



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL  
PROBIÓTICO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL CAMARÓN BLANCO**

***Litopenaeus vannamei***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**CITLALI MELISSA CHINO DE LA CRUZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Agustín López-Munguía Canales  
**VOCAL:** Dr. Rodolfo Pastelín Palacios  
**SECRETARIO:** Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
**1er. SUPLENTE:** Q.F.B. Genero Jiménez Reyes  
**2° SUPLENTE:** M.C. María Elena Rodríguez Alegría

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO E, LABORATORIO 312,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

---

**Dr. Agustín López-Munguía Canales**

**ASESOR DEL TEMA**

---

**M.C. María Elena Rodríguez Alegría**

**SUPERVISOR TÉCNICO**

---

**Citlali Melissa Chino de la Cruz**

**SUSTENTANTE**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales y la asesoría técnica de la M. C. María Elena Rodríguez Alegría.

Este proyecto se desarrolla en el marco de una colaboración con el Dr. Adrián Ochoa Leyva y su equipo de trabajo, quien estudia el efecto de la dieta en la microbiota de poblaciones sanas y enfermas de camarón. Agradecemos su colaboración para el desarrollo de este proyecto.

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios profesionales, brindarme entrenamiento y experiencia deportiva, otorgarme una beca para la inmersión al idioma inglés. Además de representar el espacio para generar conocimiento más allá, que produjo en mí una luz de lo que el conocimiento fructífero puede transformar y aportar.

Mi más profundo agradecimiento a mi mentor, al Dr. Agustín López-Munguía Canales por su asesoría durante el desarrollo del proyecto. Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Por escucharme y orientar mis inquietudes e intereses académicos y profesionales. Le agradezco su disposición y cuantioso auxilio.

Mi más afectuoso agradecimiento a la M. C. María Elena Rodríguez Alegría por su incondicional apoyo y orientación en todo momento para lograr un exitoso desarrollo del proyecto. Por sembrar en mí el interés en el maravilloso mundo de la biotecnología, por fomentar mi crecimiento profesional y académico.

A mis sinodales y revisores de tesis el Dr. Rodolfo Pastelín Palacios y Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por su interés y entera disposición para la lectura y corrección de este trabajo. Por contribuir a la mejora de la presente tesis.

A la Dra. Katy Juárez López por su atento y afable apoyo en el aprendizaje de las técnicas de cultivo anaerobio, por el uso de su equipo de desgasamiento, y a sus alumnos M. C. Emmanuel Alvizo y M. C. Xadeni Burgos por el tiempo dedicado.

Al laboratorio 2 por su amable permiso para el uso de equipos de autoclave y del fotodocumentador. Al Dr. Adelfo Escalante Lozada y a su ex-alumna M. C. Alma Alva por el préstamo de primers y por compartir su conocimiento en PCR.

Al M. C. Rafael López, alumno del Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella por su auxilio en bioinformática.

A la Dra. Maricarmen Quirasco por su amable disposición en la realización de las técnicas de zimografía en el laboratorio 312 de la Facultad de Química. Por la donación de reactivos, por sus comentarios, sugerencias y orientación. Al Q. A. Alfredo Esquivel por su atento auxilio y por el tiempo dedicado al aprendizaje de las técnicas de zimografía.

Al Dr. Armando Navarro Ocaña investigador del Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina (UNAM) por la generosa donación de las cepas de *Vibrio* utilizadas en los experimentos.

Al Dr. Adrián Ochoa Leyva y su equipo de trabajo, con quienes colaboramos para el desarrollo de este proyecto. Le agradecemos proporcionarnos las muestras de intestino y su apoyo técnico de carácter bioinformático, así como a sus alumnos M. C. Fernanda Cornejo, Ing. Juan Pablo Ochoa y M. C. Luigui Gallardo.

A todos los miembros del laboratorio 3 del IBT, en especial a Silvia por su valiosa amistad, por sus consejos, ánimos y por la amenidad de mis días. A Betito y Raúl por su amistad, a doña Aurelia por su compañía y a Cris por su bondadoso auxilio y disposición.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>I.RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II.MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>2</b>
II.1. DEFINICIÓN DE ACUICULTURA.....	2
II.2. ESTADO MUNDIAL DE LA ACUICULTURA .....	2
II.2.1. Comercio mundial de pescado .....	4
II.2.2. Especies cultivadas .....	6
II.2.2.1. Camarón .....	6
II.3. LA ACUICULTURA EN MÉXICO .....	7
II.3.1. La camaronicultura en México .....	8
II.4. CICLO DE VIDA DEL CAMARÓN .....	12
II.4.1. Fase marina .....	12
II.4.2. Fase estuarina.....	12
II.5. CULTIVO DEL CAMARÓN .....	13
II.5.1. Ciclo de producción del camarón.....	13
II.5.2. Sistemas de cultivo.....	15
II.6. MICROBIOTA DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> .....	16
II.6.1. Factores que modelan la microbiota de <i>L. vannamei</i> .....	18
II.6.1.1. Dieta .....	18
II.6.1.2. Factores ambientales.....	20
II.6.1.3. Estadio de crecimiento .....	22
II.6.1.4. Estado de salud .....	23
II.7. PROBLEMÁTICA EN LA ACUICULTURA CON ÉNFASIS EN LAS ENFERMEDADES .....	24
II.7.1. Virus.....	24
II.7.2. Bacterias .....	26
II.7.2.1. Vibriosis .....	26
II.7.2.2. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) .....	28
II.7.3. Hongos.....	29
II.7.4. Parásitos .....	29
II.8. CONTROL DE ENFERMEDADES.....	30

II.9. PROBLEMÁTICA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA .....	34
II.9.1. <i>Alternativas de control y tratamiento</i> .....	35
II.9.2. <i>La Microbiota Intestinal como primera barrera de defensa</i> .....	36
II.10. PROBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA .....	37
II.10.1. <i>Definición de probiótico</i> .....	37
II.10.2. <i>Probiótico en la acuicultura</i> .....	38
II.10.3. <i>Selección de probióticos</i> .....	39
II.10.4. <i>Características de un buen probiótico</i> .....	40
II.10.5. <i>Seguridad de probióticos</i> .....	40
II.10.6. <i>Mecanismos de acción de probióticos</i> .....	42
II.11. PREBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA .....	45
<b>III.JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>IV.HIPÓTESIS</b> .....	<b>50</b>
<b>V.OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
V.1. OBJETIVO GENERAL .....	50
V.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	50
<b>VI.METODOLOGÍA</b> .....	<b>51</b>
VI.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS: AGAVINA COMO FUENTE DE FIBRA. ....	51
VI.2. PREPARACIÓN DE STOCKS BACTERIANOS A PARTIR DE INTESTINOS DE CAMARÓN <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> .....	51
VI.3. ANÁLISIS METAGENÓMICO DEL GEN RIBOSOMAL 16S DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS ENRIQUECIDOS (STOCKS).....	52
VI.3.1. <i>Extracción de DNA de las muestras y cuantificación</i> .....	52
VI.3.2. <i>Análisis Bioinformático de las muestras</i> .....	53
VI.4. CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN BACTERIANA EN MEDIO MRS MODIFICADO CON AGAVINAS .....	54
VI.5. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	54
VI.5.1. <i>De un stock con glucosa como fuente de carbono del Intestino 1</i> .....	55
VI.5.2. <i>De un stock con agavinas como fuente de carbono del Intestino 1</i> .....	55
VI.5.3. <i>De un stock con agavinas como fuente de carbono del Intestino 2</i> .....	55
VI.6. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS .....	56
VI.7. CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LA CEPAS PATÓGENAS .....	56

VI.8. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	57
VI.8.1. Extracción de DNA cromosomal.....	57
VI.8.2. Amplificación del gen ribosomal 16S.....	57
VI.8.3. Purificación de los productos de PCR.....	59
VI.8.4. Análisis de las secuencias .....	59
VI.9. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y MEDICIÓN DE PH.....	59
VI.10. CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES DE PH Y SALINIDAD .....	60
VI.11. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CONSUMO DE AGAVINAS .....	60
VI.12. CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	62
VI.12.1. Pruebas indirectas de gota sobre la superficie de agar o SOAT (Del inglés spot on agar test).....	62
VI.12.2. Obtención de los sobrenadantes.....	63
VI.12.3. Concentración de los sobrenadantes .....	64
VI.12.3.1. Liofilización .....	64
VI.12.3.2. Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 80%.....	64
VI.12.4. Cuantificación de proteína.....	64
VI.13. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y ZIMOGRFÍA .....	65
<b>VII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
VII.1. ENRIQUECIMIENTO BACTERIANO Y SUS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO .....	67
VII.2. ENRIQUECIMIENTO BACTERIANO Y USO DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN RIBOSOMAL 16S PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	68
VII.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS .....	74
VII.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	77
VII.4.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	82
VII.4.2. <i>Enterococcus faecium</i> .....	83
VII.4.2.1. <i>Enterococcus faecium</i> en la acuicultura.....	84
VII.5. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO .....	86
VII.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES DE PH Y SALINIDAD .....	89
VII.7. PERFIL DE DEGRADACIÓN DE AGAVINAS.....	91
VII.7.1. Perfil de degradación de agavinas por <i>E. faecium</i> .....	91
VII.7.2. Perfil de degradación de agavinas por <i>K. pneumoniae</i> .....	97
VII.8. EVALUACION DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.....	98



VII.8.1. Pruebas indirectas de gota sobre la superficie de agar .....	98
VII.9. DETERMINACIÓN DE OTROS FACTORES ANTIMICROBIANOS: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	
EXTRACELULARES .....	103
VII.9.1. Cuantificación de proteínas.....	103
VII.9.2. SDS-PAGE .....	103
VII.9.3. Zimografía.....	105
VII.10. ENTEROCOCCUS.....	112
<b>VIII.CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>IX.PERSPECTIVAS .....</b>	<b>114</b>
<b>X.REFERENCIAS .....</b>	<b>115</b>
<b>XI.ANEXO A .....</b>	<b>130</b>
1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MRS (BD DIFCO) Y MRS	
MODIFICADO .....	130
2. REACTIVOS PARA LA ELABORACIÓN DE GELES SDS-PAGE GLICINA.....	131
3. TINCIÓN DE AZUL DE COOMASIE .....	132
4. TINCIÓN DE PLATA DEL GEL SDS-PAGE .....	133
<b>XII.ANEXO B .....</b>	<b>135</b>
1. ASIGNACIÓN TAXONÓMICA A NIVEL ESPECIE DE LAS MUESTRAS DEL INTESTINO 1 POR MEDIO DE	
LA SECUENCIACIÓN DEL 16S.....	135
<i>Tabla XII.1. Asignación con la base de datos Green Genes.....</i>	<i>135</i>
<i>Tabla XII.2. Asignación con la base de datos Metaxa2 .....</i>	<i>136</i>
2. ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE <i>E. FAECIUM</i> COMO PROBIÓTICO PARA LA ACUICULTURA.....	137

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción y utilización de la pesca de captura y la acuicultura en el mundo...	4
Tabla 2. Principales exportadores e importadores de pescado y productos pesqueros..	5
Tabla 3. Proporción de los principales grupos de especies en el comercio mundial de pescado y productos pesqueros 2016 (% , peso vivo).....	6
Tabla 4. Comparativo de la producción de camarón .....	9
Tabla 5. Serie histórica de la producción de camarón por entidad de los años 2008 al 2017 .....	11
Tabla 6. Tabla comparativa de la microbiota intestinal de <i>L. vannamei</i> modelada por distintos factores ambientales.....	21
Tabla 7. Principales virus causantes de enfermedad en camarones.....	25
Tabla 8. Alternativas de biocontrol y tratamiento en camaronicultura .....	36
Tabla 9. Evolución de la definición de probiótico.....	37
Tabla 10. Efectos benéficos brindados al hospedador por probióticos en acuicultura. .	38
Tabla 11. Cultivos microbianos que se consideran probióticos de acuerdo a la definición de Verschuere <i>et al.</i> (2000).....	38
Tabla 12. Clasificación de los tratamientos con probióticos en la acuicultura .....	39
Tabla 13. Mecanismos de acción de los probióticos por el cual ejercen su efecto benéfico. ....	43
Tabla 14. Referencias de estudios sobre el efecto de fructanas en <i>L. vannamei</i> .....	47
Tabla 15. Secuencia nucleotídica de los primers utilizados para la amplificación del gen ribosomal 16S.....	57
Tabla 16. Concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante.....	58
Tabla 17. Concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR con la enzima Pfu DNA polimerasa. ....	58
Tabla 18. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen ribosomal 16S con la enzima la Taq DNA polimerasa. ....	58

Tabla 19. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen ribosomal 16S con la enzima Pfu DNA polimerasa.....	59
Tabla 20. Estándares de carbohidratos para cromatografía por placa fina. ....	61
Tabla 21. Reactivos y cantidades utilizados para la preparación de los geles SDS-PAGE y zimogramas.....	65
Tabla 22. Caracterización macroscópica de bacterias aisladas de la microbiota de intestino de camarón.....	75
Tabla 23. Caracterización microscópica de bacterias aisladas de la microbiota de intestino de camarón.....	76
Tabla 24. Concentración de DNA y $A_{260/280}$ , $A_{260/230}$ del DNA extraído de las cepas aisladas.....	77
Tabla 25. Concentración de ADN y $A_{260/280}$ , $A_{260/230}$ de los productos de PCR.....	79
Tabla 26. Identidad de las secuencias de las cepas obtenida mediante BLASTn.....	80
Tabla 27. Abundancia relativa de las cepas identificadas en los intestinos y hepatopáncreas de los bioensayos en <i>L. vannamei</i> alimentados con fibra .....	81
Tabla 28. Capacidad de crecimiento de <i>E. faecium</i> en diferentes condiciones de pH ..	89
Tabla 29. Capacidad de crecimiento de <i>E. faecium</i> de crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl. ....	89
Tabla 30 . Crecimiento de las cepas de <i>E. faecium</i> cepa I3G y I3A en medio MRS agavinas.....	91
Tabla 31. Composición (%) de la agavina .....	92
Tabla 32. Tinción de Gram de las cepas para el espectro de inhibición.....	98
Tabla 33. Halos de inhibición producidos por las cepas aisladas contra <i>Vibrio</i> .....	99
Tabla 34. Concentración de proteínas de los sobrenadantes crudos y de sus diferentes tratamientos de concentración .....	103
Tabla 35. Pesos moleculares aproximados de las proteínas extracelulares presentes en los sobrenadantes del cultivo de <i>E. faecium</i> .....	105
Tabla 36. Pesos moleculares aproximados de las bandas con actividad lítica vs <i>Vibrio</i> .....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura en el periodo 1950-2017 .....	3
Figura 2. Evolución de la producción acuícola de crustáceos marinos del periodo 2001-2016 por productores principales .....	7
Figura 3. Serie histórica de la producción de camarón en México de los años 2008 al 2017 por contribución en captura y acuicultura.....	9
Figura 4. Origen-destino comercial del camarón mexicano.....	10
Figura 5. Participación porcentual de la producción camaronera en México .....	11
Figura 6. Ciclo de vida del camarón .....	13
Figura 7. Ciclo de producción del camarón .....	14
Figura 8. Diagrama de Venn de la composición microbiana a nivel filo de la microbiota intestinal-sedimentos-agua por tres distintos autores .....	20
Figura 9. Manejo holístico de las enfermedades en el cultivo de camarón. ....	31
Figura 10. Vectores de AMR relacionados con el uso de antibióticos en la acuicultura. ....	35
Figura 11. Clasificación tentativa de tratamientos microbianos usados en acuicultura . ....	39
Figura 12. Esquema propuesto para la evaluación de la resistencia antimicrobiana de cepas bacterianas utilizadas como aditivos alimentarios. ....	42
Figura 13. Estructura de la inulina y levana.....	45
Figura 14. Estructura propuesta para las agavinas .....	46
Figura 15. Comparación de cinéticas de crecimiento de dos poblaciones microbianas (Intestino 1 e Intestino 2) con diferentes fuentes de carbono.....	67
Figura 16. Asignación taxonómica de géneros de microorganismos presentes en el medio enriquecido a las 0 h de cultivo en el Intestino 1 con la base de datos GG . ....	69
Figura 17. Asignación taxonómica de géneros de microorganismos presentes en el medio enriquecido a las 6 h de cultivo con la base de datos GG.....	70
Figura 18. Asignación taxonómica de los microorganismos presentes en el medio enriquecido a las 6 h de cultivo con la base de datos Metaxa2 .....	72
Figura 19. Aislamiento de colonias a partir de stocks de cultivo bacteriano enriquecido .....	75

Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio (0.05%) del DNA cromosomal de las cepas en estudio .....	78
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio (0.05%) de los amplicones del gen ribosomal 16S .....	79
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> cepa I3G en aerobiosis .	87
Figura 23. Cinética de crecimiento de <i>E. faecium</i> cepa I3G en anaerobiosis.....	87
Figura 24. Cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> cepa I3A en aerobiosis..	88
Figura 25. Cinética de crecimiento de <i>E. faecium</i> cepa I3A en anaerobiosis .....	88
Figura 26. Placa de la cromatografía en placa fina de los sobrenadantes de <i>E. faecium</i> después de 24 h de incubación .....	92
Figura 27. Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de degradación de agavinas de las cepas aisladas de <i>E. faecium</i> .....	94
Figura 28. Perfil de degradación de agavinas de las cepas aisladas de <i>K. pneumoniae</i> .....	97
Figura 29. Efecto antimicrobiano célula-célula de las cepas aisladas de <i>E. faecium</i> contra <i>V. parahemolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. alginolyticus</i> .....	99
Figura 30. Efecto antimicrobiano célula-célula de las cepas aisladas de <i>E. faecium</i> contra <i>V. parahemolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. alginolyticus</i> a diferentes tiempos de crecimiento de <i>E. faecium</i> en medio MRS-agavinas.....	101
Figura 31. Perfil electroforético de los sobrenadantes crudos y tratados de las cepas <i>E. faecium</i> I3G e I3A con Tinción de Coomasie .....	104
Figura 32. Perfil electroforético de los sobrenadantes crudos y tratados de las cepas <i>E. faecium</i> I3G e I3A con Tinción de plata. ....	104
Figura 33. Zimograma de actividad lítica contra <i>Micrococcus lysodeikticus</i> .....	107
Figura 34. Zimograma que muestra actividad lítica de los sobrenadantes crudos y concentrados de <i>E. faecium</i> contra células de <i>V. parahemolyticus</i> . ....	108
Figura 35. Zimograma que muestra actividad lítica de los sobrenadantes de <i>E. faecium</i> contra células de <i>V. harveyi</i> .....	108
Figura 36. Zimograma que muestra actividad lítica de los sobrenadantes crudos y concentrados de <i>E. faecium</i> contra células de <i>V. alginolyticus</i> .....	109

## I. RESUMEN

La acuicultura de camarón enfrenta algunos retos importantes para consolidarse como una actividad económicamente viable y ecológicamente sustentable. Entre los más importantes destaca el combatir enfermedades de distinta etiología que amenazan la salud de las poblaciones y su producción. La presencia de microorganismos patógenos en el agua de los estanques de cultivo de camarón, impiden tanto el óptimo crecimiento, como el desarrollo de una población sana. Las bacterias probióticas son microorganismos vivos con capacidad de desempeñar funciones favorables en la salud y bienestar del hospedero. En diversos estudios se ha constatado que los probióticos ayudan a diversas especies de camarones a superar condiciones de estrés constante, además de estimular componentes del sistema inmune. Así, se ha demostrado que la administración de probióticos en la crianza intensiva de camarón es uno de los métodos más prometedores para combatir enfermedades causadas por especies del género *Vibrio*.

La composición de la dieta modula la microbiota, por lo que cambios en la composición de la dieta junto con probióticos podría ser clave no solo para tratar a poblaciones enfermas de camarón sino prevenirlas. De esta forma, las bacterias aisladas de la microbiota intestinal de camarón, en especial de las bacterias ácido lácticas (BAL) y *Bifidobacterium* enriquecidos en intestinos de camarones sanos alimentados con fibra, representan un potencial campo de estudio para su caracterización con miras en el desarrollo de probióticos. En esta tesis se presenta el aislamiento y caracterización de bacterias con capacidad probiótica a partir de intestinos de *Litopenaeus vannamei* alimentados con una dieta rica en fibra. Se aislaron e identificaron por técnicas moleculares dos cepas de *Enterococcus faecium* con capacidad antibacteriana sobre *Vibrio* patógenos en la camaronicultura. La capacidad antibacteriana se atribuye a compuestos de naturaleza proteínica de alto peso molecular, que podrían tratarse de peptidoglicano hidrolasas (PGHs). Análisis posteriores del genoma de la cepa de interés lograrán confirmar la presencia de dicha actividad.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. DEFINICIÓN DE ACUICULTURA

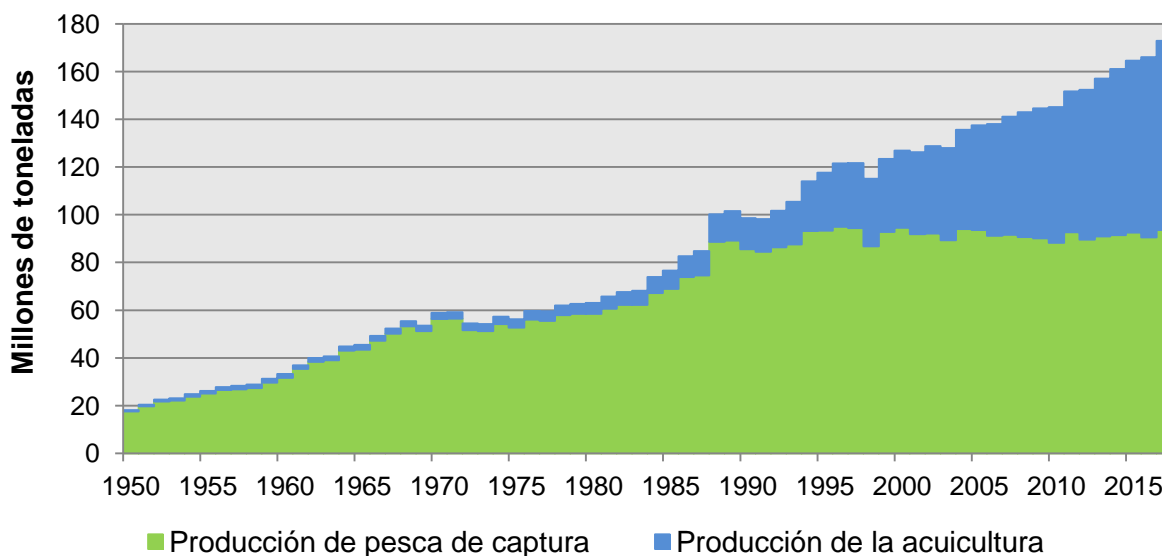
La acuicultura, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations), se define como "el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción" o como "el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, lo cual implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación y la protección de los depredadores, siendo propiedad de una persona física o jurídica" (FAO/NACA/WHO). La Unión Europea define la acuicultura como "la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar su producción por encima de las capacidades naturales del medio". El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en México, define acuicultura como "el conjunto de actividades dirigidas a la reproducción controlada, pre-engorda y engorda de especies de fauna y flora marina realizadas en instalaciones ubicadas en agua dulce, marina o salobre, por medio de técnicas de cría o cultivo que sean susceptibles de explotación comercial, ornamental o recreativa" (SIAP, 2017).

La acuicultura se ha consolidado como una actividad industrial de gran importancia económica debido a la gran cantidad de divisas que genera. Este rápido crecimiento es debido al incremento en la demanda de proteínas de origen animal a nivel mundial durante los últimos años y a la domesticación de la mayor parte de las especies de cultivo, lo que ha permitido en el caso del camarón, cerrar su ciclo biológico en cautiverio y por lo tanto producir en ambientes controlados los juveniles necesarios para su siembra en los sistema de engorda (De Silva, 2012).

### II.2. ESTADO MUNDIAL DE LA ACUICULTURA

La producción mundial de organismos marinos sigue creciendo a un ritmo mayor que el de la población mundial, manteniéndose como el sector de producción de alimentos de

más rápido crecimiento. En el transcurso de casi medio siglo, la producción ha pasado de ser insignificante con 0.6 millones de toneladas en 1950 a alcanzar un máximo histórico de 110.2 millones de toneladas en el 2016 (Figura 1). Actualmente la acuicultura representa el 47% del total de la producción global de pescado de consumo alimentario, incluyendo dentro de este rubro a peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos, pero excluyendo a mamíferos acuáticos, reptiles, caimanes, algas marinas y otras plantas acuáticas. Sin embargo, el porcentaje de producción global por acuicultura llega al 53% si se excluyen los usos no alimentarios. Dentro de los usos no alimentarios, la harina y aceite de pescado constituyen el 74%, el resto representa su uso directo en la alimentación de ganado, uso farmacéutico y uso ornamental (Tabla 1). A partir de 1990 se ha observado que mientras que la pesca por captura se ha estabilizado, en poco más de 80 millones de toneladas, la producción de pescado por acuicultura inició una contribución al suministro de pescado para consumo humano que crece año con año (Figura 1).



**Figura 1. Evolución de la producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura en el periodo 1950-2017.** Fuente: FAO (2018). Nota: Excluidos los mamíferos acuáticos, cocodrilos, lagartos, caimanes, las algas y otras plantas acuáticas.



**Tabla 1. Producción y utilización de la pesca de captura y la acuicultura<sup>a</sup> en el mundo.**

Fuente: FAO (2018).

