismej.2007.97
- Nakatsu, C.H., 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 562. doi:10.2136/sssaj2006.0080
- Ng, T.F.F., Alavandi, S., Varsani, A., Burghart, S., Breitbart, M., 2013. Metagenomic identification of a nodavirus and a circular ssDNA virus in semi-purified viral nucleic acids from the hepatopancreas of healthy *Farfantepenaeus duorarum* shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 105, 237-242. doi:10.3354/dao02628
- Nielsen, D.S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., Jespersen, L., 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast* 22, 271-284. doi:10.1002/yea.1207
- Nimrat, S., Bart, A.N., Keatsaksit, A., Vuthiphandchai, V., 2008. Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. *Aquaculture* 274, 247-253. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.018
- Niu, Y., Defoirdt, T., Rekecki, A., De Schryver, P., Van den Broeck, W., Dong, S., Sorgeloos, P., Boon, N., Bossier, P., 2012. A method for the specific detection of resident bacteria in brine shrimp larvae. *J. Microbiol. Methods* 89, 33-37. doi:10.1016/j.mimet.2012.02.004
- Oetama, V.S.P., Hennersdorf, P., Abdul-Aziz, M.A., Mrotzek, G., Haryanti, H., Saluz, H.P., 2016. Microbiome analysis and detection of pathogenic bacteria of *Penaeus monodon* from Jakarta Bay and Bali. *Mar. Pollut. Bull.* 1-9. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.03.043
- Oh, Y.S., Lim, H.J., Cha, I.T., Im, W.T., Yoo, J.S., Kang, U.G., Rhee, S.K., Roh, D.H., 2009. *Roseovarius halotolerans* sp. nov., isolated from deep seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2718-2723. doi:10.1099/ijs.0.002576-0
- Oksanen, J., F. Guillaume, B., Roeland, K., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2016. *vegan: Community Ecology Package*.
- Pangastuti, A., Suwanto, A., Lestari, Y., Suhartono, M.T., 2010. Bacterial communities associated with white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at early developmental stages. *Biodiversitas* 11, 65-68. doi:10.13057/biodiv/d110203
- Papert, A., Kok, C.J., Van Elsas, J.D., 2004. Physiological and DNA fingerprinting of the bacterial community of *Meloidogyne fallax* egg masses. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1843-1849. doi:10.1016/j.soilbio.2004.04.038
- Pascual Gonzalez, D., 2010. Algoritmos de Agrupamiento basados en densidad y Validación de clusters. p. 183.
- Pla, L., 2006. Biodiversidad : Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*

31, 583-590.

R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Rada, A., Taboada, G., 1998. Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. *Biofarbo* 6, 63-67.

Riquelme, C.E., Chavez, P., Morales, Y., Hayashida, G., 1994. Evidence of parental bacterial transfer to larvae in *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Biol. Res.* 27, 129-134.

Rivera, M., 1998. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia en postlarvas y juveniles de camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), bajo condiciones de laboratorio. Universidad de Manzanillo.

Rivera Rodríguez, M.C., 1998. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia en postlarvas y juveniles de camaron blanco *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), bajo condiciones de laboratorio, en: Colima., U. de (Ed.), . pp. 1-53.

Rivera-Velázquez, G., Soto, L.A., Salgado-Ugarte, I.H., Naranjo, E.J., 2008. Growth, mortality and migratory pattern of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Crustacea, Penaeidae) in the Carretas-Pereyra coastal lagoon system, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 56, 523-533.

Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., Mena-Martínez, M.E., 2008. A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Mol. Biotechnol.* 40, 13-17. doi:10.1007/s12033-008-9061-8

Rudi, K., Skulberg, O.M., Larsen, F., 1997. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable Strain Characterization and Classification of Oxyphotobacteria in Clone Cultures on the Basis of 16S rRNA Sequences from. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2593-2599.

Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N., 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS One* 9, 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0091853

Ryan, M., Pembroke, J., Adley, C., 2006. *Ralstonia pickettii*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. *J. Hosp. Infect.* 62, 278-284. doi:10.1016/j.jhin.2005.08.015

Ryan, M.P., Pembroke, J.T., Adley, C.C., 2007. *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: Potential and applications. *J. Appl. Microbiol.* 103, 754-764. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03361.x

Sáenz De Rodrigáñez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Arijo, S., León-Rubio, J.M., Alarcón, F.J., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Cara, J.B., Moyano, F.J., 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole

- (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquac. Nutr.* 15, 177-185. doi:10.1111/j.1365-2095.2008.00581.x
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
- Seetharam, A.S., Kawaler, E., Du, Z.-Q., Rothschild, M.F., Severin, A.J., 2015. Microbiome analyses of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) collected from disparate geographical locations. *Genomics Data* 6, 67-69. doi:10.1016/j.gdata.2015.08.009
- Shang, Y.C., Leung, P., Ling, B., 1998. Comparative economics of shrimp farming in Asia. *Aquaculture* 164, 183-200.
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1135-1145. doi:10.1038/nbt1486
- Simões, N., Jones, D., Soto-rodríguez, S., Roque, A., 2002. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos : efectos de la calidad del agua , tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. *Memorias del VI Simp. Int. Nutr. Acuícola* 243-276.
- Sookruksawong, S., Sun, F., Liu, Z., Tassanakajon, A., 2013. RNA-Seq analysis reveals genes associated with resistance to Taura syndrome virus (TSV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 523-533. doi:10.1016/j.dci.2013.07.020
- Srithep, P., Khinthong, B., Chodanon, T., Powtongsook, S., Pungrasmi, W., Limpiyakorn, T., 2014. Communities of ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea and nitrite-oxidizing bacteria in shrimp ponds. *Ann. Microbiol.* 65, 267-278. doi:10.1007/s13213-014-0858-3
- Takeuchi, M., Hamana, K., Hiraishi, A., 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1405-17. doi:10.1099/00207713-51-4-1405
- Tallinn University of Technology, 2012. Comparison of three different methods used for assessing the microbial diversity in soil. pp. 1-27.
- Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Smart, J., Gopal, P.K., 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2578-2588. doi:10.1128/AEM.66.6.2578-2588.2000
- Taras, D., Vahjen, W., Simon, O., 2007. Probiotics in pigs - modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. *Livest. Sci.* 108, 229-231. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.075
- Theunissen, J., Britz, T.J., Torriani, S., Witthuhn, R.C., 2005. Identification of probiotic

- microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 11-21. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.004
- Thomas, F., Hehemann, J.H., Rebuffet, E., Czjzek, M., Michel, G., 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Front. Microbiol.* 2, 1-16. doi:10.3389/fmicb.2011.00093
- Torkildsen, L., Lambert, C., Nylund, A., Thorolf, M., Øivind, B., 2005. Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: Impact on larval survival. *Aquac. Int.* 13, 575-592. doi:10.1007/s10499-005-9002-5
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., Palmer, J.D., 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327-338. doi:10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x
- Tzuc, J.T., Escalante, D.R., Rojas Herrera, R., Gaxiola Cortés, G., Ortiz, M.L.A., 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Springerplus* 3, 280. doi:10.1186/2193-1801-3-280
- Valles-Jimenez, R., Cruz, P., Perez-Enriquez, R., 2004. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. *Mar. Biotechnol.* 6, 475-484. doi:10.1007/s10126-004-3138-6
- Vandecandelaere, I., Nercessian, O., Segart, E., Achouak, W., Mollica, A., Faimali, M., Vandamme, P., 2009. *Nautella italica* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 811-817. doi:10.1099/ij.s.0.002683-0
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J., 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2592-2597.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261-5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
- Xiong, J., Wang, K., Wu, J., Qiuqian, L., Yang, K., Qian, Y., Zhang, D., 2015. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6911-6919. doi:10.1007/s00253-015-6632-z
- Yang, B., Wang, Y., Qian, P.-Y., 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17, 135. doi:10.1186/s12859-016-0992-y
- Yoneyama, A., Yano, H., Hitomi, S., Okuzumi, K., Suzuki, R., Kimura, S., 2000. *Ralstonia pickettii* colonization of patients in an obstetric ward caused by a contaminated irrigation system [3]. *J. Hosp. Infect.* 46, 79-80. doi:10.1053/jhin.2000.0791

- Yu, L., Zhang, W., Liu, L., Yang, J., 2015. Determining microeukaryotic plankton community around Xiamen Island, Southeast China, using Illumina MiSeq and PCR-DGGE techniques. PLoS One 10, 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0127721
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Du, Z., Li, E., 2014. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. Aquaculture 434, 449-455. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.09.008
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7, 203-214. doi:10.1089/10665270050081478

11. ANEXOS

Anexo1 .Método de extracción de ADN de lisis in situ y absorción de sílice modificado (Escalante, 2014; Rojas-Herrera et al., 2008)