Categoría	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<b>Producción (millones de toneladas)</b>						
<b>Pesca de captura</b>						
Continental	10,7	11,2	11,2	11,3	11,4	11,6
Marina	81,5	78,4	79,4	79,9	81,2	79,3
<b>Pesca de captura total</b>	<b>92,2</b>	<b>89,5</b>	<b>90,6</b>	<b>91,2</b>	<b>92,7</b>	<b>90,9</b>
<b>Acuicultura</b>						
Continental	38,6	42,0	44,8	46,9	48,6	51,4
Marina	23,2	24,4	25,4	26,8	27,5	28,7
<b>Total de la acuicultura</b>	<b>61,8</b>	<b>66,4</b>	<b>70,2</b>	<b>73,7</b>	<b>76,1</b>	<b>80,0</b>
<b>Total de la pesca y la acuicultura a nivel mundial</b>	<b>154,0</b>	<b>156,0</b>	<b>160,7</b>	<b>164,9</b>	<b>168,7</b>	<b>170,9</b>
<b>Utilización<sup>b</sup></b>						
Consumo humano	130,0	136,4	140,1	144,8	148,4	151,2
Usos no alimentarios	24,0	19,6	20,6	20,0	20,3	19,7
Población (miles de millones) <sup>c</sup>	7,0	7,1	7,2	7,3	7,3	7,4
Consumo aparente per cápita (kg)	18,5	19,2	19,5	19,9	20,2	20,3

<sup>a</sup> Excluidos los mamíferos acuáticos, cocodrilos, lagartos y caimanes, las algas y otras plantas acuáticas.

<sup>b</sup> Los datos de utilización correspondientes al periodo 2014-2016 son estimaciones provisionales.

<sup>c</sup> Fuente de las cifras de población: Naciones Unidas, 2015e.

En cuanto al consumo mundial de pescado per cápita, se observó un aumento de un promedio de 9.9 kg en 1960 a 20.3 kg en el 2016 (Tabla 1), lo que se explica por un aumento en la producción, la captura, y como ya se señaló, el desarrollo de la acuicultura. Se explica también por un aumento de los ingresos y urbanización, así como al impuso y expansión de la industria pesquera y la eficacia de los canales de distribución. Se prevé que para el año 2030 la pesca de captura y de acuicultura contribuirán en la misma proporción a la producción pesquera total y es probable que después de ese año, el abasto de pescado al consumo humano proveniente de la acuicultura sea mayor al 60%.

### II.2.1. COMERCIO MUNDIAL DE PESCADO

El comercio mundial de pescado ha aumentado significativamente en términos de peso vivo incrementando un 245% en el 2016 comparado con 1976, y términos de valor de 8000 millones de USD en 1976 a 143 000 millones de USD en el 2016. En los últimos 40 años la tasa de crecimiento de las exportaciones de países en desarrollo ha

sido más rápida que la de los países desarrollados. China continua siendo el principal productor y desde el 2002 también es el mayor exportador de pescado. Luego de China otros exportadores importantes en el 2016 fueron Noruega, Vietnam y Tailandia. La Unión Europea constituyó el mayor mercado único de pescado, seguido de Estados Unidos de América y Japón. Oceanía, los países en desarrollo de Asia, América Latina y el Caribe son importantes exportadores netos de pescado. Las exportaciones de América Latina comprenden fundamentalmente camarón, atún, salmón y harina de pescado procedentes de Ecuador, Chile y Perú (Tabla 2).

**Tabla 2. Principales exportadores e importadores de pescado y productos pesqueros.**

Fuente: FAO (2018).

País	2006 Valor (millones de USD)	Porcentaje (%)	2016 Valor (millones de USD)	Porcentaje (%)
<b>Exportadores</b>				
China	8 968	10,4	20 131	14,1
Noruega	5 503	6,4	10 770	7,6
Vietnam	3 372	3,9	7 320	5,1
Tailandia	5 267	6,1	5 893	4,1
Estados Unidos de América	4 143	4,8	5 812	4,1
India	1 763	2,0	5 546	3,9
Chile	3 557	4,1	5 143	3,6
Canadá	3 660	4,2	5 004	3,5
Dinamarca	3 987	4,6	4 696	3,3
Suecia	1 551	1,8	4 418	3,1
<b>Subtotal diez principales</b>	<b>41 771</b>	<b>48,4</b>	<b>74 734</b>	<b>52,4</b>
<b>Subtotal resto del mundo</b>	<b>44 523</b>	<b>51,6</b>	<b>67 796</b>	<b>47,6</b>
<b>Total mundial</b>	<b>86 293</b>	<b>100.0</b>	<b>142 530</b>	<b>100.0</b>
<b>Importadores</b>				
Estados Unidos de América	14 058	15,5	20 547	15,1
Japón	13 971	15,4	13 878	10,2
España	6 359	7,0	7 108	5,2
Francia	5 069	5,6	6 177	4,6
Alemania	4 717	5,2	6 153	4,5
Italia	3 739	4,1	5 601	4,1
Suecia	2 028	2,2	5 187	3,8
República de Corea	2 753	3,0	4 604	3,4
Reino Unido	3 714	4,1	4 210	3,1
<b>Subtotal diez principales</b>	<b>60 533</b>	<b>66,6</b>	<b>82 250</b>	<b>60,7</b>
<b>Subtotal resto del mundo</b>	<b>30 338</b>	<b>33,4</b>	<b>52 787</b>	<b>39,3</b>
<b>Total mundial</b>	<b>90 871</b>	<b>100.0</b>	<b>135 037</b>	<b>100.0</b>

## II.2.2. ESPECIES CULTIVADAS

A pesar de la gran variedad de especies marinas llamadas "partidas de especies" registradas por la FAO, el volumen de la producción acuícola está dominado por un pequeño número de especies. La cría de peces de aleta constituye el subsector más diverso con 27 especies que suponían más del 90% en el 2016. El número de especies de crustáceos, moluscos y otros animales marinos es menor (Tabla 3).

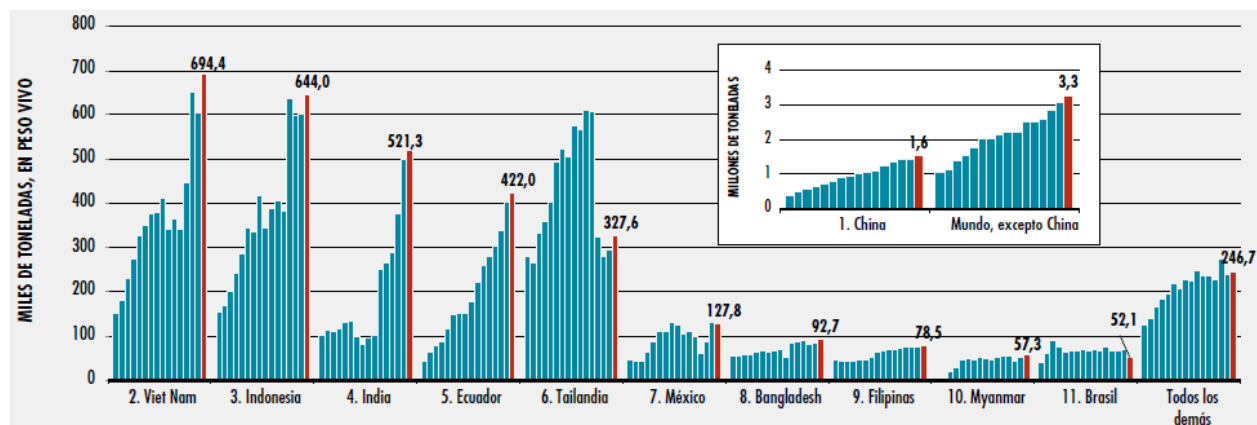
**Tabla 3. Proporción de los principales grupos de especies en el comercio mundial de pescado y productos pesqueros 2016 (% peso vivo).** Fuente: FAO (2018).

Grupos de especies	Porcentaje en valor	Porcentaje en cantidad
<b>Pescado</b>	<b>65.4</b>	<b>79.8</b>
Salmones, truchas y eperlanos	18.1	7.4
Atunes, bonitos y marlines	8.6	8.6
Bacalao, merluzas y eglefinos	9.6	14.0
Otros peces pelágicos	6.1	11.7
Peces de agua dulce	3.2	4.5
Platijas, alabatos y lenguados	2.1	1.6
Otros peces	17.8	32.0
<b>Crustáceos</b>	<b>23.0</b>	<b>8.3</b>
<b>Camarones y gambas</b>	<b>16.1</b>	<b>6.2</b>
Otros crustáceos	6.9	2.1
<b>Moluscos</b>	<b>11.0</b>	<b>11.1</b>
Calamares, sepias y pulpos	6.4	3.8
Bivalvos	3.2	6.0
Otros moluscos	1.4	1.3
<b>Otros animales/invertebrados acuáticos</b>	<b>0.6</b>	<b>0.8</b>
<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

### II.2.2.1. Camarón

Los camarones y las gambas son productos ampliamente comercializados y constituyen el segundo grupo principal de especies exportadas en términos de valor, luego del salmón, truchas y eperlanos. El porcentaje de producción más elevado registrado por la FAO es en países de América Latina y Asia oriental y sudoriental (Figura 2), sin embargo, el mayor consumo se tiene en mercados de países desarrollados como EUA, Japón, algunos países de Europa y en China. Actualmente, a pesar de que la pesca de camarón contribuye a grandes volúmenes del suministro total,

la mayor parte de ellos son cultivados (Figura 2). Debido a enfermedades y condiciones meteorológicas desfavorables, el mercado de algunos acuicultores asiáticos como Tailandia y China se ha visto amenazado, pero el sólido crecimiento en países como India y Ecuador se ha traducido en un aumento general del volumen de la oferta en el 2017. La demanda de camarón en los países en desarrollo sigue creciendo en consonancia con los precios comerciales.



**Figura 2. Evolución de la producción acuícola de crustáceos marinos del periodo 2001-2016 por productores principales** (Excluidas especies de camarón por acuicultura continental). Fuente: FAO (2018).

En América, la especie de camarón mayormente cultivada es el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, la cual se encuentra en primer lugar a nivel mundial. Esta especie de camarón es originaria de América, pero ha sido introducida para fines de cultivo a partir de 1995 en China, India, Tailandia, Vietnam y Taiwán (Ackefors, 2009).

### II.3. LA ACUICULTURA EN MÉXICO

La actividad acuícola en México comenzó a ser económicamente importante a finales de los setenta y principios de los ochenta con especies cultivadas como el pámpano en Baja California y especies de alto valor comercial como el mero manchado, pargo rojo, pargo amarillo y camarón.

La acuicultura mexicana ha pasado por tres etapas de desarrollo: i) acuicultura promocional o de subsistencia practicada en cuerpos de agua pequeños,

principalmente para autoconsumo con especies como la tilapia y la carpa, ii) pesca continental que se basa en prácticas sistemáticas de acuicultura en depósitos de tamaño mediano con especies como carpa, tilapia, bagre y lubina o de peces silvestres, langostinos, cangrejos, ranas, iii) sistemas de producción controlada destinados a productos de comercialización con grandes inversiones con especies que incluyen a la trucha, bagre, ostras y camarones (Ramírez y Sánchez, 1998).

La Carta Nacional Pesquera reporta 61 especies cultivadas en México, de las cuales 40 son nativas y 21 de origen exótico. Las principales especies cultivadas en orden de importancia son la mojarra, camarón, ostión, carpa y trucha. La diversificación es un aspecto importante en aras a la sustentabilidad, a fin de aprovechar en forma óptima la gran cantidad de cuerpos de agua marina, salobre y continental de los que dispone el país (FAO, 2005).

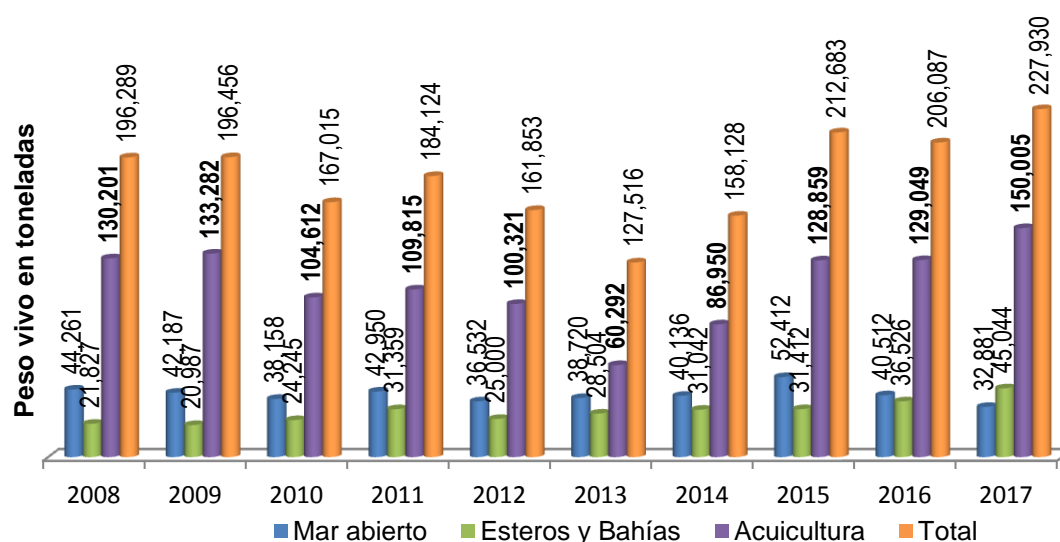
La acuicultura representa una alternativa para ampliar la oferta alimentaria nacional, contribuyendo a la seguridad alimentaria, generación de divisas, al desarrollo regional costero y oceánico y como fuente de empleo para millones de personas. El sector contribuye fuertemente en la producción de proteínas de alta calidad para el suministro de alimento a nivel nacional. La acuicultura participa en la producción pesquera nacional con poco más de 15.83% de la producción nacional. A pesar de la contribución en volumen, el valor de comercialización por parte de la actividad acuícola representa prácticamente el 40% del total de la producción nacional pesquera y acuícola (CONAPESCA, 2017).

### **II.3.1. LA CAMARONICULTURA EN MÉXICO**

México posee ciertas ventajas geográficas que permiten posicionarse como uno de los principales productores mundiales de camarón por acuicultura, entre ellas figuran: la posesión de amplias superficies costeras no aptas para la agricultura y ganadería pero sí para la acuicultura (el área potencial disponible para acuicultura se calcula en alrededor de 236,000 ha); la cercanía al principal mercado de productos pesqueros (EUA); las condiciones climáticas y ecosistemas adecuados para el cultivo de varias especies comerciales y la posesión de especies nativas con características

acuiculturales excepcionales como el camarón blanco y el camarón azul (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

La producción de camarón en México es una de las actividades primarias de mayor importancia en términos de volumen posicionándose en segundo lugar, y en primer lugar en términos de empleo y de valor económico generados en el país dentro de las actividades primarias. La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años ha sido de 1.67%. La producción total de camarón para el año 2017 fue de 150 mil toneladas (Figura 3). La acuicultura contribuye al 62.6% de la producción total de camarón siendo éste el principal producto generado en la industria acuícola en México; mientras que la captura representa un 37.4% de la producción total de camarón nacional (Tabla 4) (CONAPESCA, 2017).

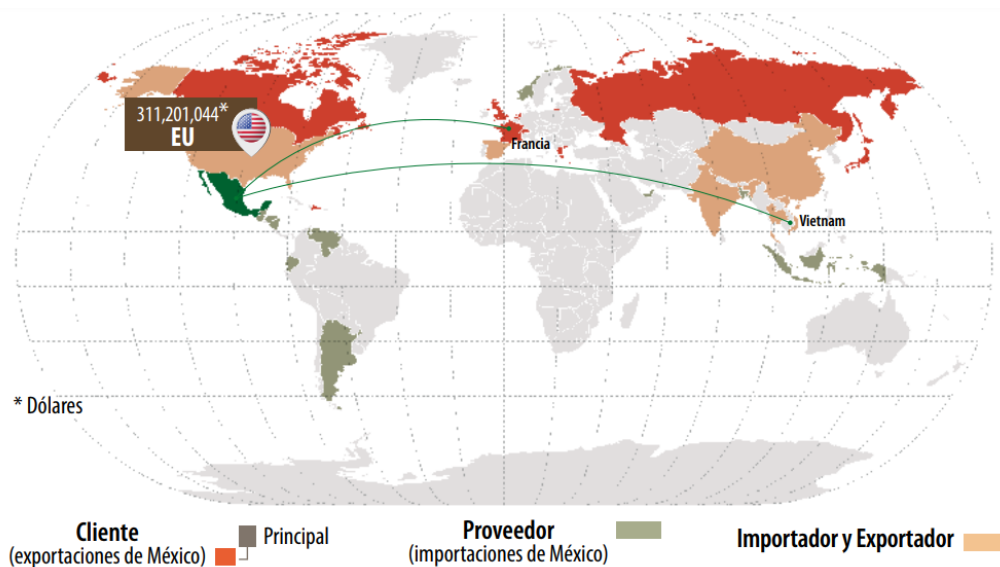


**Figura 3. Serie histórica de la producción de camarón en México de los años 2008 al 2017 por contribución en captura y acuicultura.** Fuente: CONAPESCA (2017).

**Tabla 4. Comparativo de la producción de camarón.** Fuente: CONAPESCA (2017).

Variable	2016	2017
<b>Volumen</b>		
(Peso vivo en toneladas)	206,087	227,929
<b>Valor</b>		
(Miles de pesos)	16,790,849	17,707,310
<b>Captura</b>		
(Peso vivo en toneladas)	77,038	77,853
<b>Acuicultura</b>		
(Peso vivo en toneladas)	129,049	150,076

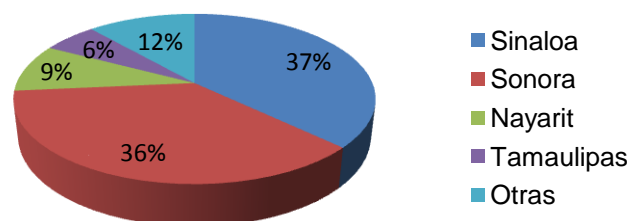
A nivel internacional, México ocupa el séptimo lugar en cuanto a producción de camarón. La captura y acuicultura en el país contribuyen con el 2.5% de la disponibilidad mundial de camarón. Dentro de los productos pesqueros que México exporta, el camarón se encuentra en primer lugar, siendo los Estados Unidos de América (77.1% de las exportaciones), Vietnam y Francia sus principales mercados. Emiratos Árabes Unidos, Corea del Sur, Venezuela y Dinamarca, realizan también compras significativas a México del crustáceo (Figura 4) (CONAPESCA, 2017; SIAP, 2018).



**Figura 4. Origen-destino comercial del camarón mexicano.** Fuente: SIAP (2018).

A nivel experimental, el cultivo de camarón en México se ha estudiado desde la década de los 60 en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora en colaboración con la Universidad de Arizona. En los años 70 se desarrollaron experimentos piloto comerciales en Sonora, Nayarit y Baja California Sur con especies de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) y camarón café (*Farfatepenaeus californiensis*). Sin embargo, después de alcanzar una gran escala de producción a partir de 1980, en el periodo de 1998-1999, las granjas se vieron gravemente afectadas por una nueva cepa causante del Síndrome del Virus Taura (TSV), optando por una mayor producción del camarón blanco resistente al TSV (Martínez-Córdova, 1999).

El desarrollo camaronícola se ha dado principalmente en la vertiente del Pacífico. Para el 2017 Sinaloa representó el mayor productor nacional con un 37%, de las 228,000 toneladas producidas ese año, seguido de Sonora, Nayarit, Tamaulipas y otros estados (Tabla 5), que juntos representan sólo el 12% de la producción total (Figura 5). La principal especie cultivada es el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), debido a que es la especie que obtiene los mejores rendimientos de crecimiento y la que tolera mejor las condiciones ambientales en cautiverio. En México, en el 2017 la producción de *L. vannamei* alcanzó poco más de las 150,000 toneladas (FIGIS, 2017). También se cultiva el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*), café (*Farfantepenaeus californiensis*), blanco del sur (*Litopenaeus occidentalis*), cristal (*Farfantepenaeus brevirostris*); mientras que por captura se obtienen las especies: siete barbas del Pacífico (*Xiphopenaeus rivet*), roca (*Sycionia disdorsalis*), cebrá (*Trachypenaeus faoe*), rojo leal (*Pleoticus robustus*), totalón (*Trachypenaeus pacificus*), rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) (CONAPESCA, 2017).



**Figura 5. Participación porcentual de la producción camaronera en México.** Fuente: CONAPESCA (2017).

**Tabla 5. Serie histórica de la producción de camarón por entidad de los años 2008 al 2017.** <sup>a</sup> Baja California, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. Fuente: CONAPESCA (2017).

Entidad	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<b>Total (toneladas)</b>	<b>196,289</b>	<b>196,456</b>	<b>167,015</b>	<b>184,123</b>	<b>161,852</b>	<b>127,517</b>	<b>158,128</b>	<b>212,684</b>	<b>206,087</b>	<b>227,929</b>
Sinaloa	60,441	55,838	59,498	79,020	63,870	61,002	67,128	84,454	80,310	84,426
Sonora	96,557	101,045	58,447	52,424	47,116	25,639	38,938	69,595	67,084	83,194
Nayarit	9,567	8,645	9,114	16,255	13,831	9,085	9,729	11,229	17,661	20,837
Tamaulipas	13,497	11,801	16,182	11,618	12,205	9,192	11,305	13,907	14,185	13,210
B.California Sur	4,264	4,464	6,150	6,946	7,652	5,920	10,405	13,276	10,816	9,081
Campeche	3,611	6,121	8,155	7,995	7,647	5,130	6,846	7,182	4,976	4,871
Colima	953	1,184	1,327	1,203	1,946	1,878	1,892	3,396	3,532	3,714
Veracruz	2,037	2,086	2,479	1,829	2,020	2,038	2,330	3,630	3,365	3,268
Chiapas	1,911	1,842	1,724	2,460	1,939	2,758	4,019	1,875	1,405	1,966
Otras <sup>a</sup>	3,451	3,429	3,938	4,373	3,627	4,875	5,537	4,139	2,752	3,361



## II.4. CICLO DE VIDA DEL CAMARÓN

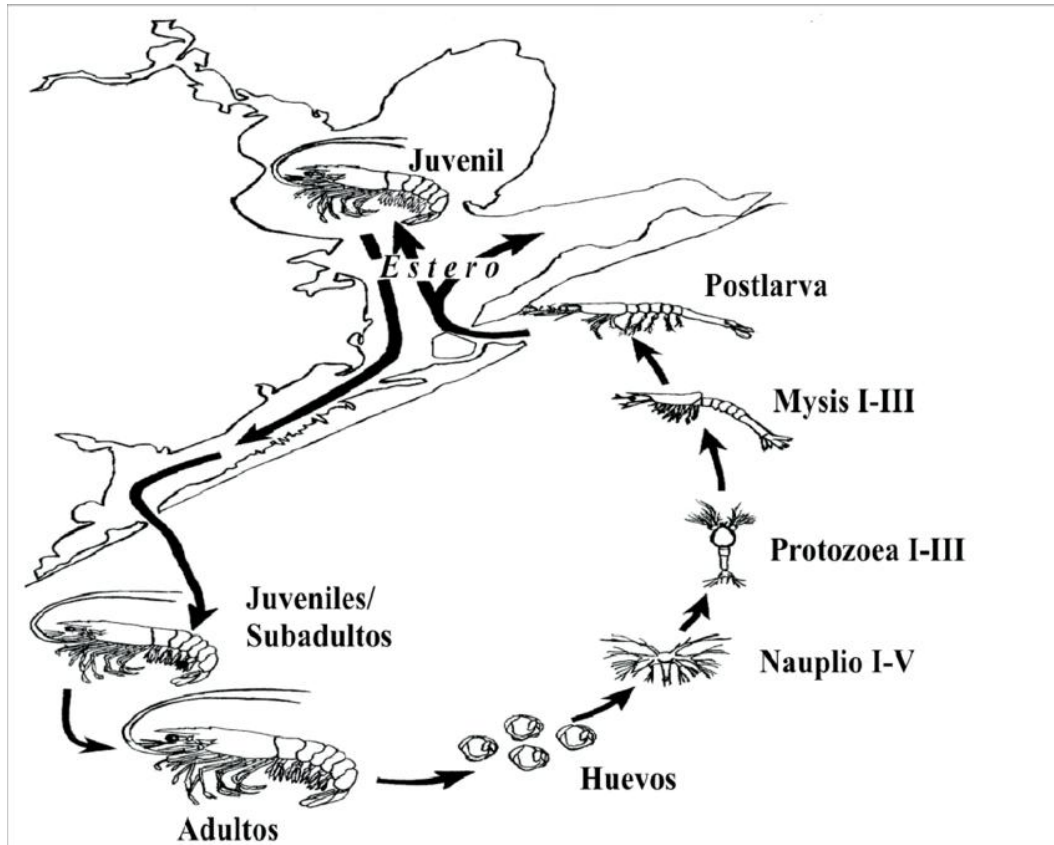
El ciclo de vida del camarón (Figura 6) puede ser dividido en dos fases: la marina y la estuarina (Morales, 1990).

### II.4.1. FASE MARINA

La reproducción del camarón comienza en mar abierto, cuando el macho deposita en la hembra el esperma que fertiliza a los huevos. Luego los huevos eclosionan y pasan a través de una serie de estadios larvales con sub-estadios, cada uno de los cuales tiene características morfológicas determinadas y diferentes requerimientos nutricionales: i) nauplio NI-NV (se alimentan de reservas de vitelo provenientes del huevo constituido de lipoproteínas), ii) protozoa 1-3 PZI-PZIII (comienza a absorber alimento del agua y se alimenta principalmente de microalgas y fitoplancton) y iii) mysis MI-MIII (se alimentan de fitoplancton y zooplancton), posteriormente alcanzan el estadio post-larva que asemejan aun camarón adulto joven, en esta etapa son omnívoras y se alimentan de detritos bénticos, gusanos, bivalvos y crustáceos.

### II.4.2. FASE ESTUARINA

Las post-larvas se dirigen hacia los estuarios, lagunas costeras y manglares, donde se desarrollan rápidamente, pues tienen mayor disponibilidad de alimento, menor salinidad, mayor temperatura y protección contra los depredadores. Después de mudas sucesivas, las post-larvas se transforman en juveniles, permaneciendo en los estuarios durante un lapso de 3 a 4 meses. Posteriormente comienzan a migrar al mar donde su crecimiento es más rápido. La vida normal del camarón es de 12 meses aproximadamente, pero algunos llegan a vivir dos años.

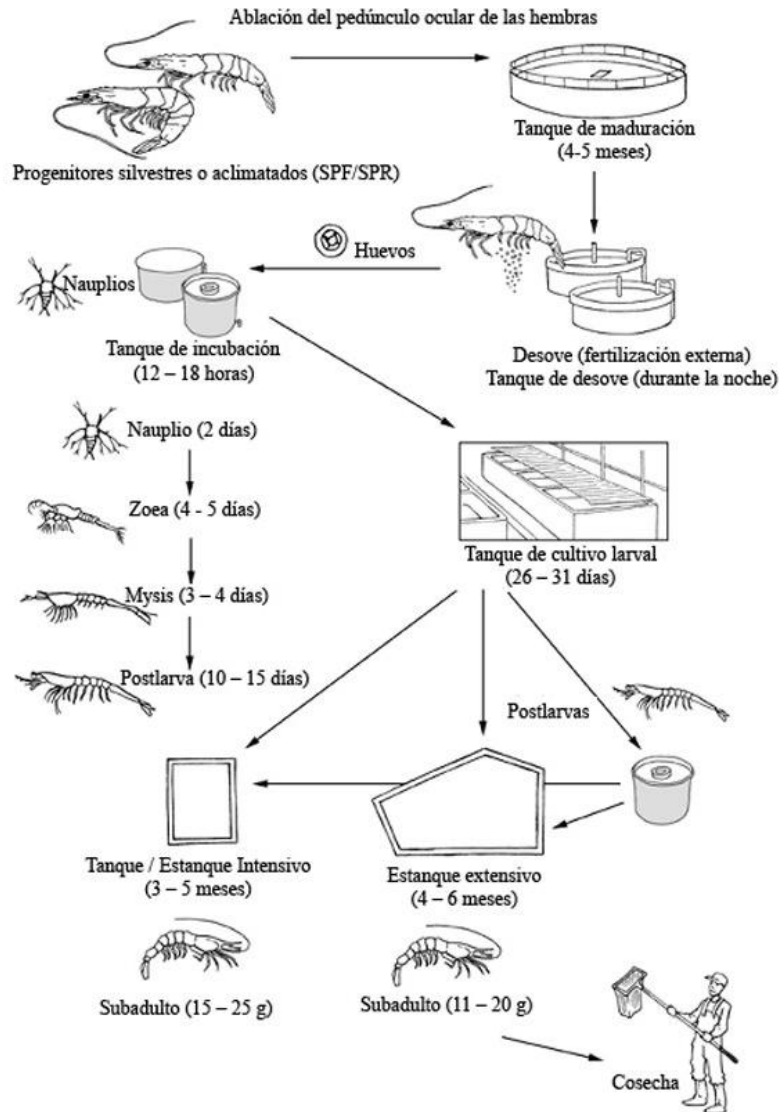


**Figura 6. Ciclo de vida del camarón.** Los adultos reproductores desovan en aguas profundas y saladas, los huevos eclosionan y experimentan los estadios larvales de nauplio, protozoa y mysis en sucesivas mudas acercándose hacia aguas costeras. Las post-larvas penetran en aguas salobres en esteros litorales para nutrirse intensamente y llegar a la etapa juvenil. Los adultos migran hacia los fondos de desove y se produce el ciclo nuevamente.

## II.5. CULTIVO DEL CAMARÓN

### II.5.1. CICLO DE PRODUCCIÓN DEL CAMARÓN

La Figura 7, esquematiza el ciclo de producción de camarón.



**Figura 7. Ciclo de producción del camarón.** Fuente: FAO (2009).

El cultivo de camarón tiene las siguientes etapas (FAO, 2009):

- a) Maduración, reproducción y desove de huevos:** Los progenitores de *L. vannamei* se pueden ser de tres orígenes: i) silvestre capturados en el mar, ii) de las cosechas de camarón cultivado de 4 o 5 meses de edad que se transfieren a instalaciones de maduración hasta alcanzar una edad superior a 8 meses, iii) modificados genéticamente que son reproductores libres de patógenos específicos (SPF) o resistentes a patógenos específicos (SPR). Los reproductores se conservan en tanques de maduración oscuros, con agua de mar filtrada. Las hembras se reproducen entre los 8 a 10 meses de edad y los

machos a los 10 meses. Las hembras desovan en tanques de desove comunales o individuales.

- b) Incubación:** Los huevos fertilizados se incuban en tanques de incubación durante 12 a 18 h.
- c) Cría de larvas:** Los nauplios saludables son atraídos mediante luz, se enjuagan y desinfectan con yodo o formalina y son transferidos a tanques de cría larval. La alimentación consiste de organismos vivos (microalgas y *Artemia*) complementado con alimento artificial.
- d) Engorda:** Las post-larvas se transfieren a zonas de engorda donde se alimentan hasta alcanzar la talla deseada para su comercialización. Existen cuatro sistemas de cultivo para la engorda del camarón que se describen posteriormente.
- e) Cosecha:** En cultivos extensivos y semi-intensivos, se drenan los estanques en marea baja o se elimina el agua, luego el camarón se atrapa con grandes redes.

#### II.5.2. SISTEMAS DE CULTIVO

Los sistemas de cultivo utilizados en la producción de camarón alrededor del mundo se clasifican en diferentes tipos (FAO, 2009; Barreto *et al.*, 2012):

- a) Extensivo:** son sistemas sin aireación que se desarrollan en las zonas intermareales con un área de 20 ha donde se producen de 100 a 500 kg/ha/cosecha. Es una técnica practicada en países latinoamericanos.
- b) Semi-intensivo:** son estanques formados con bordes de tierra entre 1 a 10 ha donde se producen de 1,000 a 3,000 kg/ha/cosecha. Requiere de recambio de agua y sistemas de aireación. Es un sistema común en América Latina. En el noroeste de México, principalmente en los estados de Sonora y Sinaloa se practican los sistemas de cultivo semi-intensivo.
- c) Intensivo:** son estanques generalmente pequeños (0.1-1 ha) formados en áreas continentales con bordes de tierra o membranas de recubrimiento, que utilizan aireación suplementaria y que producen entre 3,000 a 20,000 kg/ha/cosecha. Este sistema de cultivo es común en Asia y en América Latina.

- d) Hiperintensivo:** son sistemas controlados, que incluyen biofiltración y control de las variables ambientales, el tamaño de los estanques va de 10 a 200 m<sup>2</sup> (<0.02 ha); o son canales de flujo continuo que cuentan con flujo rápido de agua. Las producciones van entre 50,000 a 100,000 kg/ha/cosecha. Son sistemas considerados bioseguros, sustentables y con poco impacto ecológico.

## II.6. MICROBIOTA DEL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*

La microbiota en los ecosistemas de acuicultura juega un papel crucial en la absorción de nutrientes, calidad del agua, defensa frente a patógenos, resistencia a antibióticos y el estado de salud del huésped. Lo que es más, la microbiota intestinal es considerada como un órgano endócrino virtual que forma una barrera de defensa para prevenir la invasión de patógenos, además de influir en el metabolismo del huésped, en su composición corporal, funciones inmunológicas y estado de salud (Clarke *et al.*, 2014). Por lo tanto, es indispensable conocer el rol de la microbiota intestinal de camarón *L. vannamei*, para asistir en la mejora de la salud, aumentar la producción y ofrecer un alimento de inocuidad alimentaria.

Es importante saber que la colonización de tracto gastrointestinal en *L. vannamei* ocurre durante la quinta fase de nauplio, cuando el poro anal comienza su movimiento antiperistáltico conocido como "anal drinking", mucho antes de que la cavidad bucal se abra y la colonización normal de microorganismos comience. Entonces, los tejidos internos del intestino posterior pueden estar en contacto con el ambiente externo y consecuentemente con las bacterias presentes en el agua. La implicación ecológica de este fenómeno, es que varias horas antes de que comience una actividad alimenticia normal en el estadio de Zoea, los ciegos anteriores y laterales en desarrollo, así como el tronco del intestino medio y posterior, pueden estar recubiertos con bacterias presentes en el agua en ese momento. Ya en el estadio de Zoea, las larvas consumen microalgas, además es muy factible la ingestión de bacterias ya sea adheridas a las microalgas o libres en el sistema de agua (Simões *et al.*, 2002).

La microbiota intestinal de *L. vannamei* ha sido elucidada por medio de diferentes métodos como el cultivo de bacterias, y por métodos independientes de cultivo como son electroforesis de gel en gradiente desnaturizante (DGGE) y el metagenoma por secuenciación del 16S rRNA. Un total de 111 cepas bacterianas se han podido cultivar del estómago, hepatopáncreas, intestino y músculo de *L. vannamei* por métodos convencionales de cultivo, estas se agrupan en 13 grupos taxonómicos, donde siete son los grupos dominantes, los géneros *Photobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium* y *Bacillus*, y la familia *Enterobacteriaceae* (Wan *et al.*, 2006). Sin embargo, ya que el 98-99% de las bacterias en los animales acuáticos no son cultivables (Ringo *et al.*, 2016), las técnicas de cultivo sólo pueden ser usadas para aislar una pequeña proporción de las bacterias presentes en el ambiente de estudio, y estos resultados no son representativos de la diversidad y abundancia bacteriana verdadera en el intestino de *L. vannamei*.

Para la obtención de información confiable y real de la microbiota del intestino de *L. vannamei* se ha recurrido al uso de la secuenciación masiva del gen ribosomal 16S rRNA. En este marco es importante mencionar que la microbiota es modulada por diferentes variables: i) la dieta, ii) variaciones de estación, iii) factores de estrés, iv) variaciones individuales, v) si son especies nativas o cultivadas, vi) según el estadio de crecimiento, vii) estado de salud/enfermedad, viii) crecimiento, por lo que los estudios realizados respecto a la composición de la microbiota de *L. vannamei* consideran diferentes aspectos que se mencionarán a continuación. Asimismo, es importante diferenciar la microbiota autóctona o nativa, puesto que son las bacterias capaces de colonizar la superficie epitelial del intestino; mientras que la microbiota alóctona o transitoria proviene de los alimentos, el agua o del medio exterior (Ringo *et al.*, 2016).

Los análisis realizados sobre la microbiota intestinal de *L. vannamei* designan al filo *Proteobacteria* como el de mayor prevalencia en la microbiota intestinal, esto coincide con lo que ocurre en reportes de otros animales acuáticos como *Penaeus monodon* (Rungrassamee *et al.*, 2014), el pez cebrá (Roeselers *et al.*, 2011), la carpa (Wu *et al.*, 2012) y el pez gato amarillo (Wu *et al.*, 2010). Ya que la abundancia de

*Proteobacteria* en *L. vannamei* no cambia al modificar factores que incluyen la salinidad (Zhang *et al.*, 2016); la exposición a sulfuro (Suo *et al.*, 2017); si *L. vannamei* es nativo, cultivado o de laboratorio (Cornejo-Granados *et al.*, 2017); la composición de la dieta, por ejemplo la fuente de lípidos (Zhang *et al.*, 2014) y la fuente de carbohidratos (Qiao *et al.*, 2017), se puede considerar a *Proteobacteria* como el filo de bacterias más estable en el intestino de *L. vannamei*. *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* son los filos dominantes luego de *Proteobacteria*. Sin embargo, en un meta-análisis de la microbiota de camarón con 199 muestras de camarón incluyendo a *L. vannamei* como la muestra más abundante, Cornejo-Granados *et al.* (2018), develan que los factores que modelan la microbiota en camarón, y la abundancia relativa de los filos mencionados, en orden de prioridad son: el ambiente (nativos, cultivados o de laboratorio), del estadio de crecimiento, de la composición de la dieta y del estado de salud (Tzuc *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2017; Suo *et al.*, 2017; Cornejo-Granados *et al.*, 2018).

### II.6.1. FACTORES QUE MODELAN LA MICROBIOTA DE *L. VANNAMEI*

Tanto factores endógenos como exógenos pueden afectar la composición de la microbiota de *L. vannamei*. Los factores exógenos reportados se limitan a la temperatura del estanque, salinidad, concentración de sulfuro y la composición de la dieta. Los factores endógenos son el estadio de crecimiento y el estado de salud.

#### II.6.1.1. Dieta

La composición de la dieta puede modelar la estructura de la microbiota intestinal dado que las bacterias intestinales responden a cambios en la ingesta de alimentos (Roeselers *et al.*, 2011). Al considerar que las dietas de *L. vannamei* requieren un porcentaje menor de proteína (20-35%) a diferencia de *P. monodon* y *P. stylirostris* (Funge-Smith y Briggs, 2003), las investigaciones respecto a la modificación de la microbiota para aumentar el crecimiento de *L. vannamei* se han concentrado en otros elementos como los lípidos y carbohidratos.

En vista de la importancia de los lípidos como uno de los elementos esenciales en la dieta de *L. vannamei* para satisfacer sus necesidades metabólicas; entre ellas las

de proporcionar ácidos grasos esenciales, fosfolípidos, esteroides y carotenoides esenciales para el crecimiento, señalización y el mantenimiento de las funciones fisiológicas e inmunológicas normales (Pérez *et al.*, 2002). Un estudio analizó la composición bacteriana de *L. vannamei* de acuerdo a diferentes fuentes de lípidos: aceite de soya, sebo de res, aceite de linaza y aceite de pescado, comúnmente utilizados en las formulaciones alimentarias de camarón. Los camarones alimentados con una dieta 1:1:1 de aceite de soya, sebo de res y aceite de linaza, mostraron la mayor ganancia, además la combinación de lípidos contribuyó a una mayor diversidad bacteriana. En este mismo grupo, *Rhodobacteraceae* aumentó (conformado por bacterias fotosintéticas) y *Aeromonadaceae* y *Enterobacteriaceae* disminuyeron (asociadas a disbiosis). *Proteobacteria* y *Tenericutes* mostraron ser los filos dominantes independientemente de la fuente de lípidos (Zhang *et al.*, 2014).

Al estudiar la influencia de las diferentes fuentes de carbohidratos en la modificación de la microbiota a baja salinidad, se encontró que los grupos alimentados con glucosa y sacarosa mostraban mejor crecimiento que los alimentados con almidón de maíz. Especies de *Proteobacteria* resultaron ser los miembros prevalentes. En el grupo alimentado con almidón de maíz, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* disminuyó y *Firmicutes* incrementó, lo que sugiere que *Firmicutes* juega un papel importante en la degradación de fibra, como sucede en mamíferos, y que la abundancia de estos dos filos se ve afectada por la fuente de carbohidratos en la dieta. Los resultados muestran que las bacterias responsables de la degradación de carbohidratos complejos como *Clostridium*, *Citrobacter*, *Actinomyces*, *Leuconostoc*, *Axoxybacillus*, *Ruminococcus* spp. y *Fibrobacter* spp. son menos abundantes en *L. vannamei* que en mamíferos (Qiao *et al.*, 2017).

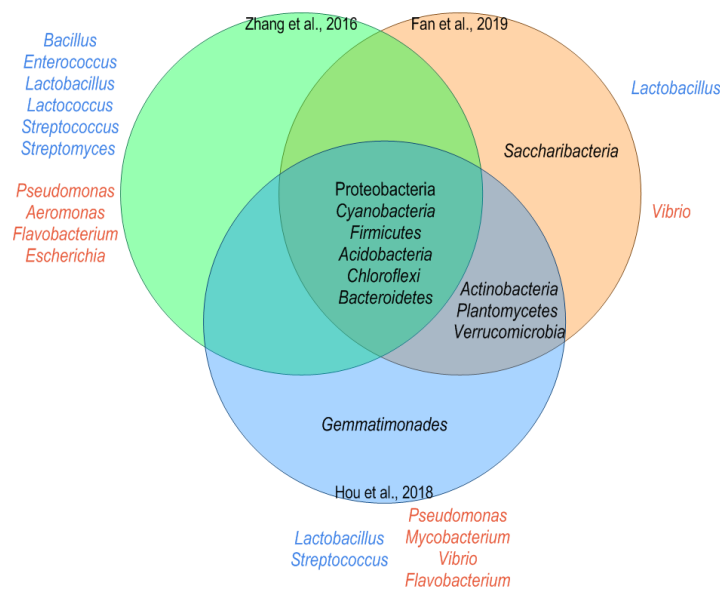
Actualmente, ingredientes a base de plantas, se incluyen en las formulaciones alimenticias con el fin de reemplazar a la costosa harina de pescado y el aceite de pescado. Por lo que, la microbiota de *L. vannamei* responderá a los cambios causados por la modificación de los componentes de la dieta, por ello es necesario profundizar en el conocimiento de las alteraciones fisiológicas producidos por la microbiota en respuesta a las modificaciones nutricionales.



### II.6.1.2. Factores ambientales

Las prácticas de acuicultura pueden remodelar el perfil de la microbiota de *L. vannamei*. Las comunidades bacterianas pueden cambiar debido a factores ambientales, como las condiciones del agua, la temperatura y el sistema de acuicultura (Cornejo-Granados *et al.*, 2017; Landsman *et al.*, 2019). En los sistemas de acuicultura, los estanques son los lugares en los que prácticamente viven los camarones, por tanto los sedimentos y el agua del sistema pueden afectar directamente la microbiota intestinal de *L. vannamei*.

Para conocer si la microbiota intestinal mantiene alguna relación con su medio ambiente, varios estudios han analizado la relación que existe entre las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal, los sedimentos y el agua de los estanques (Zhang *et al.*, 2016; Cornejo-Granados *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2019). Los filos comunes entre ellos se resumen en la Figura 8. Las conclusiones de estos trabajos han sido que i) la diversidad microbiana en los sedimentos es mayor que la del agua, ii) la microbiota intestinal, los sedimentos y el agua es similar a nivel filo, iii) la composición y abundancia microbiana es diferente a nivel género o familia, iv) existe una frecuente interacción entre la microbiota intestinal y la de los sedimentos.



**Figura 8. Diagrama de Venn de la composición microbiana a nivel filo de la microbiota intestinal-sedimentos-agua por tres distintos autores. A nivel género los probióticos se**

identifican con letras azules, los patógenos en rojo. Zhang *et al.*: muestras de sedimentos y agua de estanques, Fan *et al.*: muestras intestinales y sedimentos de ambientes marinos y aguas dulces, Hou *et al.*: intestinos, agua y sedimentos.

Los estudios de la microbiota intestinal de *L. vannamei* en distintas condiciones ambientales se resumen en la Tabla 6.

**Tabla 6. Tabla comparativa de la microbiota intestinal de *L. vannamei* modelada por distintos factores ambientales. (\*) Exclusivos del grupo, (1) Bacterias probióticas, (2) Bacterias patógenas.**

Factor	Tipo de práctica de cultivo Landsman <i>et al.</i> , 2019		Silvestre o cultivado Comejo-Granados <i>et al.</i> , 2017		Exposición a agentes tóxicos Suo <i>et al.</i> , 2017		Salinidad Zhang <i>et al.</i> , 2016	
Condición	Estanques	Laboratorio	Silvestre	Cultivado	Sulfuro	Control	Intermedia-alta (17-30 psu)	Baja (3 psu)
Filo	Proteobacteria Cyanobacteria Firmicutes Fusobacteria	Proteobacteria Actinobacteria	Proteobacteria Cyanobacteria Actinobacteria Nitrospirae	Proteobacteria Cyanobacteria Bacteroidetes Gemmatimonadetes Fusobacteria Spirochaetes	Proteobacteria Cyanobacteria Chlorobi Fusobacterium	Proteobacteria Nitrospirae	Proteobacteria Bacteroidetes	Proteobacteria Tenericutes Firmicutes Planctomycetes
Familia	Vibrionaceae	Rhodobacteraceae	Vibrionaceae Enterobacteriaceae Moraxellaceae Oxalobacteraceae	Vibrionaceae Enterobacteriaceae Pseudoalteromonadaceae Pseudomonadaceae			Rhodobacteraceae	
Género o Especie	<i>Vibrio alginolyticus</i> <sup>2</sup>	<i>Thalassobacter stenotrophicus</i> <i>Phaeobacter piscinae</i>	<i>Vibrio</i> <i>Photobacterium</i> <i>Paracoccus</i> <i>Fusibacter</i> <i>Acinetobacter</i> * <i>Nitrobacteria</i> * <i>Bacillus</i> * <sup>1</sup> <i>Janthinobacterium</i> * <i>Dietza</i> * <i>Streptomyces</i> * <sup>1</sup> <i>Pseudomonas stutzeri</i> * <i>Bacillus flexus</i> * <sup>1</sup>	<i>Vibrio</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Photobacterium</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <sup>2</sup> <i>Shigella</i> <sup>2</sup> <i>Citrobacter</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Butyrivibrio</i> * <i>Coprococcus</i> * <i>Faecalibacterium</i> * <sup>1</sup> <i>Bacteroides</i> * <i>Bifidobacterium</i> * <sup>1</sup>	<i>Propionigenium</i> <i>Ferrimonas</i> <i>Vibrio</i> <sup>2</sup> <i>Photobacterium</i> <sup>2</sup> <i>Clostridium</i> <sup>2</sup>	<i>Planctomyces</i> <i>Microbacterium</i> <i>Reichenbachiella</i> <i>Parachlamydia</i> <i>Shewanella</i> <i>Lactobacillus</i> <sup>1</sup> <i>Leuconostoc</i> <sup>1</sup> <i>Lactococcus</i> <sup>1</sup>	<i>Photobacterium</i> <sup>2</sup> <i>Nautella</i> <i>Maribacter</i> <i>Pseudoalteromonas</i> <i>Psychromonas</i> <i>Vibrio</i> <sup>2</sup>	<i>Fusobacteria</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Shewanella</i> <sup>2</sup> <i>Gemmobacter</i> <i>Aeromonas</i>
Observaciones	Las prácticas de acuicultura influyen el perfil bacteriano.		La microbiota y sus funciones metagenómicas son diferentes entre los camarones silvestres y cultivados. Algunas bacterias se pierden durante la domesticación del camarón.		El sulfuro como agente tóxico modela la diversidad de la microbiota intestinal.  La abundancia de bacterias patógenas aumentan al incrementar la concentración de sulfuro y las bacterias anti-estrés disminuyen		Las bacterias oportunistas aumentan y las benéficas o comensales disminuyen cuando el hospedero se enfrenta condiciones de estrés hipo e hipersalino.	

Los factores ambientales afectan directamente el perfil microbiano intestinal de *L. vannamei*. Es de notarse una tendencia bajo factores estresantes y condiciones subóptimas de crecimiento, que *L. vannamei* adquiere bacterias patógenas y carece de bacterias benéficas, promoviendo las infecciones.

### II.6.1.3. Estadio de crecimiento

La microbiota intestinal del blanco del Pacífico varía con el estadio de desarrollo y la edad. La composición microbiana de post-larvas de camarón de uno, dos y tres meses de edad de camarones juveniles se estudiaron por pirosecuenciación en la plataforma 454 (Huang *et al.*, 2016). El filo *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* dominan en todos los estadios, pese a esto, la abundancia relativa de las bacterias a nivel familia varía, *Rhodobacteraceae* y *Flavobacteriaceae* están presentes en todos los estadios, sin importar el cambio de la dieta, por lo que reportan formar el núcleo o core microbiano intestinal de *L. vannamei*, a pesar de los miembros bacterianos varíen entre estadios de crecimiento, lo que indica cambios dinámicos de la microbiota intestinal durante el crecimiento del camarón blanco. *Comamonadaceae* y *Betaproteobacteria* dominan en la etapa post-larval y en el primer mes de edad, posiblemente por la introducción en la alimentación de nauplios de *Artemia nauplii*, estas familias desaparecen a los dos y tres meses de edad con el uso de dieta comercial. El cambio de microbiota intestinal en los diferentes estadios de desarrollo del Pacífico, se debe por lo tanto, a cambios en la dieta (Huang *et al.*, 2016). *Enterobacteriaceae* predomina en las larvas, seguido de una comunidad enriquecida en *Rhodobacteraceae*, *Aeromonadaceae* y *Mollicutes* en los juveniles. Durante la etapa adulta predominan *Vibrionaceae* y *Pseudomonadaceae*, mostrando una mayor diversidad filogenética (Cornejo-Granados *et al.*, 2018)

En otro estudio en el que se analizó la microbiota de post-larvas, demuestra que la composición microbiana varía en diferentes estadios de crecimiento. Con filos dominantes de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi* comunes en todos los estadios. Los resultados demuestran que un grupo de microorganismos existentes en todos los estadios, pueden ser relevantes en la estructura fundamental y en las funciones de la microbiota intestinal del camarón blanco (Zeng *et al.*, 2017).

#### II.6.1.4. Estado de salud

Es de notar, que sólo un estudio a nivel metagenómico se ha llevado a cabo para conocer las diferencias en la microbiota de *L. vannamei* enfermos por AHPND/EMS, utilizando la secuenciación de siete regiones hipervariables del gen 16S rRNA. Los resultados confirman que el microbioma de los camarones enfermos es diferente a los camarones sanos. La diversidad bacteriana intestinal es mayor en los camarones enfermos, a diferencia de los sedimentos en los que la diversidad bacteriana es menor. *Crenothrix* se identificó en intestinos sanos, *Microbispora*, *Shinella* y *Tredinibacter* en intestinos enfermos. En cuanto a los sedimentos, las muestras de estanques sin enfermedad contenían *Pseudomonas*, y los estanques de enfermos *Inquilinus*, *Desulfobacter*, *Salinibacter*, *Flavobacterium*, *Halothiobacillus*, *Acidaminobacter*, *Alishewanella* y *Salinivibrio*. Conjuntamente se identifican bacterias intestinales asociadas a un estado de salud, como *Faecalibacterium prausnitzii* y *Vibrio shilonii*, mientras que en los camarones enfermos predominan *Aeromonas taiwanensis*, *Simiduia agarivorans* y *Microbispora rosea*, entre tanto que en los sedimentos se encuentran *Spirochaetes* y *Verrucomicrobia*. Adicionalmente la predicción del metagenoma de las muestras de animales enfermos señala metabolismo enriquecido de aminoácidos, carbohidratos y lípidos, y en sanos arroja mecanismos de transducción de señales (Cornejo-Granados *et al.*, 2017).