1. En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar 0,5 gramos de la muestra.
2. Añadir 1 ml de buffer TEN y macerar la muestra con un pistilo.
3. Agregar 20 µl de proteinasa K (20 mg/l) e incubar por una hora a 55 °C. (Este paso no hace parte del protocolo original, fue modificado).
4. Posteriormente, añadir 20 µl de solución de lisozima (10 mg/l en buffer TE) e incubar a 37 °C por una hora, a los 30 min se le agrega 10 µl de RNAasa (2mg/l) (modificado).
5. Colocar los viales en un baño de hielo-álcohol por 10 min y luego pasarlos a un baño a 65 °C por 5 min, este proceso se repite tres veces.
6. Añadir 100 µl de SDS al 20% y agitar la muestra en vortex por un minuto. Incubar la muestra por 30 min a 30 °C.
7. Centrifugar 10 min a 10000 xg a temperatura ambiente.
8. Luego de obtener las dos fases se toma el sobrenadante y se pasa a un vial nuevo, se agregan 500 µl de acetato de potasio 5M y se incuba a 65 °C por 5 min para luego pasar a un baño de hielo-álcohol por 20 min.
9. Centrifugar 30 min a 12000 xg a 4 °C y pasar el sobrenadante obtenido a un nuevo vial.
10. Añadir 200 µl de la suspensión de SiO₂ al 4 %. Agitar por inversión durante 3 min, centrifugar 2 min a 11000 xg a temperatura ambiente.
11. Lavar la pastilla 2 veces con 1 ml de etanol al 70 %, centrifugar cada vez por 2 min a 11000 xg a temperatura ambiente. Dejar evaporar el alcohol en el concentrador por 5 minutos o hasta que se evapore totalmente.
12. Resuspender la pastilla obtenida en 60 µl de agua destilada estéril y luego incubar 5 min a 55 °C, agitando ocasionalmente.
13. Centrifugar 5 min a 10000 xg a temperatura ambiente. Posteriormente, pasar el sobrenadante a un nuevo tubo y guardar los tubos en congelación a -20 °C u 80 °C.

Reactivos.

- *Buffer TE pH 8*

Tris-HCl 0.01M pH 8.0 (Sigma, T1378) y EDTA 0.001 M pH 8.0 (Sigma, E5134)

- *Buffer TEN pH 8*

Tris-HCl 0.1M (Sigma, T1378) y EDTA 0.05 M (Sigma, E5134) y NaCl 0.5M (Sigma, S3014).

- *Acetato de potasio 5M*

Pesar 24.54 g de acetato de potasio y aforar a 50 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min a 15 lb de presión.

- *Dodecil sulfato de sodio (SDS /Promega) al 20 % (p/v)*

Pesar 20 g de SDS y aforar a 100 ml con agua destilada.

- *Etanol al 70 %*

Medir 70 ml de etanol y aforar a 100 ml con agua destilada.

- *Lisozima 10 mg/ml*

Pesar 1 g de lisozima y disolverlo en 1 ml de buffer TE.

Anexo2. Reactivos para PCR.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (μl) para cada reacción</i>
<i>Buffer 1 mM (GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase. Promega)</i>	5
<i>Mix dNTP 1 mM (Thermo Fisher Scientific [®])</i>	0.5
<i>MgCl₂ 2 mM (Promega [®])</i>	2.0
<i>Primer 357F 5μM (Sigma [®])</i>	1
<i>Primer 907R 5μM (Sigma [®])</i>	1
<i>Taq polimerasa 1U (Thermo Fisher Scientific [®])</i>	0.2
<i>Agua inyectable (PISA [®])</i>	14.3
<i>ADN [75 ng/μl]</i>	1
<i>Volumen total</i>	25

Anexo 3. Condiciones usadas para hacer las PCR.