## II.7. PROBLEMÁTICA EN LA ACUICULTURA CON ÉNFASIS EN LAS ENFERMEDADES

La camaronicultura alcanza niveles cada vez de mayor importancia, destacándose como una de las actividades productivas de más rápido crecimiento y expansión a nivel mundial. Esto ha causado un rápido desarrollo en la producción de post-larvas de camarón para el abastecimiento de los sistemas de cultivo. Sin embargo, el desarrollo de la industria camaronera ha sido frenada por restricciones en la producción, tales como brotes de enfermedades en los países productores y fluctuaciones no estacionarias en las corrientes oceánicas (Jory, 1998). Los patógenos potenciales son componentes de todos los ecosistemas y su existencia se perpetúa porque pueden transmitirse de manera eficiente sin causar necesariamente enfermedad. Muchos microorganismos, con capacidad de causar enfermedad están presentes en animales sanos. La acuicultura a gran escala promueve el ambiente ideal para la aparición de enfermedades emergentes por los cambios que propicia: i) los animales son cultivados en ambientes no naturales, ii) los animales se cultivan en densidades altas, iii) los animales sufren estrés por las condiciones de cultivo, iv) el comercio ocurre de forma no regulada (NACA, 2012).

Los principales agentes etiológicos de enfermedad en los camarones son los virus y bacterias. Los hongos y protozoarios juegan un papel menor en la aparición de infecciones.

### II.7.1. VIRUS

Los virus se propagan rápidamente no sólo en las instalaciones de incubación, crecimiento y engorda de camarón, también se transportan entre granjas y productos congelados. La transmisión es tipo horizontal por ingestión (canibalismo, depredación) de tejido infectado, transmisión asociada al huevo y por agua (Karunasagar y Ababouch, 2012). Las infecciones virales se acompañan típicamente por una infestación secundaria de tipo bacteriano, que resulta ser la causa final de la muerte. Se han reportado aproximadamente 20 virus de peneidos (Tabla 7). En la industria camaronera destacan cuatro grupos de virus, el parvovirus que causa el síndrome de la mancha blanca (WSSV), el baculovirus que causa la necrosis hipodermal y

hematopoyética (IHHNV), el rhabdovirus que causa el síndrome de la cabeza amarilla (YSH) y el virus que causa el síndrome del Taura (TSV) (FAO, 2004; OIE, 2018). Recientemente se han detectado nuevos virus que amenazan la producción camaronera en China, como el virus iridescente de los hemocitos de camarón (SHIV) que causa el Síndrome de las heces blancas que infecta a *L. vannamei* (Menon, 2019). *Litopenaeus vannamei* puede adquirir WSSV, BP, IHHNV, TSV, REO, LOVV y SHIV. Muchos de los virus pueden no manifestarse en su hospedero, ya sea nativo o cultivado, a menos que sean identificados por métodos de diagnóstico molecular, lo que provoca que las epizootias se propaguen fácilmente cuando se transportan nuevas especies o cuando infecta a un hospedero intolerante (Wickins y Lee D., 2002; FAO, 2004).

**Tabla 7. Principales virus causantes de enfermedades en camarones.** Fuente: OIE (2018).

Virus	Abreviación	Familia	Género	Genoma	Distribución
Infección por el virus asociado a las branquias	GAV	<i>Roniviridae</i>	<i>Okavirus</i>	ssARN	Australia, Asia, Pacífico
Baculovirus tetraédrica ( <i>Baculovirus penaei</i> )	BP	<i>Baculoviridae</i>	-	dsADN	Asia
Baculovirus esférica de <i>P. monodon</i>	MBV	<i>Boculoviridae</i>	<i>Nuclopolihedrosisvirus</i>	dsADN	Asia, Australia, África, América
Infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa	IHHNV	<i>Parvoviridae</i>	<i>Brevidensovirus</i>	ssADN	Asia, Australia, África, América
Infección por el virus de la mionecrosis infecciosa	IMNV	<i>Totiviridae</i>	-	SsARN	América del Sur, Asia
Infección por el virus del síndrome de Taura	TSV	<i>Dicistroviridae</i>	-	ssRNA	América, Asia
Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas	WSSV	<i>Nimaviridae</i>	<i>Whispovirus</i>	dsADN	Asia, América
Infección por el virus de la cabeza amarilla	YHV	<i>Roniviridae</i>	<i>Okavirus</i>	ssARN	Asia, América Central
Parvovirus Hepatopancreático	HPV	<i>Parvoviridae</i>	<i>Brevidensovirus</i>	ssADN	Asia, Australia, África, América
Baculovirus de la necrosis de la glándula del intestino	BMNV	<i>Baculoviridae</i>	-	dsADNA	Asia, Australia
Virus de la vacuolización de órganos linfoides	LOVV	<i>Togavirus</i>	-	ssARN	América
Virus de la mortalidad aislada del reproductor	SMV	<i>Parvoviridae</i>	-	ssADN	Australia, Asia

## II.7.2. BACTERIAS

La mayoría de las enfermedades causadas por bacterias son de etiología secundaria. Algunas bacterias coexisten de forma benigna con su huésped, pero causan enfermedades sólo en condiciones que predisponen a la patogenicidad. Estas condiciones pueden surgir en ambientes que favorecen el rápido crecimiento bacteriano como niveles elevados de materia orgánica disuelta o de factores de estrés como una nutrición inadecuada, una alta densidad de cultivo, cambios de temperatura o baja calidad del agua (Lightner, 1985; Wickins y Lee, 2002). Sin embargo, se ha identificado síndromes en los que las bacterias son los agentes primarios causantes de enfermedades (Lightner, 1993).

Las infecciones bacterianas afectan a los camarones de tres formas; i) erosiones en la cutícula que cubre la superficie del cuerpo y branquias, ii) lesiones localizadas en el cuerpo y iii) septicemias (Lightner, 1985).

### II.7.2.1. Vibriosis

En los ecosistemas acuáticos donde el camarón ocurre de manera natural o donde es cultivado, el género *Vibrio* constituye uno de los grupos infecciosos más importantes por su patogenicidad y abundancia. Las bacterias del género *Vibrio* son ubicuos en la acuicultura del camarón, y aunque su presencia no es necesariamente indicativa de enfermedad, son patógenas oportunistas. Por tal motivo, la principal enfermedad infecciosa bacteriana encontrada en cultivos de camarón en la etapa larvaria y de engorda es la vibriosis (Gómez-Gil *et.al.*, 1998).

El género *Vibrio* está constituido por bacterias Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, no esporuladas y móviles por medio de flagelos polares. Pueden presentar una morfología curvada, generalmente halodependientes de 0.5 a 3% de NaCl y poseen enzimas como la catalasa, la oxidasa, la nitratorreductasa y triptofanasa. Los vibrios son característicamente nativos de hábitats marinos, salobres y estuarinos, aparecen en grandes concentraciones cuando las aguas aumentan de temperatura (17-20° C), a temperaturas bajas permanecen en el sedimento de los

fondos marinos, en cantidades inferiores a las necesarias para producir infecciones (García y Mira, 1997).

Las principales especies reportadas como causantes de infecciones en el camarón de cultivo, que se han aislado de cuadros infecciosos de camarón (de lesiones y de la hemolinfa), son varias especies de *Vibrio* spp. como *Vibrio alginolyticus*, *V. parahemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. campbelli*, *V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. fischeri*, *V. damsella*, *V. pelagicus*, *V. orientalis*, *V. ordalii* y *V. penaeicida* (Lightner, 1985; Ishimaru *et al.*, 1995; Mastan y Begum, 2016), que aunque algunas son consideradas nativas de la microbiota normal de camarones silvestres y cultivados, representan un riesgo latente cuando los camarones son sometidos a estrés constante, tornándose en agentes causales de enfermedades o representando los agentes etiológicos primarios cuando son cepas virulentas (Jayasree *et al.*, 2006). Los posibles mecanismos de infección pueden ser: i) producción de enzimas extracelulares (proteasas, lipasas, quitinasas) que permiten la implantación y penetración de la bacteria a los tejidos, llegando a provocar septicemias (Sinderman, 1989), ii) producción de toxinas extracelulares que licúan tejidos y producen gran mortalidad (Sinderman, 1988), iii) producción de hemolisinas por algunos vibrios como *V. vulnificus*, *V. anguillarum* y *V. cholerae* (Munn, 1978), iv) presencia de plásmidos de virulencia (Crosa, 1980; Austin, 2016).

El mayor efecto patológico de estas bacterias sobre camarones se ha observado en la etapa larvaria cuando los organismos no han desarrollado completamente sus estrategias de defensa, aunque también ocurre en juveniles y adultos. Las mayores epizootias de vibriosis se han encontrado en *P. japonicus*, *P. monodon* y *L. vanammei*. La vibriosis puede aparecer posterior a: i) una fuerte colonización de vibrios en la cutícula superficial del camarón, especialmente en heridas por la penetración de las barreras del huésped, o por ii) colonización bacteriana en el tracto digestivo por el consumo de un gran número de microorganismos provenientes de detritus orgánico, sedimentos, agua o partículas de alimentos (Lightner, 1996; Mastan y Begum, 2016).

En la última década se ha presentado una enfermedad emergente muy grave causada por un miembro del género *Vibrio*, *Vibrio parahemolyticus*. Ésta es la



Enfermedad aguda de necrosis hepatopancreática (AHPND) o Síndrome de mortalidad temprana (EMS), que causa serios daños al hepatopáncreas y consecuentemente infecciones de *Vibrio* spp. secundarias (Menon, 2019).

#### II.7.2.2. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)

Esta enfermedad, también denominada “Síndrome de la mortalidad temprana” (EMS), se detectó por primera vez en China en el año 2009 (FAO, 2013) y se expandió a Vietnam, Malasia, Filipinas y Tailandia (NACA, 2012), hasta llegar a México en el 2013, específicamente a los estados de Nayarit, Sonora y Sinaloa (Nunan *et al.*, 2014), causando una tasa de mortalidad hasta del 100% en algunas zonas. Recientemente se detectó un brote en Texas, el primero reportado en los EUA (Jory, 2018).

El EMS es causado por cepas de *Vibrio parahemolyticus* ( $Vp_{AHPND}$ ) que contienen un plásmido de ~70 kpb (pVA1) con genes ( $pirAB^{vp}$ ) que codifican para homólogos de la toxina binaria relacionada con el insecto *Photorhabdus* (Pir), concretamente, PirA<sup>vp</sup> y PirB<sup>vp</sup>, formando un heterodímero. La estructura cristalina de la proteína PirAB<sup>vp</sup> es muy similar a la de las toxinas Cry insecticidas de *Bacillus thuringiensis*, aunque la identidad de la secuencia tiene una baja similitud (10%); se sugiere que emula la actividad de la proteína citotóxica formadora de poros (Yang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). Aún cuando existen informes del aislamiento de otras especies del género *Vibrio* de casos clínicos de EMS, sólo en  $Vp_{AHPND}$  se ha demostrado la capacidad de causar AHPND (Kondo *et al.*, 2015). Sin embargo, recientemente se encontró que cepas de *V. campbellii* aisladas en el 2002, son portadoras de las toxinas PirAB<sup>vp</sup> y son capaces de producir AHPND (Wangman *et al.*, 2018). Se especula que estos hallazgos se deben a la presencia en el plásmido pVA1 de un conjunto de genes relacionados con la transferencia conjugativa y dos genes de movilización de plásmido, lo que permite la transferencia de los genes putativos de toxinas a otras especies de *Vibrio* por medio de transferencia horizontal vía transposición o recombinación homóloga (Lee *et al.*, 2015).

Los signos clínicos de la enfermedad son hepatopáncreas atrofiado de aspecto pálido con puntos negros en la fase terminal, estómago e intestino vacíos, caparazones blandos y letargo. El examen histológico muestra desprendimiento de las células epiteliales del hepatopáncreas al lumen. Tras el daño causado por *V. parahemolyticus*, suelen ocurrir infecciones severas de bacterias oportunistas (Lightner *et al.*, 2012). Se caracteriza por mortalidades súbitas y masivas (prevalencia hasta del 100%) normalmente en un plazo máximo de 30-35 días tras la repoblación de estanques de engorda con post-larvas o juveniles de las especies susceptibles *L. vannamei* y *P. monodon* (NACA, 2012; FAO, 2013).

### II.7.3. HONGOS

Algunos hongos patógenos de los camarones peneidos son *Lagenidium sp.*, *Sirolopidium sp.* y *Fusarium solani*. Miembros de estos géneros han sido reportados como causantes de pérdidas de *P. semisulcatus* en Kuwait, de *P. orientalis* en China, tanto en la etapa larval, juvenil y de engorda. *F. solani* invade directamente al causar encapsulación de los hemocitos, melanización y deposición de fibras de colágeno en una lesión granulomatosa que rodea a la hifa. De forma secundaria a la invasión de *F. solani*, ocurren infecciones bacterianas y cambios en la hemolinfa (hipoproteinemia, hemocitopenia y problemas de coagulación) (Lightner, 1985).

### II.7.4. PARÁSITOS

Los principales parásitos en los camarones son las gregarinas, microsporidios, haplosporidios, epicomensales (algas, bacterias filamentosas y protozoarios) y metazoarios (tremátodos y nemátodos). Los protozoarios son los parásitos más frecuentes en órganos y tejidos, afectan el exoesqueleto, las branquias y el tracto digestivo.

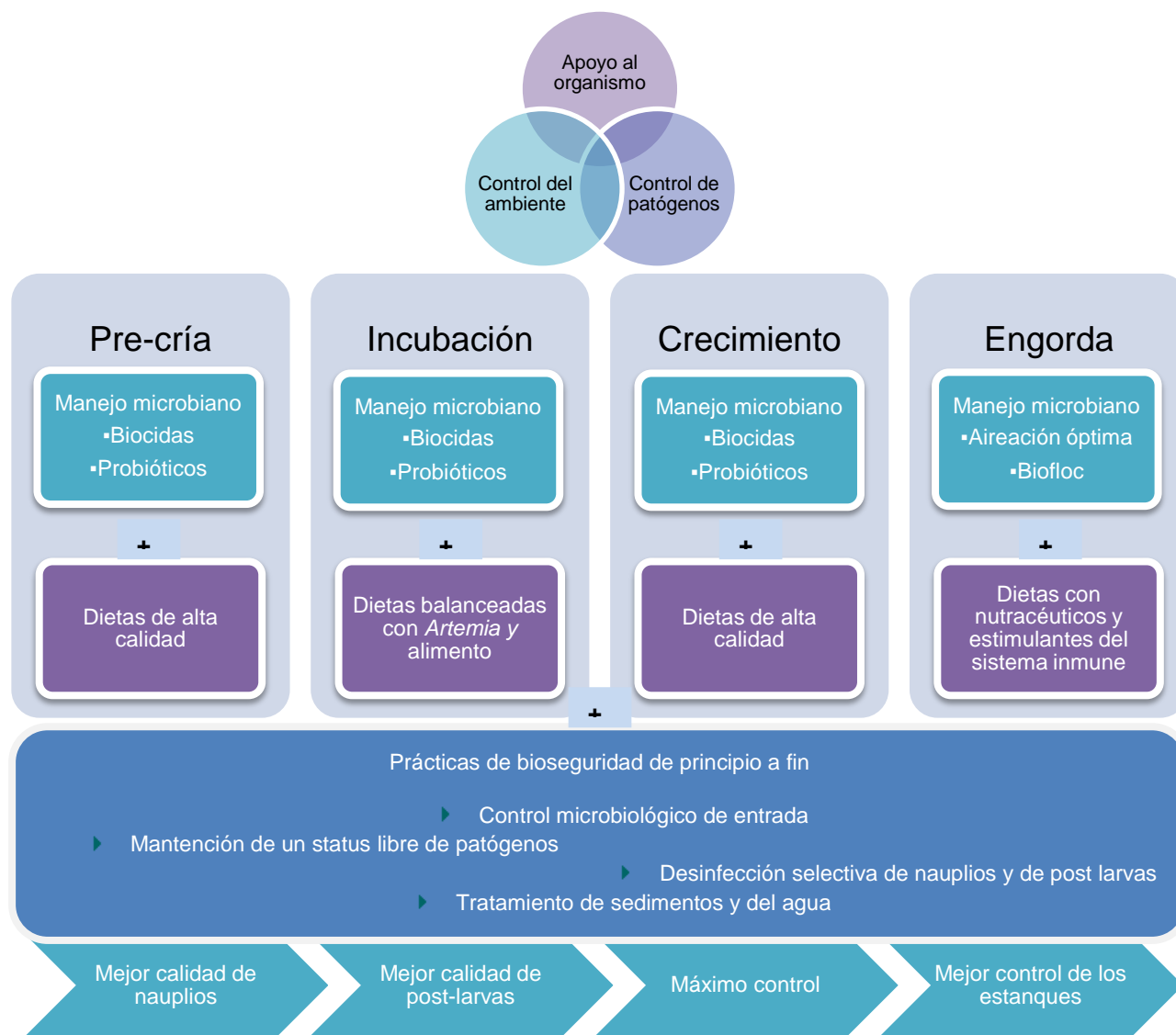
Los microsporidios provocan la enfermedad del camarón algodónoso o lechoso, afecta al músculo estriado y las gónadas, la prevalencia de la enfermedad alcanza el 10% en estanques. La microsporidiosis hepatopancreática es causada por *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), afecta el sistema digestivo; es un padecimiento emergente que ha causado estragos en *L. vannamei* y *P. monodon* en Tailandia, China,

Indonesia, Malasia, Vietnam e India (Jory, 2018). Las gregarinas (*Protozoa, Apicomplexa*) son habitantes intestinales de peneidos cultivados y silvestres, causan problemas muy raramente, incluso cuando se agrupan en el intestino medio. Los epicomensales son organismos que se adhieren a las branquias o a la superficie de peneidos cuando son cultivados en altas densidades. No son patógenos verdaderos, sino que se adhieren a las branquias o superficies cuticulares de los apéndices y compiten por el oxígeno disuelto, como lo hace la bacteria ubicua de ambiente marino *Leucothrix mucor*. Afectan la alimentación y locomoción por colonización excesiva de la cutícula por bacterias filamentosas (*Flexibacteria sp.*, *Thiothrix sp.* y *Cytophaga sp.*), protozoarios (*Epistylis spp.*, *Zoothamnium spp.*, *Vorticella spp.*, *Lagenophrys sp.*) y algas (algas verdiazules *Spirulina subsalsa*, *Schizothrix calcicola* y *diatomeas*) provocando la enfermedad de las branquias sucias (Lightner, 1985; Cuéllar-Anjel, 2015).

## II.8. CONTROL DE ENFERMEDADES

En relación con las epizootias en especies de camarón cultivado, el 60% de las pérdidas de camarón se deben a virus y cerca del 20% a bacterias. Así el interés de enfocarse en el control de enfermedades causadas por agentes virales y bacterianos (Flegel *et al.*, 2008)

El control se focaliza en la prevención, que requiere: i) el desarrollo de herramientas de diagnóstico eficientes, ii) de buenas prácticas de bioseguridad, manejo e inocuidad alimenticia (Flegel *et al.*, 2008). En la Figura 9 se describe un abordaje holístico del control y manejo de enfermedades durante todas las etapas de cultivo, propuesto por el GAA (Global Aquaculture Alliance).



**Figura 9. Manejo holístico de las enfermedades en el cultivo de camarón.**

En el Código de prácticas para el cultivo responsable de camarón de la Global Aquaculture Network (GAA) se presentan los aspectos relacionados con la inocuidad del camarón (Boyd, 2009). De manera general es altamente recomendable y ventajoso establecer buenas prácticas de manejo y bioseguridad de forma ideal en todos los puntos de la cadena de suministro, esto incluye desde los proveedores de reproductores, durante la incubación, en semilleros, en las granjas y hasta la cadena de distribución (Corsin, 2008; Boyd, 2009). En un manejo holístico el primer grupo de prácticas se establece en el correcto manejo de los sistemas de acuicultura para

garantizar un ambiente óptimo y estable a lo largo del ciclo de cultivo. El segundo grupo se enfoca en evitar y/o disminuir la presencia de virus y bacterias virulentas, así como de prevenir la posibilidad de la invasión de bacterias y virus oportunistas. El tercer grupo se enfoca promocionar la salud integral de organismo al fortalecer el sistema inmune a través de una nutrición óptima y de suplementos alimentarios (Corteel y Decamp, 2016). Las principales medidas recomendadas para cada etapa de cultivo se mencionan a continuación:

- a) **Pre-cría:** Uso de semillas libres de patógenos certificadas, desinfección de nauplios y materiales, formulación de dietas para los reproductores que eliminen el riesgo de patógenos.
- b) **Incubación y crecimiento:** Garantizar una óptima nutrición de las larvas que comienzan a alimentarse tanto de alimento artificial y natural (algas, *Artemia*) para propiciar una microbiota sana, con la finalidad de obtener una post-larva de calidad y sana resistente a factores estresantes, por lo que será menor la necesidad de utilizar antibióticos y otros agentes químicos. Asegurar la calidad y seguridad del alimento y de la *Artemia* para evitar la presencia de patógenos con certificación del establecimiento (BPA, BPM y HACCP). Realizar el cribado de las post-larvas para evitar muertes masivas, es esencial que los camarones se examinen durante la etapa larval para asegurar la ausencia de virus y bacterias nocivos. Mantener la calidad del agua, al mantenerla sin restos de caparazones de quitina.
- c) **Engorda:** Instalaciones separadas de las otras, estanques preparados con agua previamente analizada química y microbiológicamente, aplicar fertilizantes de alta calidad en combinación con una fuente de carbono para mantener un balance adecuado de C:N:P. Al elevarse la cantidad de materia orgánica predominaran las bacterias heterotróficas, por ello es conveniente mantener un manejo adecuado de la aireación, pH y de los sedimentos. La aireación debe propagarse en todo el estanque, con niveles de oxígeno mínimos de 4 mg/L, el pH no debe fluctuar ( $\text{pH } 8.0 \pm 0.2$ ) y los sedimentos deben quitarse constantemente para impedir que actúen como fuente de alimento de bacterias patógenas, evitar un ambiente anóxico o con ácido sulfhídrico ambos nocivos

para el camarón. Aún con un buen manejo del ambiente, es importante que se provea de una alimentación adecuada con suplementos que ayuden al sistema inmune a combatir la proliferación de bacterias oportunistas (Corteel y Decamp, 2016). Un buen manejo de la granja de camarones para evitar factores estresantes como la mala calidad del agua, problemas nutricionales o mal manejo en general, incluido un estricto control de la tasa de alimentación, una densidad de la población adecuada, etc., representan estrategias que previenen la presencia de patógenos causantes de infecciones (NACA, 2012).

La SENASICA/SAGARPA, establecen un manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad Alimentaria basado en las recomendaciones de la GAA. Las buenas prácticas de producción acuícolas son procedimientos rutinarios que tienen como objetivo, el alcanzar un acuicultura sustentable para los consumidores en términos de precio, calidad, inocuidad y bajos costos medioambientales (SENASICA, 2003), mientras que las Buenas Prácticas de Manejo (BPM) constituyen un conjunto general de recomendaciones y métodos de cultivo que persiguen incrementar los beneficios económicos y disminuir los costos de operación para las granjas (Boyd *et al.*, 2005).

Las buenas prácticas de cultivo implican los siguientes procedimientos en cuanto a los métodos de control de enfermedades: i) no utilizar agua de poblaciones urbanas para evitar contaminación fecal, ii) realizar estudios físicos, químicos y biológicos del agua de los estanques, iii) no permitir la entrada de animales domésticos, iv) aplicar medidas estrictas de higiene al personal, instalaciones, equipo, materiales y utensilios en la granja, que incluyan pre-limpieza, pre-enjuague, limpieza, enjuague, desinfección, post-enjuague y verificación de limpieza, v) contar con personal capacitado que cumpla con las buenas prácticas de higiene y salud, entre otras que pueden consultarse de manera extensa en el manual (SENASICA, 2003). El OIRSA-OSPESCA constituyen un grupo de expertos en sanidad acuícola, que han aportado un Manual de Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo del Camarón Blanco *Penaeus vannamei*, este incluye una descripción basta para la producción de camarones de calidad y el control de enfermedades (Cuéllar-Anjel, 2010).

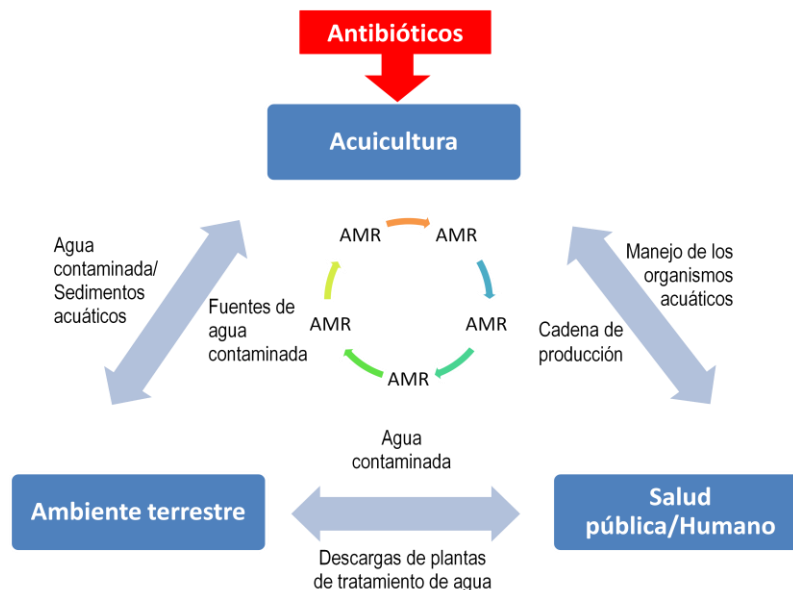
## II.9. PROBLEMÁTICA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA

A pesar de que la acuicultura figura como uno de los sectores crecientes para proveer alimentos de calidad y seguros a la población mundial, su propósito se ve obstaculizado por uno de los mayores problemas que enfrenta, las enfermedades. Los antibióticos han sido utilizados principalmente como terapéuticos, en terapias metafilácticas y como profilácticos para combatir las enfermedades de origen bacteriano en acuicultura (Lightner, 1985; Romero *et al.*, 2012). Al no existir antibióticos específicos para acuicultura, se han aplicado otros de uso veterinario como florfenicol, y de uso humano, principalmente oxitetraciclinas, quinolonas, sulfonamidas, nitrofurazonas, amoxicilina y cloranfenicol (Cabello, 2006), en cantidades mucho mayores a las aplicadas en las granjas de animales terrestres (Romero *et al.*, 2012). Aunado a esto, los peces no son capaces de metabolizar los antibióticos, por lo que gran parte se desecha. Se estima que alrededor de un 75% es excretado y se dispersa al ambiente acuático (Burridgea *et al.*, 2010). El uso indiscriminado, negligente y la poca regulación de antibióticos ha provocado serios conflictos como la resistencia a antimicrobianos (AMR). De acuerdo a la OMS, el uso masivo de antimicrobianos para el control de enfermedades en animales incrementa la presión selectiva en el mundo microbiano y promueve la emergencia de bacterias resistentes capaces de transmitir genes de resistencia antimicrobiana a otras bacterias. De hecho, bacterias de ambientes terrestres y acuáticos comparten determinantes genéticas antimicrobianas (plásmidos, integrones y transposones) asociadas a enfermedades en humanos y animales (Furushita *et al.*, 2003; Cabello *et al.*, 2013; Cabello *et al.*, 2016). Otra de las principales preocupaciones asociada al uso de antibióticos es la peligrosidad de los residuos en el producto ofrecido al consumidor y al ambiente (WHO, 2014).

Algunos autores consideran a los sistemas acuícolas como hotspots para el surgimiento de AMR, ya que es un problema interconectado entre el ambiente acuático, la salud humana y organismos resistentes a antimicrobianos (Baquero *et al.*, 2008; Santos y Ramos, 2018), por las siguientes razones:

- a) El ambiente acuático es idóneo para la dispersión de antibióticos y patógenos bacterianos. La transferencia por recombinación o movilización permite la rápida diseminación de determinantes AMR.
- b) Muchos de los antibióticos persisten como metabolitos activos en los sedimentos para ejercer presión selectiva en la diversidad bacteriana del nuevo ambiente acuático rico en antibióticos.
- c) Las bacterias del ambiente acuático o de la microbiota de los organismos cultivados por acuicultura resistentes a antibióticos de importancia clínica, puedan inclusive transmitirlos a patógenos o bacterias endógenas de humanos,

En la acuicultura, la transferencia de determinantes de resistencia a antibióticos por microorganismos en el ambiente y salud humana se ilustra en la Figura 10.



**Figura 10. Vectores de AMR relacionados con el uso de antibióticos en la acuicultura.**

### II.9.1. ALTERNATIVAS DE CONTROL Y TRATAMIENTO

Las medidas de bioseguridad descritas anteriormente, son ampliamente recomendadas por guías y manuales de carácter internacional y nacional para un adecuado y eficiente manejo de enfermedades. Sin embargo, una vez que se presenta una epizootia de tipo viral se tiene un impacto negativo mayor debido a la ausencia de



tratamientos, llegando a perderse completamente la producción de una zona o granja. Para el caso de las bacterias las medidas correctivas comúnmente aplicadas son el tratamiento con antibióticos y agentes químicos, que aunque reducen las dimensiones de la epizootia, son poco efectivos, costosos e impactan adversamente al ambiente. Actualmente, expertos en el tema se centran en uno de los aspectos de mayor relevancia en la camaronicultura que es el relacionado al cuidado de la salud de los camarones. En este sentido se aconsejan el uso de inmunoestimulantes, probióticos, prebióticos, como alternativas a los antibióticos, estos últimos se mencionarán más adelante.

**Tabla 8. Alternativas de biocontrol y tratamiento en camaronicultura.**

Alternativa	Descripción	Evidencia en la camaronicultura
Inmunoestimulantes	Preparación con células enteras o partes de ellas de microorganismos no viables, productos semipurificados de plantas o microbios, o compuestos químicos sintéticos o naturales, que fortalecen el sistema inmune.	Raa, 1996  Trejo <i>et al.</i> , 2018
Terapia con fagos	Usados principalmente contra infecciones bacterianas durante la etapa larval, juvenil y de engorda.	Karunasaga <i>et al.</i> , 2005
Vacunas	Los camarones poseen sólo un sistema inmune innato, pueden infectarse de virus pero no adquieren la enfermedad (Johansson y Soderhall, 1989). Los agentes antivirales pueden ser: i) partículas enteras inactivadas del virus, ii) subunidades de partículas virales. Se administran por inyección o por vía oral (Flegel y Pasharawipas, 1998).	Namikoshi <i>et al.</i> , 2004

### II.9.2. LA MICROBIOTA INTESTINAL COMO PRIMERA BARRERA DE DEFENSA

En el camarón, el intestino medio, compuesto por la glándula digestiva y el intestino, no está protegido por un exoesqueleto, de manera que representa un sitio propenso a la invasión de patógenos transportados en el agua, alimentos y sedimentos (Mastan y Begum, 2016).

La microbiota intestinal constituye la totalidad de la población microbiana integrada en un sistema complejo y dinámico que se mantiene en equilibrio. La microbiota juega un papel fundamental en los procesos fisiológicos, metabólicos e inmunológicos de su hospedero, con el propósito de mantener la integridad de la

barrera epitelial y promover el desarrollo de la inmunidad en la mucosa. Por ello, el balance en la composición de la microbiota intestinal es un factor determinante que contribuye al bienestar del hospedero y su capacidad de combatir la invasión de patógenos, ya que representa la primer barrera de defensa contra potenciales patógenos. Para incrementar de forma natural la resistencia a infecciones por el hospedero se ha propuesto el uso de probióticos.

## II.10. PROBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA

### II.10.1. DEFINICIÓN DE PROBIÓTICO

La definición de probiótico ha cambiado y ha sido usado de diferentes formas a través del tiempo. Lilly y Stillwell (1965) utilizaron el término por primera vez para referirse a las sustancias secretadas por un protozoo que favorecían el crecimiento de otro organismo. Parker (1974) definió el término sin embargo, la palabra sustancias sugiere una amplia connotación que puede incluir a los antibióticos. Fuller (1989) redefinió la palabra probiótico, enfatizando la importancia de tratarse de células vivas. Las investigaciones posteriores permitieron demostrar la importancia de los probióticos como sistema de defensa, surgiendo varias propuestas de definición, como se muestra en la Tabla 9. La definición consenso para probiótico fue dada por la Organización Mundial de la Salud.

**Tabla 9. Evolución de la definición de probiótico (Reddy *et al.*, 2011).**

Año	Definición	Referencia
1965	Sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos	Lilly y Stillwell
1974	Organismos y sustancias que contribuyen a un balance microbiano intestinal	Parker
1989	Suplemento alimenticio microbiano que afecta benéficamente al hospedero animal al mejorar su balance microbiano intestinal	Fuller
1992	Monocultivo o cultivo mixto de microorganismos viables que, cuando se aplican animales o humanos, afectan benéficamente al hospedero al mejorar las propiedades de la microflora indígena	Havennar y Huis Int Veld
1996	Microorganismos vivos que, al ingerirse en ciertas cantidades, ejercen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica inherente	Schaafsma
1999	Un adyuvante dietético microbiano que afecta de manera benéfica la fisiología del hospedero al modular la inmunidad sistémica y de la mucosa, así como al mejorar el balance nutricional y microbiano en el tracto intestinal	Naidu <i>et al.</i>

2001	Una preparación de, o un producto que contiene, microorganismos viables, definidos, y en suficientes cantidades, que alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del hospedero y como tal, ejercen efectos benéficos a la salud del hospedero	Schrezeimer y de Vrese
2001	Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedero	FAO/OMS reporte

### II.10.2. PROBIÓTICO EN LA ACUICULTURA

La definición de Fuller en acuicultura es reconsiderada, ya que en los sistemas de acuicultura, la interacción entre la microbiota y el hospedero no está restringida al tracto gastrointestinal, sino que existe una constante interacción con el medio ambiente acuático (Verschuere *et al.*, 2000). Por lo tanto, los probióticos para la acuicultura se consideran como: Cultivos microbianos vivos que ejercen un efecto benéfico en el hospedero mediante los beneficios citados en la Tabla 10.

**Tabla 10. Efectos benéficos brindados al hospedero por probióticos en acuicultura.**

Efectos benéficos al hospedero de acuerdo a la definición de probiótico en acuicultura. Verschuere <i>et al.</i> 2000
La modificación de la comunidad microbiana asociada al hospedador y/o su ambiente
El incremento de la eficiencia en la asimilación del alimento y/o de su valor nutritivo
El incremento de la resistencia del hospedero frente a enfermedades (promover un sistema inmune sano)
Mejorar la calidad de su medio ambiente acuático

Con base en esta definición, la Tabla 11 muestra los cultivos microbianos considerados como probióticos en acuicultura.

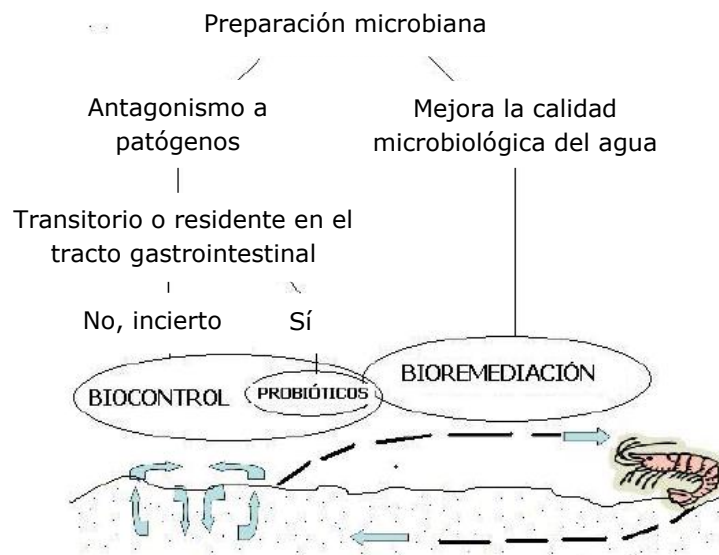
**Tabla 11. Cultivos microbianos que se consideran probióticos de acuerdo a la definición de Verschuere *et al.* (2000).**

Cultivos microbianos que se consideran probióticos aquellos que
Evitan la proliferación de patógenos en el tracto intestinal, y/o en el estanque de cultivo
Ayudan en la digestión óptima de los nutrientes del alimento (mejoren la conversión alimenticia)
Mejoran la calidad microbiológica del agua
Estimulan el sistema inmune del hospedador frente a agentes patógenos

Por todo ello, los tratamientos con probióticos pueden considerarse como se cita en la Tabla 12. Los microorganismos usados en la acuicultura pueden clasificarse según la Figura 11, dentro de los que se encuentran los probióticos.

**Tabla 12. Clasificación de los tratamientos con probióticos en la acuicultura.** Panigrahi y Azad (2007); Muñoz-Atienza (2015).

Métodos de biorremediación y biocontrol: Permiten la introducción de microorganismos que mediante diferentes mecanismos	Reducen, previenen y/o eliminan a los microorganismos patógenos en el ambiente acuícola.
	Reducen la formación de biopelículas causados por hongos y bacterias en las instalaciones.
	Actúan como biorreactores que permiten el reciclaje de nutrientes (amoníaco, nitrógeno, fósforo y sustancias biodegradables) debido a la posibilidad de emplear agua de desecho de las instalaciones para su crecimiento evitando la eutrofización.
Probióticos <i>sensu stricto</i>	Brindan funciones benéficas al hospedero
	Promueven un estado inmunológico adecuado y suficiente para combatir enfermedades causadas por microorganismos patógenos



**Figura 11. Clasificación tentativa de tratamientos microbianos usados en acuicultura.** De acuerdo a la siguiente terminología: El término "probiótico" se reserva a cepas transitorias o residentes en el tracto gastrointestinal, "biocontrol" implica que la cepa es antagonica a patógenos, y "biorremediación" se refiere a la eliminación de residuos contaminantes. Fuente: Gatesoupe (1999).

### II.10.3. SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS

El objetivo final del uso de probióticos es promover o restaurar la homeostasis entre las bacterias que constituyen la microbiota intestinal o de la piel del hospedero, con el fin de brindar funciones benéficas a su salud. Para que un probiótico se considere pueda desempeñar acciones benéficas en pro de la salud de su hospedador, debe cumplir con ciertos requisitos. Debe de i) seleccionarse un microorganismo

proveniente del tracto digestivo de un animal acuático sano; ii) aislarse e identificarse al microorganismo por cultivos selectivos; iii) realizarse estudios *in vitro* (inhibición de patógenos, de patogenicidad, resistencia a las condiciones fisiológicas del hospedero) con las colonias puras de interés; en caso de no existir restricciones de uso de ciertas especies, iv) suplementarse en pequeña o gran escala con el fin de determinar si es viable en procesos industriales y si existe un beneficio real al hospedero (Ekundayo *et al.*, 2014).

#### **II.10.4. CARACTERÍSTICAS DE UN BUEN PROBIÓTICO**

Fuller lista los siguientes características de una bacteria probiótica: i) Debe ser una cepa capaz de ejercer un efecto benéfico en el animal hospedador; ii) Debe ser no patogénica, no toxigénica; iii) Debe presentarse en cantidades adecuadas como células viables; iv) Debe ser capaz de sobrevivir y establecerse en el tracto gastrointestinal; v) Debe ser estable y capaz de permanecer viable en condiciones de almacenamiento y uso (Fuller, 1989).

#### **II.10.5. SEGURIDAD DE PROBIÓTICOS**

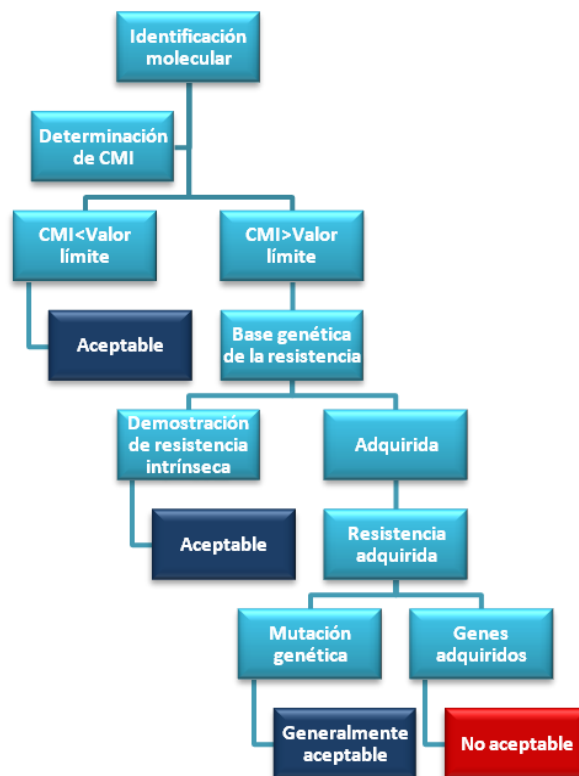
Las principales preocupaciones en relación con la seguridad de los probióticos son: i) ocurrencia de enfermedades, bacteriemias o endocarditis, ii) efectos tóxicos gastrointestinales, iii) transferencia de resistencia a antibióticos en la microbiota intestinal (Syndman, 2008). En general los microorganismos considerados como seguros (GRAS) corresponden a algunos miembros de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Otros géneros usados como probióticos en animales acuáticos son *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y otras bacterias formadoras de esporas, al no ser consideradas como GRAS, la preocupación respecto a estos géneros recae en la presencia de cepas patógenas, en especial de *Enterococcus* (Donohue y Salminen, 1996; FAO/WHO, 2002).

Los probióticos deben probar su seguridad para el consumo humano, como consecuencia de la posible presencia de genes AMR que sean una potencial amenaza a la salud humana. La situación de este problema se complica aún más por la posibilidad de que las bacterias probióticas transfieran determinantes AMR

horizontalmente a patógenos y bacterias endógenas de la microbiota intestinal. La resistencia a los antibióticos en estos microorganismos benéficos, ya sea intrínseca o debido a cualquier mutación, no manifiesta un problema de seguridad en sí mismo. Algunas cepas probióticas con resistencia intrínseca podrían ser útiles *per se* para restaurar la microbiota intestinal después de tratamientos con antibióticos. Sin embargo, los determinantes específicos de resistencia a los antibióticos se encuentran en elementos genéticos móviles, que a menudo se han detectado en géneros probióticos y, por lo tanto, constituyen un reservorio de resistencia para posibles patógenos alimentarios o intestinales. La resistencia a los antibióticos asociada a los plásmidos, es motivo de preocupación ya que puede ser perjudicial debido a la posibilidad de que la resistencia se propague a microorganismos dañinos que habitan en el mismo nicho e incluso a miembros inocuos de la microbiota lo que representa un peligro para la seguridad alimentaria (Sharma et al., 2014).

Garantizar la seguridad de los probióticos antes de lanzarlos al mercado es esencial, para imposibilitar la transferencia de agentes antimicrobianos a otras bacterias y evitar el grave problema de la resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, es imprescindible evaluar cuidadosamente la eficacia de los probióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen bacteriano en el camarón y la seguridad de su uso.

Una manera de contener el problema es determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas probióticas de una serie de antimicrobianos establecidos y siguiendo los protocolos de la EFSA por sus siglas en inglés European Food Safety Authority (EFSA, 2012). También es indispensable realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* en modelos animales para asegurar los estándares de seguridad (Donohue y Salminen, 1996).



**Figura 12. Esquema propuesto para la evaluación de la resistencia antimicrobiana de cepas bacterianas utilizadas como aditivos alimentarios.**

#### II.10.6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE PROBIÓTICOS

Los mecanismos de acción exactos ejercidos por los probióticos no han sido completamente elucidados en todos los casos. Sin embargo, los modos de acción son similares en animales terrestres como de uso acuático. Un aspecto importante es que la cepa candidata sea capaz de alcanzar el sitio donde efectuará su acción probiótica. Los principales mecanismos por lo que los probióticos ejercen su efecto benéfico se enlistan en la Tabla 13.

Tabla 13. Mecanismos de acción de los probióticos por el cual ejercen su efecto benéfico.

<b>1) Exclusión competitiva</b>			
Mecanismo por el cual la microbiota establecida previene o reduce la colonización de microorganismos oportunistas y patógenos (Pérez-Sánchez <i>et al.</i> , 2014).			
Mecanismo	Descripción	Ejemplos o subclasificación	Referencia de evidencias en acuicultura
1.1) Producción de compuestos antimicrobianos	Liberación de sustancias químicas que tienen efecto bacteriostático o bactericida en otras poblaciones microbianas (Verschuere <i>et al.</i> , 2000).	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Producción de antibióticos</li> <li>▪Bacteriocinas</li> <li>▪Sideróforos</li> <li>▪Lisozimas</li> <li>▪Proteasas</li> <li>▪Peróxido de hidrógeno</li> <li>▪Ácidos orgánicos</li> <li>▪Formación de amoniaco</li> <li>▪Diacetilo</li> </ul>	De Giaxa, 1889 Rosenfeld y ZoBell, 1947 Stoffels <i>et al.</i> , 1992 Olsson <i>et al.</i> , 1992 Pilet <i>et al.</i> , 1995 Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996 Ringo y Gatesoupe, 1998 Chythanya <i>et al.</i> , 2002 Nilsson <i>et al.</i> , 2004 Luis-Villaseñor <i>et al.</i> , 2011 Cai <i>et al.</i> , 2019 Tapaamorndech <i>et al.</i> , 2019
1.2) Capacidad de adhesión a mucosas	Habilidad de un probiótico para colonizar el intestino y adherirse a la capa mucosa sin causar daño al hospedero. Un mayor tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal garantiza extender los efectos benéficos (Balcázar <i>et al.</i> , 2006).	i) Forma inespecífica: unión no covalente o por interacciones hidrofóbicas. ii) Forma específica: mediadas por adhesinas que se expresan en la superficie de la pared bacteriana y receptores de las células epiteliales (Verschuere <i>et al.</i> , 2000).	Olsson <i>et al.</i> , 1992 Luis-Villaseñor <i>et al.</i> , 2011
1.3) Competencia por nutrientes	Capacidad de colonizar y aumentar en número, cumpliendo su función como barrera protectora por exclusión competitiva de nutrientes y hábitat (Balcázar <i>et al.</i> , 2006).		Boonthai <i>et al.</i> , 2011 Nimrat <i>et al.</i> , 2011
<b>2) Suministro de nutrientes y/o el favorecimiento de la digestión por enzimas</b>			
Se espera que un probiótico tenga un efecto directo al promover el crecimiento del hospedero ya sea por una mejora en la conversión alimenticia y/o al proveer de nutrientes y vitaminas (Ringo y Gatesoupe, 1998).			
2.1) Al secretar enzimas digestivas, nutrientes y otros factores de crecimiento	Facilitan la asimilación de los nutrientes en su hospedero y en la microbiota intestinal. El crecimiento del camarón depende de la un dieta adecuada de calidad y de su subsecuente óptima digestión y asimilación (Sirvas-Cornejo <i>et al.</i> , 2007).	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Vitaminas</li> <li>▪Ácidos grasos</li> <li>▪Aminoácidos esenciales</li> <li>▪Poliaminas</li> <li>▪Amilasas</li> <li>▪Tripsinas</li> <li>▪Lipasas</li> </ul>	Andlid <i>et al.</i> , 1995 Tovar <i>et al.</i> , 2002 Waché <i>et al.</i> , 2006 Wang, 2007 Wang <i>et al.</i> , 2008 Nimrat <i>et al.</i> , 2012 Zokaeifar <i>et al.</i> , 2012 Cai <i>et al.</i> , 2019



**3) Activación de la respuesta inmune del hospedero**

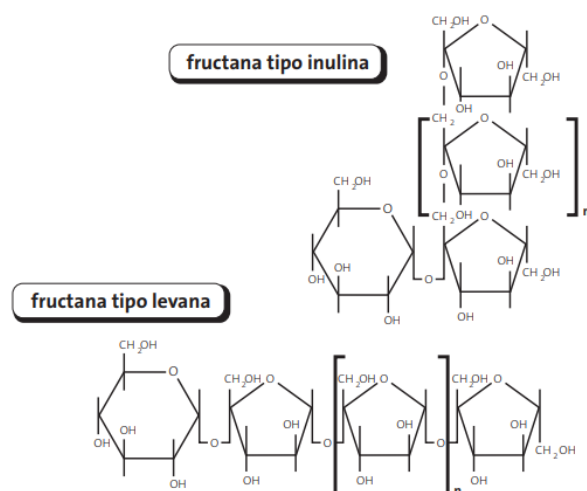
Estudios con probióticos en especies marinas demuestran la capacidad moduladora de la respuesta innata de éstos en su hospedero, debido a la presencia de componentes de la pared celular como lipopolisacáridos, peptidoglicanos y  $\beta$ -glucanos, que desencadenan la respuesta inmune celular y humoral, así como la expresión de genes inmunomoduladores, que facilitan la exclusión de potenciales patógenos y fortalecen la respuesta inmune frente a situaciones de estrés.

Mecanismo	Descripción	Ejemplos o subclasificación	Referencia de evidencias en acuicultura
3.1) Fagocitosis y actividad fagocitaria	Forma de endocitosis en la que partículas de gran tamaño (restos celulares o microorganismos) son ingeridos por vesículas de endocitosis llamadas fagosomas (Neumann <i>et al.</i> , 2001).	Las células fagocitarias (hemocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos) actúan como primera defensa y su rol es limitar la diseminación y crecimiento de organismos nocivos.	Rengpipat <i>et al.</i> , 2000 Chiu <i>et al.</i> , 2007 Liu <i>et al.</i> , 2010 Tepaamorndech <i>et al.</i> , 2019
3.2) Sistema profenoloxidasa (proPO)	Los hemocitos se encargan de la fagocitosis y de la producción de melanina vía profenoloxidasa, un importante componente en la defensa celular (Johanson y Soderhall, 1989).	Los hemocitos pueden ser de tres tipos: ▪Hialinos ▪Semigranulares ▪Granulares Cada uno desencadena diferentes mecanismos de defensa.	Chiu <i>et al.</i> , 2007 Liu <i>et al.</i> , 2010 Wang y Gu, 2010
3.3) Lisozima	La enzima rompe el enlace glicosídico $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina de la pared celular de bacterias Gram positivas, en algunos casos también a Gram negativas por acción de la actividad del complemento (Balcázar <i>et al.</i> , 2006).		Liu <i>et al.</i> , 2010 Cai <i>et al.</i> , 2019 Li <i>et al.</i> , 2019 Wang <i>et al.</i> , 2019
3.4) Citocinas	Modulación de la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, proteínas mediadoras de células inmunes que desencadenan el crecimiento celular, la diferenciación y mecanismos de defensa en el hospedero (Nayak, 2010)	i) Citocinas proinflamatorias:IL-1 $\beta$ , IL-8, el factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) y $\gamma$ -interferón (IFN- $\gamma$ ) ii) Citocinas antiinflamatorias:IL-10 y el factor de crecimiento transformante $\beta$ (TFG- $\beta$ )	Kim y Austin, 2006 Panigrahi <i>et al.</i> , 2007
3.5) Estallido respiratorio	Mecanismo del sistema inmune innato por el que los leucocitos y hemocitos liberan especies reactivas del oxígeno con actividad bactericida (Nayak, 2010).	▪Radicales superóxido ▪Peróxido de hidrógeno	Nikoskelainen <i>et al.</i> , 2003 Wang <i>et al.</i> , 2008 Zhou <i>et al.</i> , 2010 Wang <i>et al.</i> , 2019 Li <i>et al.</i> , 2019

## II.11. PREBIÓTICOS EN LA ACUICULTURA

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que cambian la composición microbiana y/o actividad del tracto gastrointestinal, al estimular la proliferación y/o actividad de bacterias benéficas para mejorar la salud y bienestar de su huésped (Gibson y Roberfroid, 1995). Las respuestas benéficas incluyen, promover el crecimiento y la respuesta inmunológica, aumento del área de absorción intestinal y la mejora de la supervivencia frente a patógenos (González-Félix *et al.*, 2018).