<i>Etapas</i>	<i>Características</i>
<i>I</i>	1 ciclo. 96 °C durante 2 min
<i>II</i>	5 ciclos. a) 94 °C durante 30 s b) 56 °C durante 1 min c) 72 °C durante 1 min
<i>III</i>	25 ciclos, con tres pasos cada uno. a) 94 °C durante 30 s b) 54 °C durante 1 min c) 72 °C durante 1 min
<i>IV</i>	1 ciclo 72 °C durante 10 min
<i>V</i>	∞ ciclo 4 °C durante 10 min

Anexo 4. Procedimiento Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE)

1. Armar el equipo de DGGE. Verificar el gradiente de corrida, en este caso se usó una solución desnaturalizante al 60 % (alta) y otra al 30 % (baja) (Brunvold et al., 2007; Liu et al., 2011).
2. Tomar 20 ml cada de solución desnaturalizante (alta y baja) y colocar por separado en un vaso de precipitado de 50 ml. Agregar 15 μ l de TEMED (N,N,N,N-tetrametiletildiamina) y 150 μ l de persulfato de amonio al 10%, mezclar bien.
3. Tomar 16 ml de cada solución en cada una de las jeringas, una para la solución de concentración alta y otra para la baja.
4. Colocar las jeringas en el equipo, ajustar e inyectar los componentes de forma constante.
5. Colocar el peine y dejar gelificar durante 1h.
6. Preparar las muestras que se van a correr. Tomar 100 μ l del producto de PCR y agregar el mismo volumen de buffer de corrida. Refrigerar para su uso posterior.
7. Verificar la gelificación y lavar los pozos con agua destilada.
8. Llenar la cámara del equipo con 7 litros de buffer TAE 1X, colocar el gel en el soporte y pasarlo a la cámara cuando esta alcance los 60 °C.
9. Inyectar cada pozo con 30 μ l de la muestra y correr a 100 V hasta que toda la muestra salga de los pozos. Detener la electroforesis y volver a inyectar la misma cantidad hasta terminar la muestra.
10. Finalmente correr a 90 V durante 18 horas.
11. Desarmar el equipo y retirar el gel con mucho cuidado.
12. Teñir el gel por 30 minutos con una solución compuesta por 120 ml de buffer TAE 1X y 6 μ l de SYBR Green (Thermo Fisher Scientific).

Anexo 5. Concentración de ADN para muestras usadas en DGGE.

<i>Estadio</i>	<i>Muestra</i>	<i>Concentración inicial (ng/μl)</i>
<i>Gónadas hembras</i>	GH1	287.5
	GH2	950
	GH3	875
<i>Gónadas machos</i>	GM1	400
	GM2	375
	GM3	562.5
<i>Huevos fértiles</i>	HF1	212.5
	HF2	212.5
	HF3	150
<i>Nauplio 2</i>	NII-1	275
	NII-2	350
	NII-3	225
<i>Protozoa</i>	P1	375
	P2	75
	P3	200
<i>Mysis</i>	M1	137.5
	M2	187.5
	M3	187.5
<i>Postlarva</i>	PL1	137.5
	PL2	175
	PL3	550
<i>Postlarva 1 (36 salinidad)</i>	PL1	137.5
<i>Postlarva 12 (36 salinidad)</i>	PL12	300
<i>Postlarva 13 (36 salinidad)</i>	PL13	325
<i>Postlarva 14 (36 salinidad)</i>	PL14	162.5
<i>Postlarva 15 (36 salinidad)</i>	PL15	175

<i>Postlarva 16 (36 salinidad)</i>	PL16	100
<i>Postlarva 13 (24 salinidad)</i>	PL13-24	56.47
<i>Postlarva 15 (16 salinidad)</i>	PL15-16	150.6
<i>Postlarva 16 (12 salinidad)</i>	PL16-12	100
<i>Postlarva 17 (4 salinidad)</i>	PL17-4	112.5
<i>Postlarva 29</i>	PL29-1	399.2
	PL29-2	309.6
<i>Juveniles 23 días después de la siembra</i>	J23-1	344.7
	J23-2	215.9
<i>Juveniles 105 días después de la siembra</i>	J105-1	205.1
	J105-2	150.2
<i>Probiótico sedimento</i>	PrSe-1	157.6
	PrSe-2	169.8
<i>Probiótico agua y alimento</i>	PrA-Al-1	186.9
	PrA-Al-2	224.3
<i>Probiótico alimento</i>	Pr-Al-1	61.9
	Pr-Al-2	75.4

Anexo 6. Concentración de ADN de muestras usadas para secuenciación MiSeq de *Illumina*.

<i>Estadio</i>	<i>Muestra</i>	<i>Concentración (ng/μl)</i>
<i>Nauplio</i>	N	49
<i>Nauplio 2</i>	N2	30.4
<i>Nauplio 3</i>	N3	22.6
<i>Protozoa</i>	PZ	64.4
<i>Postlarva 3 a 6</i>	PL3-6	26.4
<i>Juveniles 23 días</i>	J23	21.8
<i>Juveniles 105 días</i>	J105	24