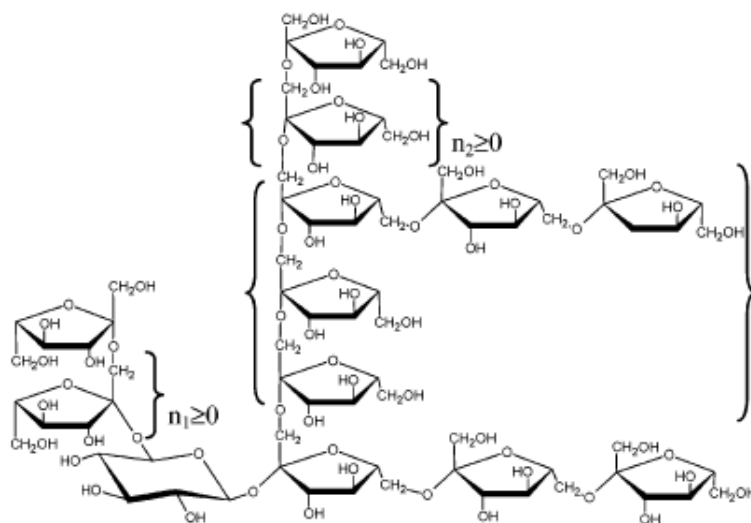
Dentro de este diversos grupo de fibras, se encuentran las fructanas. Las fructanas son polímeros compuestos por unidades de fructosa unidas mediante enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) clasificados como inulina, y por enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6) conocidos como levanas. Existen otro tipo de fructanas que contienen ambos tipos de enlaces y son llamadas fructanas mezcladas, como las graminanas que poseen glucosa terminal, y neofructanas que poseen glucosa interna en sus estructura. Los polímeros de entre 2 y 10 unidades, se denominan fructooligosacáridos (FOS). Una fructana propiamente dicha tiene un grado de polimerización mayor a 10 unidades de fructosa. Las principales fuentes de fructanas, son las plantas, particularmente las raíces de achicoria, la alcachofa, y los agaves, entre otras (Ritsema y Smeekens, 2003).



**Figura 13. Estructura de la inulina y levana.** Fuente: Olvera *et al.* (2007).

Las agavinas son fructanas complejas sumamente ramificadas con enlaces tipo  $\beta(2 \rightarrow 1)$  y  $\beta(2 \rightarrow 6)$ , con un grado de polimerización (GP) de entre 3 y 29, cuya síntesis

ocurre en los agaves, particularmente en la piña o base del tallo (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006).



**Figura 14. Estructura propuesta para las agavinas.** Fuente: Mancilla-Margalli y López (2006).

Los beneficios de las fructanas a la salud humana y otros animales han sido ampliamente estudiadas y conocidas, por lo que se les denomina alimentos funcionales, es decir, sustancias que se saben confieren beneficios a la salud. Las fructanas promueven el crecimiento de bacterias benéficas como lactobacilos y bifidobacterias, de manera que impiden la proliferación de bacterias patógenas (Ritsema, 2003). En acuicultura los prebióticos estudiados han sido la inulina, los fructooligosacáridos (FOS), los manonooligosacáridos (MOS), galactooligosacáridos (GOS), isomaltooligosacáridos (IMOS) y arabinosilanos (AXOS), entre otros (Ringo *et al.*, 2010). Se ha encontrado que permiten el crecimiento de bacterias benéficas, también estimulan el sistema inmune innato al activar la respuesta fagocitaria, la actividad de la lisozima, así como se han demostrado aumentan la resistencia frente a la invasión de patógenos, causando indirectamente el crecimiento de los animales acuáticos (Akhter *et al.*, 2015).

La aplicación de prebióticos con el fin de mejorar la producción de especies marinas, ha sido en su mayoría explorada en peces, sin embargo, dada la importancia comercial que representa la producción de camarón, en específico de *L. vannamei*, explica el creciente interés de evaluar distintos prebióticos para favorecer la producción.

En la Tabla 14 se presentan los estudios realizados utilizando prebióticos en *L. vannamei*.

**Tabla 14. Referencias de estudios sobre el efecto de fructanas en *L. vannamei*.**

Prebiótico	Duración	Dosis	Resultados	Referencia
FOS	6 semanas	0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4 y 8 g/kg	→ Ganancia en peso, → conversión alimenticia, → supervivencia Afecta a la microbiota intestinal	Li <i>et al.</i> , 2007
FOS	8 semanas	0, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 g/kg	↑ Ganancia en peso, ↑ SGR, ↓ FCR Afecta a la microbiota intestinal	Zhou <i>et al.</i> , 2007
FOS	6 semanas	1, 2, 4 g/kg	↑ SGR, ↓ FCR, ↑ Actividad lipasa y amilasa, ↓ GOT y GPT, ↑ actividad SOD, ↑ AKP y ACP, ↑ diversidad microbiana, ↓ patógenos como <i>V. tubiashii</i> , <i>V. parahemolyticus</i> y <i>Photobacterium damsela</i>	Hu <i>et al.</i> , 2018
IMOS	28 días	2 g/kg	→ Microbiota, ↑ respuesta inmune, ↑ resistencia a WSSV	Li <i>et al.</i> , 2009
XOS	60 días	1, 2, 4 y 6 g/kg	↑ Eficiencia alimenticia, → peso final, → ganancia en peso, ↑ supervivencia frente a <i>V. alginolyticus</i> , ↑ tamaño de las vellosidades intestinales, ↑ superficie de absorción	Sun <i>et al.</i> , 2018
MOS	8 semanas	1, 2, 4, 6 y 8 g/kg	↑ ganancia de peso, ↑ SGR, ↑ supervivencia a estrés por amoníaco, ↑ longitud de las microvellosidades intestinales, ↑ actividad PO y SOD	Zhang <i>et al.</i> , 2012
MOS e Inulina		2.5, 5 y 10 g/kg Combinados y solos 28 días	Sólo MOS o Inulina: ↑ SGR, ↑ expresión TLR 1, 2, 3, ↑ STAT, ↑ ALF, ↑ proPO Combinados: ↑ expresión de TLRs, ↑ STAT, ↑ proPO, ↑ ALF, ↑ supervivencia frente a WSSV y <i>V. alginolyticus</i> , ↑ abundancia de <i>Bacillus</i> , <i>Bacteriovorax</i> y <i>Pseudomonas</i>	Li <i>et al.</i> , 2018
GOS	60 días	0.4 %	↑ actividad proteasa, galactosidasa de un probiótico, ↑ diversidad de la microbiota, ↑ bacterias benéficas como <i>L. plantarum</i> , ↓ abundancia de <i>P. damsela</i> y <i>V. harveyi</i>	Huynh <i>et al.</i> , 2019
Inulina	6 semanas	0.5 %	→ crecimiento, → supervivencia frente a <i>V. alginolyticus</i> , ↓ presencia de <i>Vibrio</i> sp. en el tracto digestivo	Ramírez <i>et al.</i> , 2013
Agavinas	60 días	0.4, 8 g/kg	→ crecimiento, → SGR, ↑ conteo total de hemocitos, ↑ supervivencia frente a WSSV, ↓ prevalencia de WSSV al combinarlo con un probiótico	Partida-Arangure <i>et al.</i> , 2012
Agavinas	62 días	1.25, 2.5, 5, y 10 g/kg	→ crecimiento, → cantidad de bacterias ácido lácticas, → supervivencia frente a WSSV, ↑ actividad PO, ↓ prevalencia del WSSV en camarones con baja carga viral	Luna-González <i>et al.</i> , 2012

Nota: FOS (fructooligosacáridos), MOS (mananoligosacáridos), XOS (xilooligosacáridos), IMOS isomaltoligosacáridos, FCR (factor de conversión alimenticia o feed conversion ratio), SGR (specific growth rate =  $(\ln(\text{peso final en g}) - \ln(\text{peso inicial en g}) \times 100) / t$  en días), PO (fenoloxidasa), proPO (profenoloxidasa), SOD (superóxido dismutasa), (TLR) receptores tipo toll, STAT (transductor de señal y activador de la transcripción), ALF (factor del anti-lipopolisacárido (ALF), GPT y GOT (transaminasas), AKP y ACP (enzimas hepáticas), WSSV (enfermedad de la mancha blanca), → (sin cambio), ↑ (aumenta), ↓ (disminuye).

Los beneficios de las agavinas a la microbiota del blanco del Pacífico, no han sido aún reportados. Pero recientemente, la influencia de las agavinas como prebióticos en la microbiota intestinal y del hepatopáncreas de *L. vannamei*, han sido estudiados por el grupo de investigación del Dr. Adrián Ochoa del Instituto de Biotecnología, pese a que aún no existe publicación alguna de los hallazgos.

### III. JUSTIFICACIÓN

Para abordar cuestiones novedosas en la investigación dentro de este campo, es necesaria la colaboración entre diferentes especialistas del área, como bioinformáticos, estadísticos y microbiólogos. Actualmente se llevan a cabo estudios bioinformáticos para conocer la microbiota de *L. vannamei*, con el objetivo principal de solucionar la problemática relativa a las enfermedades que obstaculizan la producción camaronícola en México. Enfermedades como la Necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), causada por *Vibrio parahaemolyticus*, ocasiona grandes pérdidas en la producción de *Litopenaeus vannamei*. El problema actual en relación con el uso de antibióticos en la acuicultura; como una medida para enfrentar las enfermedades, recae en su efecto negativo al ambiente y a la seguridad alimentaria por la adquisición de determinantes de resistencia a antibióticos (AMR). En respuesta al asunto, se ha optado por soluciones alternativas y amigables con el ambiente; por ejemplo el uso de prebióticos y probióticos.

Conocer la firma taxonómica de la microbiota intestinal de *L. vannamei* es una guía para el aislamiento de probióticos novedosos de grupos bacterianos que podrían aplicarse potencialmente a fin de hacer frente a enfermedades de origen bacteriano en *L. vannamei*. Uno de los requisitos para considerar a una cepa bacteriana como probiótico es provenir del organismo a ser destinado; sin embargo, existen escasos esfuerzos para aislar probióticos de la microbiota intestinal endógena de poblaciones sanas del blanco del Pacífico, una de las especies económicamente más importantes cultivadas en México.

Por las razones mencionadas, en este trabajo se propone el aislamiento y caracterización de bacterias con potencial probiótico de la microbiota intestinal de *L. vannamei*, con el propósito de encontrar microorganismos específicos que puedan utilizarse en la alimentación de *L. vannamei* con el fin de evitar el uso de antibióticos.

## IV. HIPÓTESIS

Existen cepas bacterianas en el intestino de especies sanas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con una dieta que contiene fibra, que presentan actividad inhibitoria *in vitro* contra patógenos de importancia en la acuicultura de camarón.

## V. OBJETIVOS

### V.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar microorganismos con potencial probiótico *in vitro* a partir de intestinos de una población sana de camarón de la especie *Litopenaeus vannamei* alimentada con una dieta rica en fibra.

### V.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Aislar cepas BAL y del género *Bifidobacterium* a partir de muestras de intestino de camarón obtenidas de poblaciones alimentadas con fibra, empleando medios de cultivo selectivos.
- b) Realizar un análisis 16S rRNA para la identificación de la población bacteriana presente en medios de cultivo enriquecidos.
- c) Acoplar la metagenómica con técnicas de cultivo para seleccionar microorganismos probióticos específicos del huésped para la acuicultura de *L. vannamei*.
- d) Aislar e identificar cepas con potencial probiótico.
- e) Determinar el tiempo en que las cepas seleccionadas alcanzan la fase estacionaria tardía en condiciones aerobias y anaerobias.
- f) Caracterizar la capacidad de crecimiento de las cepas en diferentes condiciones de pH y salinidad.
- g) Caracterizar de manera preliminar el consumo de agavinas por las cepas seleccionadas.
- h) Determinar el espectro de acción antimicrobiana de las cepas aisladas previamente, frente a microorganismos patógenos causantes de ictiopatologías de relevancia para la acuicultura.

- i) Llevar a cabo una identificación preliminar de los compuestos que ejercen actividad antibacteriana inhibitoria contra las bacterias del objetivo anterior (*V. parahemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*).

## VI. METODOLOGÍA

### VI.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS: AGAVINA COMO FUENTE DE FIBRA.

Se disectaron *in situ* intestinos de la especie de camarón *Litopenaeus vannamei* de 4 meses en condiciones asépticas, de estanques de cultivo semi-intensivo que contenían poblaciones alimentadas dos veces al día con alimento suplementado con agavinas como fuente de fibra (población tratada) en una granja acuícola ubicada al norte del Estado de Sinaloa (latitud 28.4030° - longitud 111.4513°). Los intestinos fueron inmediatamente colocados en glicerol y congelados a -80°C en nitrógeno líquido para ser transportados al laboratorio, donde se almacenaron a -80°C desde julio 2016 hasta su uso.

### VI.2. PREPARACIÓN DE STOCKS BACTERIANOS A PARTIR DE INTESTINOS DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei*

Con el fin de propiciar el crecimiento de las bacterias presentes en los intestinos, se enriquecieron medios de cultivo para contar con stocks bacterianos. Para indagar en el efecto que pudiera ejercer la adición de agavinas al medio en la selección de bacterias con potencial probiótico, se realizaron dos ensayos en condiciones anaerobias.

El ensayo 1 (Intestino 1) se llevo a cabo en medio líquido De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) suplementado con 0.5 g/L-Cisteína-HCl, el ensayo 2 (Intestino 2) en un medio líquido MRS modificado (ver Anexo A).

Para el Intestino 1, en condiciones asépticas una muestra de intestino de una población tratada se empleo para inocular en 10 mL de medio líquido MRS/L-Cisteína-HCl previamente burbujeado con CO<sub>2</sub> durante 8 minutos en la fase líquida y 15 minutos en la interfase para eliminar el oxígeno presente y sellado con tapón de goma y anillo



de aluminio. Para enriquecer la población bacteriana se incubó a 37 °C, 180 rpm por 24 horas. Posteriormente 1 mL de inóculo del medio enriquecido en bacterias se transfirió a 50 mL de medio MRS/L-Cisteína-HCl (inóculo al 2% v/v) en frascos estériles libres de O<sub>2</sub> incubados a 37 °C, 180 rpm para realizar una cinética de crecimiento.

Los cultivos tanto de enriquecimiento de 24 h (0 h), como de la cinética de crecimiento en la fase exponencial tardía (6 h), se centrifugaron a 8000 rpm, 4°C por 7 minutos, el pellet se recuperó y se homogeneizó con 5 mL de MRS/L-Cisteína-HCl y 5 mL de glicerol (1:1 v/v). Finalmente, se colocaron alícuotas de 1 mL de las células resuspendidas en tubos Eppendorf estériles y se conservaron a -80°C.

De la misma forma, se realizó un segundo ensayo con un Intestino 2 con una muestra de intestino de una población tratada procedente del mismo lote de tratamiento que el primer ensayo, en medio líquido MRS modificado, cuyos componentes se listan en el Anexo A, siendo la fuente de carbono una agavina al 2%. Para enriquecer a la población bacteriana de este intestino, se incubó a 37°C, 180 rpm, por 72 horas. Se realizaron los pasos descritos anteriormente, utilizando MRS modificado degasado como medio de cultivo.

### VI.3. ANÁLISIS METAGENÓMICO DEL GEN RIBOSOMAL 16S DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS ENRIQUECIDOS (STOCKS)

Con el fin de conocer la población bacteriana capaz de crecer en un medio favorable para bacterias ácido lácticas, con la idea de aislar aquellas que puedan emplearse como probiótico, se realizó un análisis metagenómico de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA de los stocks bacterianos enriquecidos del Intestino 1.

#### VI.3.1. EXTRACCIÓN DE DNA DE LAS MUESTRAS Y CUANTIFICACIÓN

Del medio de cultivo enriquecido con bacterias intestinales de la muestra del primer ensayo, se tomaron 500 µL a las 24 h de enriquecimiento, así mismo 500 µL a las 6 h del cultivo de cinética de crecimiento y se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm/15 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de solución RNAlater (Sigma),

posteriormente se refrigeraron 24 h ( $\sim 4^{\circ}\text{C}$ ) y luego se congelaron  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su tratamiento. Para la extracción de DNA se utilizó el kit Quick DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, EUA) para ello, se siguió el protocolo indicado según Zymo Research. La integridad del DNA fue confirmada por electroforesis con un gel de agarosa al 0.8%. La concentración de DNA fue determinada usando el fluorómetro Qubit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Las muestras fueron enviadas al Instituto Nacional de Medicina Genómica, Secretaría de Salud (INMEGEN) para su secuenciación en un equipo Illumina MiSeq.

### **VI.3.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS MUESTRAS**

Los reads se generaron usando la longitud de lectura de 400 bases del sistema Ion PGM System, después de un filtrado de calidad (Calidad promedio por ventanas de 4 nucleótidos  $>Q20$ ) y la eliminación de bases ambiguas, se obtuvieron 29,274 lecturas para la muestra a las 24 h y 53,301 para la muestra de la cinética a las 6 h. Después del trimming se obtuvieron 15,669 lecturas para la muestra a las 24 h y 33,344 para la muestra de la cinética a las 6 h que se analizaron usando QIIME (versión 1.9.1). Estas secuencias se agruparon usando UCLUST en unidades taxonómicas operativas (OTU's), basadas en un 97% de similitud de secuencia a través del comando `pick_closed_reference_otus.py` contra la referencia de la colección de secuencias de la base de datos Green Genes (versión 13\_5). La opción de cadena reversa se habilitó, cualquier lectura que no coincidiera con la colección de secuencias de referencia se excluyó de posteriores análisis. Para asignar taxonomía a los OTU's, se proporcionaron asignaciones taxonómicas para la base de datos de referencia de Green Genes y Metaxa2. Se seleccionó el comando de selección de OTU de referencia abierta porque se compararon amplicones superpuestos (sobrelapados con mínimo 6 pb). Se recuperaron para la muestra a las 24 h y la muestra de la cinética a las 6 h, un total de 15,577 y 33,177, respectivamente, de lecturas filtradas de alta calidad. Los OTU's representados por un sola lectura o read (singleton) se descartaron para mantener un estimado realista de  $\alpha$ -diversidad. El reporte de taxonomía con los datos de abundancia relativa se obtuvieron usando el comando `summarize_taxa_through_plots.py`. La secuencia más abundante dentro de un OTU se seleccionó como representativa, se

obtuvo su secuencia con el comando `pick_rep_set.py`. Posteriormente, estas secuencias fueron alineadas contra la base de datos Green Genes (GG) y Metaxa2 con el comando `align_seqs.py` con un mínimo de identidad del 75% y 97%, respectivamente. Para obtener la  $\alpha$ -diversidad se usó el comando `alpha_rarefaction.py` usando la tabla de OTU's sin singletons y el programa QIIME.

#### VI.4. CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN BACTERIANA EN MEDIO MRS MODIFICADO CON AGAVINAS

Para comparar la capacidad de crecimiento de una población bacteriana del Intestino 1, previamente conocida mediante estudios bioinformáticos, en glucosa y en un medio adicionado con agavinas como única fuente de carbono, a partir de un stock de 6 h del Intestino 1 con glucosa como fuente de carbono, se realizaron dos pases sucesivos en medio MRS modificado degasado para eliminar la glucosa presente. Para ello se inocularon 10 mL de MRS modificado degasado con 200  $\mu$ L de un stock de 6 h (preinóculo al 5% v/v), que se incubó a 37° C, a 180 rpm por 24 h. De este preinóculo, se adicionaron 200  $\mu$ L a 10 mL de MRS modificado degasado fresco, que se incubó a 37° C, a 180 rpm por 24 h. Posteriormente, a 50 mL de medio fresco se adicionó 1 mL del preinóculo (inóculo al 2% v/v) para realizar un cinética de crecimiento.

Se prepararon gliceroleros del cultivo luego de 24 h de incubación del segundo pase en medio con agavinas y del cultivo de cinética en la fase logarítmica tardía (6 h) por recuperación del pellet después de centrifugar a 8000 rpm, 4°C por 7 minutos, que se homogeneizó con 5 mL de MRS modificado degasado y 5 mL de glicerol (1:1 v/v). Finalmente, se colocaron alícuotas de 1 mL de las células resuspendidas en tubos Eppendorf estériles y se conservaron a -80°C.

#### VI.5. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

A continuación se describe la metodología empleada para llevar a cabo el aislamiento de bacterias ácido lácticas anaerobias, empleando un medio selectivo MRS que contiene glucosa como fuente de carbono y MRS modificado con agavinas como fuente de carbono.

**VI.5.1. DE UN STOCK CON GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO DEL INTESTINO 1**

Para reactivar los cultivos, se inoculó 1 mL de células de un stock de 6 h del Intestino 1 en un frasco libre de O<sub>2</sub> con 50 mL de medio líquido MRS/L-Cisteína-HCl (preinóculo al 2% v/v), incubándose durante 18 horas, a 37°C y 180 rpm, 2.5 mL de este inóculo se transfirieron a 50 mL de MRS/L-Cisteína-HCl (inóculo al 3% v/v). En la fase exponencial tardía (6 h) se realizaron diluciones seriadas del cultivo hasta 10<sup>5</sup>. Posteriormente se sembraron 500 µL de cada dilución en medios sólidos con 10 mL de agar MRS/L-Cisteína-HCl previamente burbujeados con CO<sub>2</sub> y en frascos libres de O<sub>2</sub> para promover condiciones de anaerobiosis. Los frascos fueron incubados durante 24-48 horas a 37 °C hasta observar el crecimiento de colonias.

**VI.5.2. DE UN STOCK CON AGAVINAS COMO FUENTE DE CARBONO DEL INTESTINO 1**

Para reactivar los cultivos, se inoculó 1 mL de células de un stock de 6 h de incubación del segundo pase en medio con agavinas del Intestino 1 en un frasco libre de O<sub>2</sub> con 50 mL de medio líquido MRS modificado degasado (preinóculo al 2% v/v), incubándose durante 18 horas, a 37°C y 180 rpm, 2.5 mL de este inóculo se transfirieron a 50 mL de MRS modificado (inóculo al 3% v/v). En la fase exponencial tardía (6 h) se realizaron diluciones seriadas del cultivo hasta 10<sup>5</sup>. Posteriormente se sembraron 500 µL de cada dilución en 10 mL de agar MRS modificado previamente burbujeado con CO<sub>2</sub> y en frascos libres de O<sub>2</sub>. Los frascos fueron incubados durante 48 horas a 37 °C hasta observar el crecimiento de colonias.

**VI.5.3. DE UN STOCK CON AGAVINAS COMO FUENTE DE CARBONO DEL INTESTINO 2**

Para reactivar los cultivos, se inoculó 1 mL de células de un stock de 72 h del Intestino 2 en medio con agavinas en un frasco libre de O<sub>2</sub> con 50 mL de medio líquido MRS modificado degasado (preinóculo al 2% v/v), incubándose durante 18 horas, a 37°C y 180 rpm, 2.5 mL de este inóculo se transfirieron a 50 mL de MRS modificado (inóculo al 3% v/v). En la fase exponencial tardía (10 h) se realizaron diluciones seriadas hasta 10<sup>5</sup>. Posteriormente se sembraron 500 µL de cada dilución en 10 mL de

agar MRS modificado previamente burbujeado con CO<sub>2</sub> y en frascos libres de O<sub>2</sub>. Los mismos fueron incubados durante 48 horas a 37 °C hasta observar el crecimiento de colonias.

Se seleccionaron colonias por su morfología la cual se caracteriza para las bacterias ácido lácticas por ser colonias blancas, redondas y cremosas; se les realizó la tinción de gram para su posterior análisis al microscopio y con base a la morfología observada la cual se caracteriza por ser cocos o bacilos gram positivos, no esporulados, inmóviles.

Las colonias seleccionadas se cultivaron en frascos con agar MRS o MRS modificado, incubados durante 24-48 h a 37°C. Se seleccionaron colonias por su morfología antes mencionada y se les realizó tinción de gram para su posterior análisis al microscopio en donde se seleccionaron por su morfología. De esta manera, se procedió a realizar 5 resiembras sucesivas en condiciones de anaerobiosis, verificando su uniformidad al microscopio hasta obtener colonias puras.

#### VI.6. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Las colonias puras se inocularon en tubos libres de O<sub>2</sub> con 10 mL de medio MRS/L-Cisteína-HCl o MRS modificado y se incubaron a 37 °C, 180 rpm, 12 horas para su adaptación, se re-inocularon 2.5 mL del cultivo en frascos libres de O<sub>2</sub> que contenían 50 mL de MRS/L-Cisteína-HCl o MRS modificado incubándolos a 37 °C, 200 rpm, 6-8 h para su crecimiento. Finalmente, se recolectaron las células de cada aislado por centrifugación a 8000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. El pellet se resuspendió en medio MRS-L-Cisteína-HCl/Glicerol (1:1 v/v) o MRS modificado/Glicerol (1:1 v/v) y se realizaron alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf estériles que se conservaron a -80 °C.

#### VI.7. CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LA CEPAS PATÓGENAS

Las cepas de *Vibrio parahemolyticus* NCTC E 1093, *Vibrio harveyi* 89375 y *Vibrio alginolyticus* 98393 fueron donadas amablemente por el Dr. Armando Navarro Ocaña del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM. La preparación de stocks bacterianos se realizó de la siguiente manera: a partir de tubos que contenían al microorganismo crecido en agar CASOY (Agar de soya tripticaseína) con NaCl al 1%

pH 8.2, se tomó una asada y se cultivo en 100 mL de medio líquido BHI (DIFCO™) a 37°C, a 200 rpm, 18 h. Se centrifugó el cultivo a 8,000 rpm, a 4°C, durante 15 min, se resuspendió el pellet en 5 mL de medio BHI fresco y 5 mL de glicerol estéril al 100%, se realizaron alícuotas de 1mL colocándose en tubos Eppendorf estériles. Las cepas se conservaron a -80°C. Cuando se requirió, las cepas fueron descongeladas y cultivadas en BHI, incubadas a 37°C.

## VI.8. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

### VI.8.1. EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSOMAL

A partir de un cultivo de las cepas reactivadas en medio líquido MRS (10 mL), incubadas durante 12 h, se siguió el protocolo de extracción de ADN del kit UltraClean® Microbial DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA).

La cuantificación de la concentración de DNA obtenido para cada cepa, se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para verificar la calidad e integridad del DNA extraído se realizó un gel de agarosa al 0.8% (p/v) teñido con bromuro de etidio (0.05%).

### VI.8.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S

El rDNA 16S de cada cepa fue amplificado por PCR usando el par de primers fD1 y rD1 (Weisburg, *et al.*, 1991) que permiten obtener un producto amplificado de 1.5 kb.

**Tabla 15. Secuencia nucleotídica de los primers utilizados para la amplificación del gen ribosomal 16S.**

Primer	Secuencia
fD1	5'd(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)3'
rD1	5'd(AAGGAGGTGATCCAGCC)3'

La mezcla de reacción PCR contenía los reactivos y las concentraciones indicadas en la Tabla 16 y 17 para un volumen final de 50 µL, utilizando la polimerasa de *Thermus aquaticus* recombinante (Taq DNA Polimerasa, Thermo Scientific) para la cepa 2 y 4; y la polimerasa de *Pirococcus furiosus* (Pfu DNA Polimerasa, Thermo Scientific) para la cepa I3G e I3A. Las reacciones se llevaron a cabo en un

termociclador TECHNE Touchgene Gradient, bajo las condiciones descritas en las Tablas 18 y 19.

**Tabla 16. Concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR con la enzima Taq DNA polimerasa recombinante.**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer Taq con KCl	10x	1X	5 $\mu\text{L}$
dNTP mix (Roche Diagnostics)	10 mM	0.22 $\mu\text{M}$	1.1 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.65 mM	3.3 $\mu\text{L}$
Primer Forward (fD1)	291.39 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0.17 $\mu\text{L}$
Primer Reverse (rD1)	331.28 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0.15 $\mu\text{L}$
Enzima Taq DNA polimerasa recombinante	5 U/ $\mu\text{L}$	2.5 U/ $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$
DNA	X ng/reacción	50 ng/reacción	X $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	-	-	c.b.p. 50 $\mu\text{L}$

**Tabla 17. Concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR con la enzima Pfu DNA polimerasa.**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer Pfu con MgSO <sub>4</sub>	10x	1X	5 $\mu\text{L}$
dNTP mix (Roche Diagnostics)	10 mM	0.20 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
Primer Forward (fD1)	291.39 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0.17 $\mu\text{L}$
Primer Reverse (rD1)	331.28 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0.15 $\mu\text{L}$
Enzima Pfu	2.5 U/ $\mu\text{L}$	2.5 U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
DNA	X ng/reacción	50 ng/reacción	X $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	-	-	c.b.p. 50 $\mu\text{L}$

**Tabla 18. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen ribosomal 16S con la enzima la Taq DNA polimerasa.**

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3	1
Desnaturalización	95	0.5	30
Alineamiento	55	0.5	
Extensión	72	1.5	
Extensión final	72	5	1

**Tabla 19. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen ribosomal 16S con la enzima Pfu DNA polimerasa.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3	1
Desnaturalización	95	0.5	30
Alineamiento	60	0.5	
Extensión	72	3	
Extensión final	72	10	1

### VI.8.3. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR amplificados se purificaron utilizando el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se cuantificó la concentración de los amplicones puros con el equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Los productos purificados se utilizaron como molde para las reacciones de secuenciación llevadas a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

### VI.8.4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias resultantes se ensamblaron con el programa DNA Baser Assembler (versión 5.15.0) y se analizaron en la base de datos no redundante del National Center of Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) realizando un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para conocer la identidad de las secuencias por alineamientos locales de la secuencia problema. Para ello se utilizó la base de datos 16S ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea).

## VI.9. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y MEDICIÓN DE pH

Se prepararon preinóculos partiendo de las cepas I3G e I3A conservadas en glicerol añadiendo 100 µL en 10 mL de medio MRS (preinóculo al 1% v/v), que se incubaron a 37°C, a 200 rpm, 18 h, en aerobiosis y anaerobiosis. Para realizar la cinética de crecimiento se tomaron 2 mL del preinóculo y se añadieron a matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio fresco MRS (inóculo al 4% v/v), para la cinética en aerobiosis; para la cinética en anaerobiosis se añadieron 2 mL del preinóculo en frascos que contenían 50 mL de MRS/L-Cisteína-HCl degasado (inóculo al 4% v/v). Se



tomaron alícuotas de 2 mL en cada tiempo, bajo las siguientes condiciones de incubación: 37°C, 200 rpm. Se determinó la turbidez del medio a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) en un espectrofotómetro Perkin-Elmer y el pH con un potenciómetro. El aumento en la densidad óptica del medio se correlaciona directamente con el crecimiento del microorganismo.

#### VI.10. CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y SALINIDAD

Se evaluó el crecimiento a diferentes condiciones de salinidad y pH tanto en medio MRS como MRS modificado en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis para las cepas I3G e I3A.

Para ello, se reactivaron las cepas a partir de los glicerolos, añadiendo 100  $\mu$ L del stock de cultivo en 10 mL de medio MRS y MRS modificado e incubando a 37°C, 18 h. De este preinóculo se añadió 1 mL en 50 mL de medio fresco y se incubó a 37°C, 6-8 h para su crecimiento. Para realizar las pruebas se prepararon tubos con 10 mL de medio MRS y MRS modificado a los que se les ajustó el pH a 4, 5, 6, 7 y 8; así como tubos con medio MRS y MRS modificado adicionados con NaCl al 6.5%, 10% y 12%. En cada tubo se añadieron 100  $\mu$ L de inóculo, se incubaron a 37°C durante 24 h; al cabo de ese tiempo, se observó el crecimiento de las cepas en cada condición química.

#### VI.11. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CONSUMO DE AGAVINAS

Para examinar el crecimiento de las cepas I3G e I3A en agavinas se inocularon 10 mL de medio MRS modificado con 100  $\mu$ L de glicerol, se incubaron en condiciones aerobias y anaerobias en estático durante 24 h. Luego se midió el pH y la  $DO_{600nm}$ . Como control se utilizó el medio MRS base sin agavinas añadidas. Al término de la incubación, se tomó una muestra de 1 mL la cual se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min, luego el sobrenadante se microfiltró con una membrana de 0.22  $\mu$ m Millipore para eliminar las bacterias.

Al observar que las cepas 1 y 2 poseían la capacidad de crecer en agavinas como fuente de carbono, se realizó cromatografía en capa fina con el fin de conocer el perfil de degradación de agavinas si es que hubiese alguno. Se empleó como fase estacionaria una placa de aluminio con sílica gel 60 (Merck) y como fase móvil una mezcla (v/v) de etanol, butanol y H<sub>2</sub>O (15:9:6). Los estándares de carbohidratos utilizados para la técnica fueron los siguientes:

**Tabla 20. Estándares de carbohidratos para cromatografía por placa fina.**

Estándar de carbohidratos
Fructosa:Glucosa:Sacarosa (10 g/L)+ Inulina de Leuconostoc (4 g/L)
FOS ORAFIT P95 (5 g/L)

Se hicieron puntos equidistantes de los estándares de carbohidratos y de los sobrenadantes centrifugados y microfiltrados de las muestras, colocando 1 µL de estos en la placa. Luego de secar los puntos, la placa se colocó en una cámara horizontal y se dejó saturar con 10 mL de la fase móvil. Posterior a la elución de la placa, el disolvente residual se evaporó a temperatura ambiente. Las placas fueron eluidas dos veces. Se asperjó con el agente revelador en una cámara de extracción, siendo éste una mezcla de etanol, difenilamina, ácido sulfúrico, el excedente se evaporó a temperatura ambiente. La placa se secó con una secadora a 80 °C hasta obtener el revelado de los azúcares.

Para establecer un perfil de degradación de agavinas por parte de las cepas, se realizó un análisis de los sobrenadantes tratados mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD). Para identificar oligosacáridos liberados por acción microbiana, se inyectaron 2 µL de las muestras (diluidas 1:1) de los cultivos de 24 h previamente centrifugadas y microfiltradas en un equipo DIONEX, equipado con un detector electroquímico (ED50 Dionex) empleando una columna CarboPac PA-200 (2x250 mm). La columna fue equilibrada a 30°C con 150 mM de NaOH a un flujo de 0.5 mL/min. Se eluyó con un gradiente de acetato de sodio (5 mM por 5 min, 2-230 mM de 5 a 95 min).

## VI.12. CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

### VI.12.1. PRUEBAS INDIRECTAS DE GOTA SOBRE LA SUPERFICIE DE AGAR O SOAT (DEL INGLÉS SPOT ON AGAR TEST)

Para evaluar la capacidad inhibitoria de las cepas aisladas contra microorganismos reportados como patógenos en los acuicultivos de camarón del género *Vibrio*, se realizaron test SOAT. Con el fin de conocer si la capacidad inhibitoria se favorecía en un medio adicionado con agavinas como fuente de carbono, se realizaron dos pruebas: una en medio MRS como control y otra en MRS modificado. Se prepararon placas con 20 mL de MRS (DIFCO™) con agar al 1.5% y placas con 20 mL de MRS modificado con agar al 1.5% las cuales se solidificaron en campana de flujo laminar.

Se reactivaron las cepas I3G e I3A inoculando 100 µL de los gliceroles en 10 mL de medio MRS y MRS modificado, incubándose a 37°C, 200 rpm, 18 h; al término se inocularon 50 mL de medio fresco con 2 mL de preinóculo, se incubó a 37°C, 200 rpm, durante 5.5 h, para finalmente estriar por agotamiento placas con 20 mL de agar MRS y MRS modificado, incubadas a 37°C, durante 18 h. A partir de estas placas se tomaron por asada 3-5 colonias y se inocularon 5 mL de medio MRS y MRS modificado (inóculo), incubándose a 37°C, 200 rpm, durante 16-18 h.

En el experimento control, se inocularon puntos equidistantes por cuadruplicado con 10 µL del inóculo cuya  $DO_{600nm}$  fue ajustada a 1, incubándose a 37°C durante 18 h. El césped de crecimiento resultante fue cubierto con 5 mL de agar BHI suave (0.75%) que contenía 500 µL de un cultivo de bacterias patógenas ajustado a una densidad óptica  $DO_{600nm} = 0.18-0.2$ . Las placas se incubaron a 37°C, durante 18-24 h y se midió el halo de inhibición producido con una regla milimétrica. Los experimentos control se realizaron con el medio de cultivo sin inocular.

En el experimento con agavinas, se realizó el método seguido para el experimento control, con la diferencia de realizar la incubación del césped bacteriano de *E. faecium* a diferentes tiempos, con el fin de conocer si la producción de compuestos antimicrobianos se favorecía en cierto tiempo de crecimiento, ya que en experimentos anteriores en medio con agavinas como fuente de carbono, no se observó inhibición

alguna. Los tiempos a probar fueron 12, 18, 24 y 48 h. En cada placa se inocularon por duplicado 10  $\mu$ L del inóculo de cada cepa.

Para esta prueba se utilizaron los patógenos *Vibrio parahaemolyticus* NCTC E 1093, *Vibrio harveyi* 89375 y *Vibrio alginolyticus* 98393 donados por el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.

#### **VI.12.2. OBTENCIÓN DE LOS SOBRENADANTES**

Con el fin de llevar a cabo una identificación preliminar de los compuestos que ejercen actividad antibacteriana contra las bacterias mencionadas anteriormente, se contó con el apoyo de la Dra. Maricarmen Quirasco y del Q. A. Alfredo Esquivel, del laboratorio 312 del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química, UNAM.

Se reactivaron las cepas I3G e I3A inoculando 100  $\mu$ L de los gliceroles en 10 mL de medio MRS (DIFCO™) incubándose a 37°C, 200 rpm, 18 h; al término se inocularon 50 mL de medio fresco con 2 mL de preinóculo, se incubó a 37°C, 200 rpm, durante 5.5 h, para finalmente estriar por agotamiento placas con 20 mL de agar MRS (DIFCO™). A partir de las placas, se tomaron 3 colonias de cada cepa y se inocularon 5 mL de MRS (OXOID), se dejó incubar a 37°C, 200 rpm durante 18 h. Se inocularon 100 mL de MRS (OXOID) con 4 mL (inóculo al 4% (v/v)) del preinóculo y se incubó a 37°C, 200 rpm durante 5.5 h, tiempo en que alcanza la fase logarítmica tardía y estacionaria temprana y se ha reportado alcanza la mayor producción de proteínas con actividad antimicrobiana. Posteriormente las células se centrifugaron a 8,000 rpm, 15 minutos a 4°C (Biofuge Primo R). Los sobrenadantes se neutralizaron con NaOH al 50% hasta un pH de 7.0, posteriormente se microfiltraron con una membrana de 0.22  $\mu$ m en un equipo Millipore; se conservaron a 4°C. Los sobrenadantes tratados se utilizaron para los zimogramas (se conservó 1 mL de cada muestra) y además se concentraron por diferentes técnicas.

### **VI.12.3. CONCENTRACIÓN DE LOS SOBRENADANTES**

#### **VI.12.3.1. Liofilización**

Los sobrenadantes tratados (25 mL) se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se liofilizaron en el equipo LABCONCO Freezar Dry System, el sobrenadante liofilizado se resuspendió en 2 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) 100 mM pH 7.

#### **VI.12.3.2. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%**

A 75 mL de los sobrenadantes tratados, se agregó sulfato de amonio poco a poco hasta una saturación del 80%, se colocó en agitación constante por 2 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugaron las muestras a 9820 g durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. Para eliminar el sulfato de amonio aún presente en las muestras, se dializaron con una membrana de tamaño de corte de 1 kDa en agua destilada con agitación constante durante 18 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , realizando un recambio de agua destilada. Las muestras se concentraron en un volumen de 1 mL y se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **VI.12.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA**

A los sobrenadantes tratados, liofilizados y precipitados con sulfato de amonio, se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford de acuerdo a las recomendaciones del proveedor del reactivo (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BioRad Laboratories). Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA de 0-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se realizaron las mediciones en el lector de placas Epoch de Biotex, que es un sistema espectrofotométrico de microvolúmenes que permite cuantificar proteínas con el método de Bradford a 595 nm. Para ello, en cada pozo de una microplaca (Costar) se adicionaron 160  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se agregaron 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford (BioRad), se homogenizó la mezcla evitando la formación de burbujas de aire; se colocó como blanco de reacción agua destilada, se dejó reposar por 5 minutos para que se estabilizara el color generado y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

El método se basa en la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe (aminoácidos aromáticos y básicos) de las

proteínas presentes en la muestra, generando un cambio de color de roja a azul en un máximo de absorción de 465 a 595 nm, midiendo el incremento de la absorción a 595 nm.

### VI.13. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y ZIMOGRAFÍA

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% de acuerdo al método de Laemmli (1970) y de zimografía para la identificación y determinación de los pesos moleculares de los compuestos de naturaleza proteínica, con los reactivos de la Tabla 21.

**Tabla 21. Reactivos y cantidades utilizados para la preparación de los geles SDS-PAGE y zimogramas.** SDS: Dodecil sulfato de sodio, APS: Persulfato de amonio, TEMED: Tetrametiletilendiamina.

Gel concentrador [Acrilamida] = 4%		Gel separador [Acrilamida] = 12%	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Agua desionizada	1.81 mL	Agua desionizada	2.9 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	250 $\mu$ L	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.12 mL
Acrilamida	415 $\mu$ L	Acrilamida	3.4 mL
SDS 10%	25 $\mu$ L	SDS 10%	85 $\mu$ L
APS 10%	30 $\mu$ L	APS 10%	70 $\mu$ L
TEMED	3 $\mu$ L	TEMED	7 $\mu$ L

Las muestras sin concentrar y concentradas se mezclaron con el amortiguador de carga (4X). Para evitar pérdida de actividad de las proteínas se omitió añadir  $\beta$ -mercaptoetanol y calentar las muestras. Cada gel se cargó con 10  $\mu$ L de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, BioRad) y 35  $\mu$ L de la muestra. Se utilizó un equipo Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module (BioRad Laboratories).

Los geles se corrieron con un potencial de 80 V por 30 minutos, después a 120 V durante 2 h a temperatura de refrigeración (4°C).

Las proteínas se tiñeron siguiendo la metodología de tinción de Coomassie y de plata descrita en el Anexo A. Las imágenes se obtuvieron mediante el uso de un fotodocumentador de geles (GelDoc, BioRad) y se calcularon los pesos moleculares aproximados de las proteínas.

Los zimogramas contenían células embebidas de los microorganismos blanco cuyo crecimiento fue inhibido por las pruebas de difusión en agar. Para estos, se utilizaron los mismos reactivos y cantidades descritas en la Tabla 21, con las mismas condiciones electroforéticas, a excepción de adicionar a los geles células de los microorganismos blanco muertas por calor húmedo (121°C, 15 min) con una densidad óptica de 8 a 10. Después de correr los geles se lavaron tres veces con agua destilada e inmediatamente se incubaron a 37°C a 50 rpm durante 18-24 h en una solución renaturalizante (Tris-HCl 100 mM pH 8 y Tritón al 1% (v/v)), para permitir a las proteínas recobrar su plegamiento nativo. Al finalizar la incubación, se lavaron los geles de dos a tres veces con agua destilada y para aumentar el contraste se tiñeron con una solución de azul de metileno al 0.1% v/v en KOH al 0.01% v/v durante 20 minutos, finalmente se destiñeron con lavados constantes de agua destilada, hasta observar la aparición de las bandas de actividad.

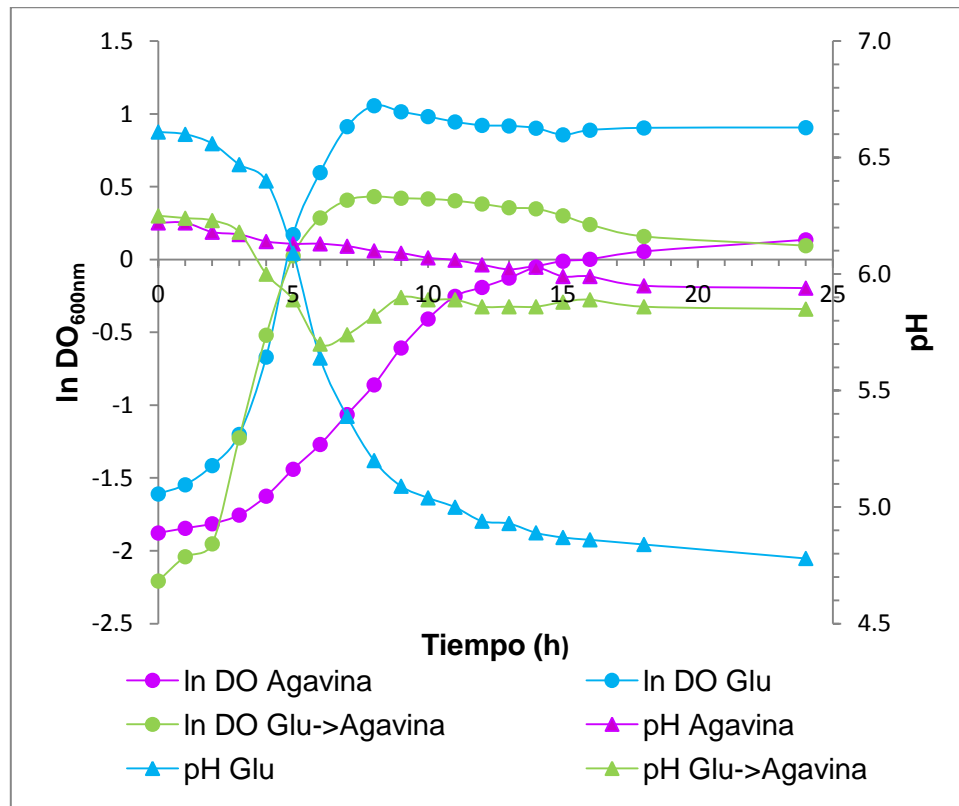
La actividad lítica se detectó por la presencia de una banda(s) translúcida(s) sobre un fondo opaco de color azul. El perfil electroforético se comparó utilizando el programa Image Lab del equipo Gel Doc (BioRad) para conocer el peso molecular aproximado de la(s) banda(s) con actividad lítica contra los microorganismos blanco.

La descripción de la preparación de los reactivos utilizados para estas técnicas se encuentra en el Anexo A.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## VII.1. ENRIQUECIMIENTO BACTERIANO Y SUS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Con el propósito de obtener stocks enriquecidos de las bacterias endógenas de la microbiota intestinal de las muestras de *L. vannamei*, se procedió a utilizar un medio MRS de con el propósito general de aislar BAL y *Bifidobacterium*, a partir de los dos intestinos muestra. Una vez que se contaba con los stocks, se procedió a realizar una cinética de crecimiento de la comunidad bacteriana intestinal para observar su comportamiento y definir los tiempos de aislamiento adecuado. Las cinéticas de crecimiento se presentan en las Figura 15.



**Figura 15. Comparación de cinéticas de crecimiento de poblaciones microbianas provenientes de dos intestinos diferentes (Intestino 1 e Intestino 2) con diferentes fuentes de carbono. Azul:** Cinética de crecimiento de la población microbiana del Intestino 1 en medio con glucosa. **Verde:** Cinética de crecimiento de la población microbiana del Intestino 1 en medio con agavinas. **Púrpura:** Cinética de crecimiento de la población microbiana del Intestino 2 en medio con glucosa.



Puede observarse que las bacterias presentes en el Intestino 1 crecen mejor en glucosa que en agavinas. Igualmente, la comunidad bacteriana presente en el Intestino 2 con agavinas como única fuente de carbono, crece muy poco a comparación de la comunidad bacteriana del Intestino 1 crecida tanto en glucosa como en agavinas. La disminución del pH en los curvas de crecimiento es mayor en glucosa que en medio con agavinas. En resumen la comunidad bacteriana del Intestino 1 crece mejor en glucosa que la población bacteriana del Intestino 2 crecida en agavinas. Lo que es un tanto sorprendente ya que los intestinos vienen del mismo lote de camarones.

## VII.2. ENRIQUECIMIENTO BACTERIANO Y USO DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN RIBOSOMAL 16S PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La secuenciación del gen 16S rRNA como huella biológica para identificar las especies bacterianas en muestras como la microbiota de camarón, presenta algunas limitaciones: i) algunas bacterias tienen múltiples números de copia del gen lo que causa sobre-representación artificial de la diversidad, ii) entre especies de un mismo género no existen diferencias en el gen 16S rRNA, iii) existen sesgos en la selección y diseño de primers y durante el proceso de amplificación, y iv) la presencia de microheterogeneidad de secuencias entre cepas relacionadas (Escobar-Zepeda *et al.*, 2018). Cuando lo que se busca es conocer la microbiota intestinal, es una opción más adecuada el amplificar y secuenciar las regiones hipervariables V3 y V4. Por esta razón se procedió a secuenciar las regiones V3 y V4 de los microorganismos presentes en medios de cultivo del Intestino 1, por la técnica de secuenciación del gen 16s rRNA como se señala en la Metodología.

A continuación se presentan los resultados a nivel género de la metagenómica aplicada a los cultivos enriquecidos del Intestino 1 a las 0 h en la Figura 16, y 6 h de cultivo en la Figura 17 con la base de datos Green Genes (GG).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

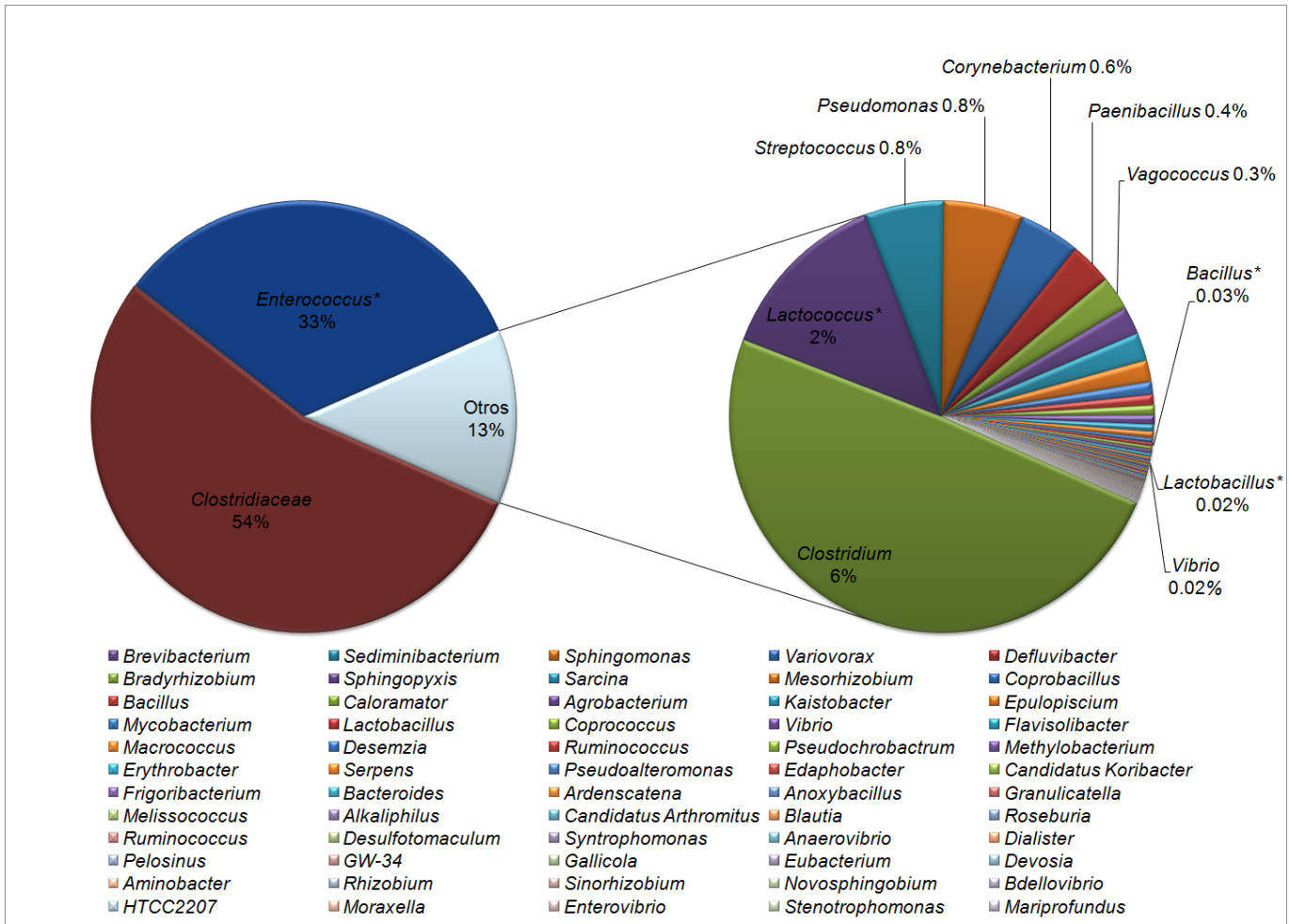


Figura 16. Asignación taxonómica de géneros de microorganismos presentes en el medio enriquecido a las 0 h de cultivo en el Intestino 1 con la base de datos GG. (\*) Bacterias potenciales probióticas.

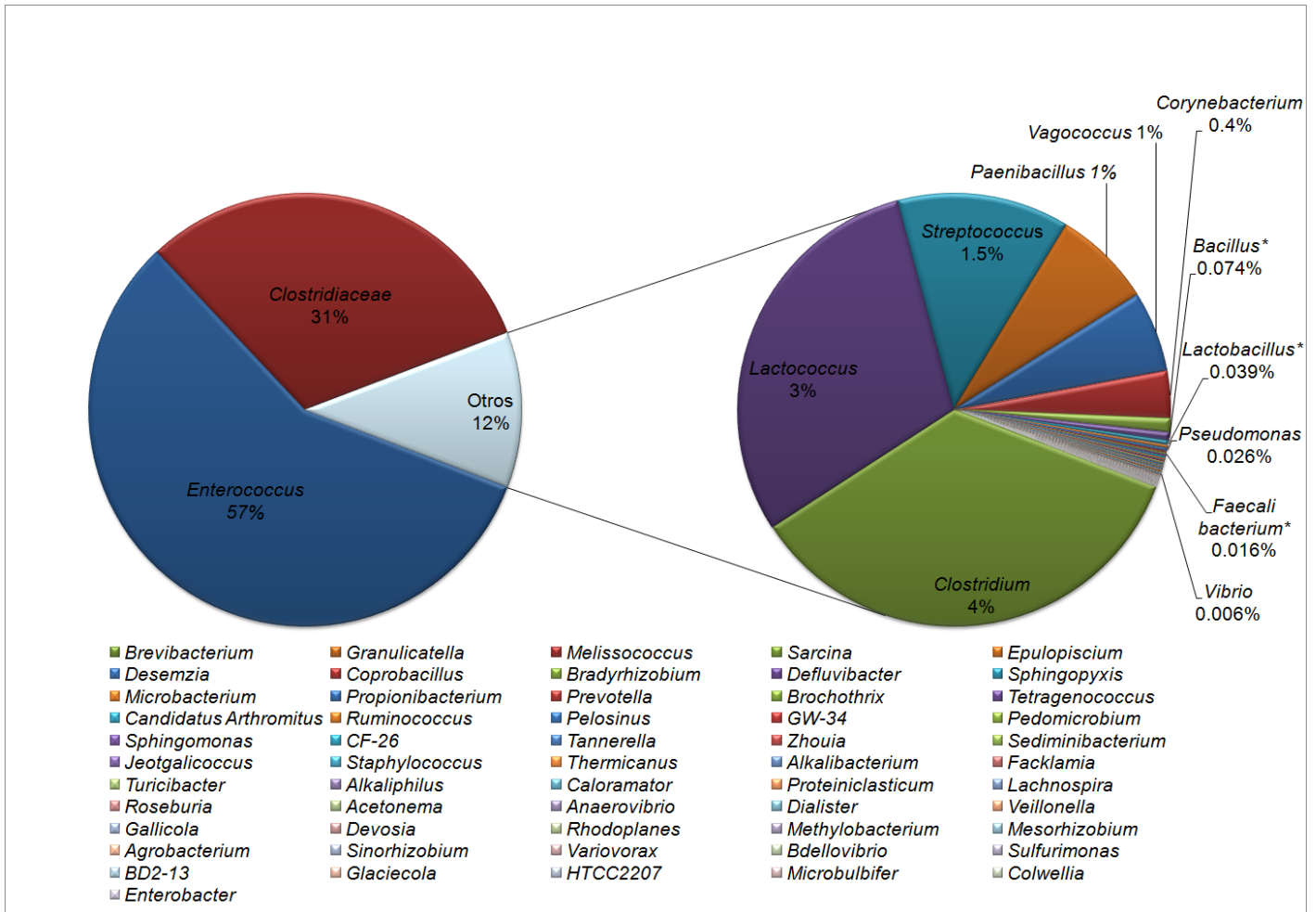


Figura 17. Asignación taxonómica de géneros de microorganismos presentes en el medio enriquecido a las 6 h de cultivo con la base de datos GG. (\*) Bacterias potenciales probióticas.

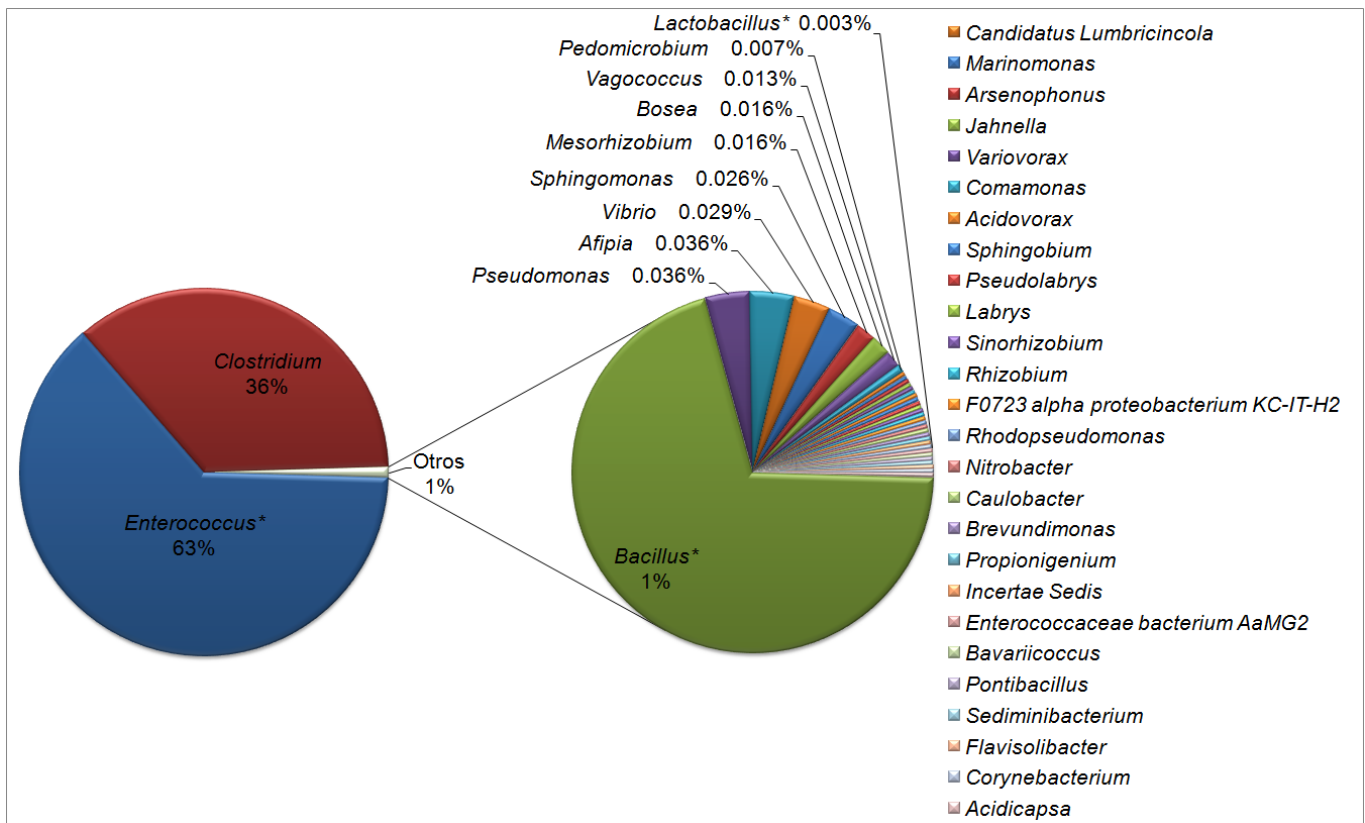
Si consideramos el cultivo enriquecido como una reproducción *in vitro* de lo que sucede en el intestino de camarón con su comunidad microbiana, es interesante observar que se favorece el crecimiento de bacterias probióticas potenciales como *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Bacillus*, que en total representan cerca del 61.0%, en tanto que el crecimiento de bacterias consideradas patógenas disminuye en el caso de *Vibrio*, *Anaerovibrio*, *Clostridium* y *Pseudomonas*, o inclusive desaparecen, como *Enterovibrio*. En relación con la disminución de *Vibrio* luego de 6 h de cultivo, puede ser debido a i) que la competencia con otras bacterias por los nutrientes del medio no favoreció su crecimiento, ii) la producción de compuestos antimicrobianos por bacterias que inhibieron su crecimiento, iii) las condiciones anaerobias y/o el pH desfavorables para su crecimiento.

Debido a la limitación en la profundidad de la secuenciación al solo emplearse las regiones V3 y V4, no fue posible identificar el género de la familia *Clostridiaceae* que disminuye visiblemente al pasar el tiempo. Esto puede deberse a que las lecturas o *reads* utilizados para el alineamiento con las bases de datos no han sido previamente identificados y consecuentemente reportados, por lo que se podría tratar de una nueva especie.

Otro inconveniente en la asignación de géneros y especies en la familia *Clostridiaceae*, recae en que se trata de una familia muy diversa cuyos miembros están, desde el punto de vista filogenético, erróneamente clasificados dentro del género *Clostridium*. La familia *Clostridiaceae* tiene como core al género *Clostridium* (*sensu stricto*) e incluye a otros géneros como *Acetivibrio*, *Acidaminobacter*, *Alkaliphilus*, *Anaerobacter*, *Caloramator*, *Caloranaerobacter*, *Coprobacillus*, *Dorea*, *Natronincola*, *Oxobacter*, *Sarcina*, *Sporobacter*, *Thermobhrachium*, *Thermohalobacter* y *Tindallia* (Wiegel *et al.*, 2006). En tanto a la disminución significativa de uno de los miembros de *Clostridiaceae* al pasar el tiempo, a pesar de encontrarse en un ambiente anaerobio rico en nutrientes que permitió su crecimiento inicial, se atribuye a i) que es una bacteria competidora pobre, por lo que crece lentamente, ii) que el pH ácido luego de 6 h impidió su crecimiento, y/o iii) la producción de compuestos antimicrobianos por microorganismos probióticos.

Es de notarse que, luego de 6 h se permite el crecimiento lento de *Faecalibacterium*, una bacteria anaerobia estricta, que promueve la salud intestinal en humanos. Además, el género *Faecalibacterium*, se ha reportado estar presente en la microbiota sana de *L. vannamei* en abundancia con respecto a camarones enfermos (Cornejo-Granados *et al.*, 2017).

Desde el punto de vista bioinformático, las bases de datos también representan una pieza fundamental en la asignación taxonómica. En la Figura 18 se presentan los mismos resultados de secuenciación a las 6 h pero ahora bajo la asignación taxonómica que corresponde de acuerdo con la base de datos Metaxa2.



**Figura 18.** Asignación taxonómica de los microorganismos presentes en el medio enriquecido a las 6 h de cultivo, de acuerdo con la asignación que corresponde usando la base de datos Metaxa2. (\*) Bacterias potenciales probióticas.

Al comparar los géneros resultantes a las 6 h de cultivo usando ambas bases de datos (Green Genes y Metaxa2), es indiscutible la gran abundancia del género *Enterococcus*. Además, es posible identificar con Metaxa2 que el género de la familia *Clostridiaceae* es *Clostridium*. Coinciden en abundancia los géneros *Enterococcus* (57% GG y 61% Metaxa2), *Clostridium* (31% *Clostridiaceae* GG y 36% *Clostridium* Metaxa2) y *Bacillus* (0.074% GG y 1% Metaxa2). A excepción de *Lactobacillus*, *Vagococcus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Pedomicrobium*, *Sediminibacterium*, *Mesorhizobium* y *Variovorax*, el resto de los géneros difieren al utilizar las dos diferentes bases de datos.

No existe una estrategia bioinformática de todo propósito que garantice los mejores resultados para un proyecto en particular, la combinación de diferentes software (versiones y herramientas diferentes), parámetros (distintas métricas) y bases de datos (factores como la actualización, curación de datos, etc.) afectan los resultados finales, como sucede en nuestro estudio para el caso de la base de datos. Metaxa2 tiene un alto grado de precisión y especificidad en todos los niveles taxonómicos, mientras que GG posee un menor grado de precisión a nivel familia. La desventaja de Metaxa2, una base de datos pequeña y bien curada, es su falta de actualización. GG es una base de datos default en QIIME, que a pesar de ser ampliamente usada, carece de filtros para depositar secuencias curadas (Escobar-Zepeda *et al.*, 2018), y por lo tanto de secuencias confiables. Tomando en cuenta lo anterior, se puede decir que, la ligera variación en los resultados de secuenciación usando las bases de datos mencionadas, se debe a la diferencia del curado de las secuencias depositadas en las bases de datos y la frecuencia de actualización de éstas. En el Anexo B, se pueden encontrar las asignaciones taxonómicas a nivel especie, aún cuando no es prudente una conclusión con respecto a una clasificación por abundancias a este nivel ya que usando amplicones de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA las asignaciones a este nivel taxonómico no son 100% confiables (Escobar-Zepeda *et al.*, 2018).

En relación con el enriquecimiento de sólo algunos géneros bacterianos en el medio MRS, se puede decir que, el medio MRS es un medio de propósito general para la cuantificación de lactobacilos; su formulación fue desarrollada con el fin de promover

un buen crecimiento de las BAL en general. Así, pueden desarrollarse lactobacilos, enterococos, estreptococos, pediococos, leuconostoc (OXOID). Tomando en consideración que pueden aprovechar los componentes del medio MRS otras BAL y bacterias que no son propiamente los lactobacilos, es evidente que en nuestro caso se ve el sesgo por el crecimiento de *Enterococcus*. Ya ha sido reportado que cepas de *Enterococcus* crecen muy bien en medio MRS, debido a que les provee los requerimientos necesarios como la fuente de nitrógeno, carbohidratos y cofactores. Adicionalmente es en medio MRS que se ha observado la mayor producción de compuestos de naturaleza antibacteriana por *Enterococcus* (Olvera, 2010), por lo que se supone que fue esta una de las causas de la disminución de *Clostridium* y otras bacterias patógenas identificadas.

Debe mencionarse que, las condiciones del método desde un inicio fueron sesgadas para aislar poblaciones de bacterias ácido lácticas. Es por ello que en nuestro estudio, no se observan los géneros comúnmente abundantes en la microbiota intestinal de camarón. Es importante señalar que los métodos dependiente de cultivo tienen la ventaja de enriquecer aquellas poblaciones presentes en menor abundancia, como sucede en nuestro caso, e inclusive develar microorganismos no detectados con tecnologías de secuenciación masiva.

### VII.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Conociendo de antemano los microorganismos presentes en el cultivo líquido enriquecido del Intestino 1, procedimos a aislar las bacterias del género *Enterococcus* y posiblemente *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* por medio de diluciones seriadas sucesivas en medio MRS y MRS-agavinas, según se describe en la Metodología. Para el Intestino 2, no se realizó metagenómica del cultivo enriquecido, por lo que se procedió al aislamiento durante la fase exponencial tardía, tiempo en que las células se encuentran en un buen estado metabólico (ver Figura 15).

A partir de diluciones seriadas sucesivas, como indica la Metodología, se aislaron 4 cepas (Figura 19), seleccionadas de acuerdo a sus características

morfológicas, mismas que se designaron como I3G, I3A, I4A1 e I4A2. Se evaluaron sus características morfológicas (Tabla 22) así como las microscópicas (Tabla 23).



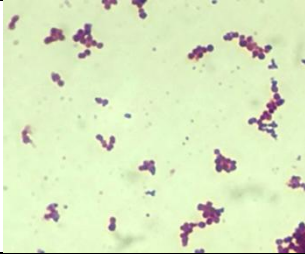
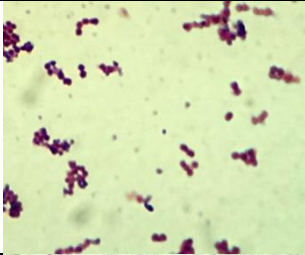
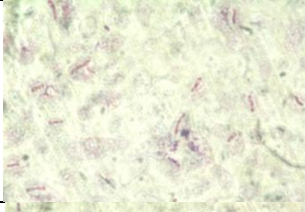
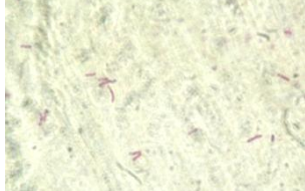
**Figura 19. Aislamiento de colonias a partir de stocks de cultivo bacteriano enriquecido.** (a) Colonias del Intestino 1 en agar MRS/L-Cisteína-HCl, (b) Colonias del Intestino 2 en agar MRS/agavina 2%. \*Aislamiento a partir de diluciones seriadas decimales.

**Tabla 22. Caracterización macroscópica de bacterias aisladas de la microbiota de intestino de camarón.**

Cepa	Morfología						Prueba catalasa
	Forma	Tamaño	Color	Borde	Elevación	Textura	
I3G	Puntiforme	Pequeña	Blanca opaca	Entero	Convexa	Cremosa	Negativa
I3A	Circular	Pequeña	Blanca opaca	Entero	Convexa	Cremosa	Negativa
I4A1	Circular	Pequeña	Translúcida beige	Ondulado	Elevada	Mucoide	Positiva
I4A2	Circular	Mediana	Translúcida beige	Ondulado	Elevada	Mucoide	Positiva



**Tabla 23. Caracterización microscópica de bacterias aisladas de la microbiota de intestino de camarón.**

Cepa	Microscopía			
	Gram	Forma	Agrupación	Tinción
I3G	Positivo	Cocos	En racimos, en cadena y en pares	
I3A	Positivo	Cocos	En cadena, en pares y en racimos	
I4A1	Negativo	Bacilos	Cadenas cortas	
I4A2	Negativo	Bacilos	Cadenas cortas	

La morfología de la colonia proporciona indicios importantes en cuanto a la identidad de los microorganismos que la constituyen. La composición del medio MRS promueve un buen crecimiento de las BAL en general. Así, tomando en consideración que pueden aprovechar los componentes del medio otras BAL que lactobacilos, y con base en los resultados de la secuenciación metagenómica de los cultivos enriquecidos, las características microscópicas de las colonias, y los resultados de la prueba de la catalasa, concluimos que posiblemente las cepas aisladas I3G e I3A pertenecen a los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* o *Pediococcus*.

Por otro lado, para las cepas I4A1 e I4A2; que provienen de un stock de cultivo con agavinas (Intestino 2) del cual no se realizó un estudio metagenómico, concluimos

que se trata de bacilos Gram negativos, de cadenas cortas, catalasa positivos. Con base en la descripción anterior y con la información proporcionada por la metagenómica de la microbiota intestinal de camarón blanco del Pacífico tratado con fibra (datos no publicados) en el marco de la colaboración con el Dr. Adrián Ochoa, se especuló sobre la posible naturaleza de estas dos cepas, pudiendo tratarse de *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia* o *Pseudoalteromonas*.

En términos de la utilización de inulina por estos géneros que hayan permitido su crecimiento, *Pseudomonas* es capaz de producir endoinulinasas utilizadas en la industria (Yun *et al.*, 1997) y se encuentra en la microbiota intestinal de pescados por lo que es usado como probiótico (Tapia *et al.*, 2011). *Flavobacterium* produce ácido al utilizar inulina como fuente de carbono (Zhang *et al.*, 2010) al igual que *Pseudoalteromonas* (Hwang *et al.*, 2016), *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas* y *Serratia* pertenecen a *Enterobacteriaceae* una familia con miembros comunes de la microbiota intestinal en humanos y animales. En un estudio previo, se identificaron miembros de *Enterobacteriaceae* en peces alimentados con inulina (Tapia *et al.*, 2011). Finalmente, *Shewanella* ha sido utilizado como probiótico en acuicultura (Tapia-Paniagua, 2016), y es capaz de utilizar aminoácidos como única fuente de carbono (Zhao *et al.*, 2006), por lo que podría crecer sin utilizar carbohidratos.

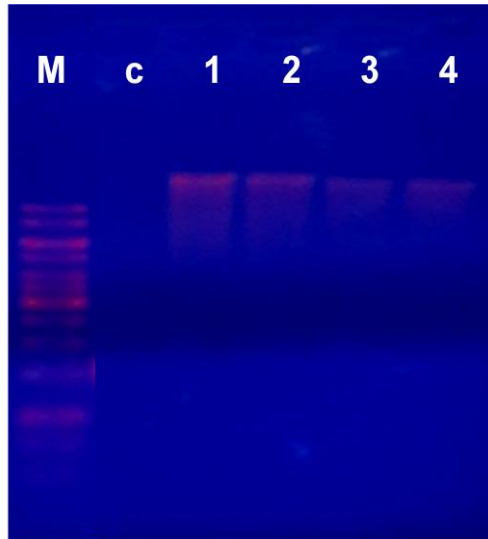
#### VII.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La identificación a nivel molecular de las cepas en estudio se realizó a partir del DNA obtenido de un cultivo líquido como se describe en la metodología. La cuantificación de DNA y las relaciones de las absorbancias obtenidas ( $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ ) mediante NanoDrop se muestra en la Tabla 24.

**Tabla 24. Concentración de DNA y  $A_{260/280}$ ,  $A_{260/230}$  del DNA extraído de las cepas aisladas.**

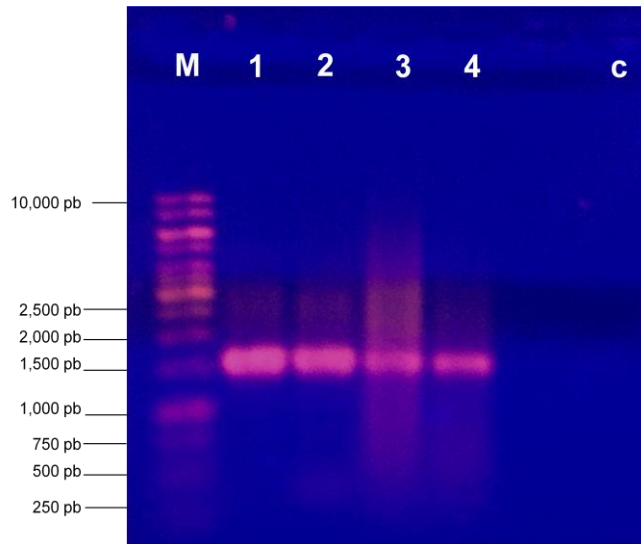
Cepa	Concentración ADN (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
I3G	22.6	1.76	1.00
I3A	15.8	1.94	0.90
I4A1	22.6	1.82	0.91
I4A2	23.2	2.06	1.01

Las concentraciones de DNA obtenido fueron bajas pero suficientes para realizar el estudio. Para verificar la calidad e integridad de este se realizó un gel de agarosa al 0.8% (Figura 20), cargando en cada pozo 5  $\mu$ L de muestra.



**Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio (0.05%) del DNA cromosomal de las cepas en estudio.** (M) Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1 kb, (c) control, (1) amplicon de la Cepa I3G, (2) amplicon de la Cepa I3A, (3) amplicón de la Cepa I4A1, (4) amplicon de la Cepa I4A2.

En la Figura 20 puede observarse la presencia de bandas íntegras de las cuatro cepas, a un altura mayor a 10,000 pb, lo que demuestra que se trata de DNA cromosomal ya que por su tamaño no puede difundirse a través de los poros del gel de agarosa. Para visualizar el tamaño de los amplicones, después de la reacción de PCR y verificar que fuera de aproximadamente 1,500 pb, tamaño aproximado de la subunidad 16S, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 21).



**Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio (0.05%) de los amplicones del gen ribosomal 16S.** (M) Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1 kb, (1) amplicon de la Cepa I3G, (2) amplicon de la Cepa I3A, (3) amplicon de la Cepa I4A1, (4) amplicon de la Cepa I4A2, (c) control.

Los productos de amplificación del rDNA 16S de las cepas se observan en la Figura 21, con un peso molecular aproximado de 1,500 pb, lo que indica una correcta amplificación del gen.

Los amplicones se purificaron con el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Se cuantificó la concentración de los amplicones (Tabla 25), con el equipo NanoDrop, a utilizarse como moldes para las reacciones de secuenciación llevadas a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

**Tabla 25. Concentración de ADN y  $A_{260/280}$ ,  $A_{260/230}$  de los productos de PCR.**

Cepa	Concentración ADN del amplicon (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
I3G	170.7	1.88	1.73
I3A	57.5	1.88	1.26
I4A1	133.2	1.87	1.64
I4A2	179.2	1.89	1.68

Las secuencias resultantes se ensamblaron con el programa DNA Baser Assembler (versión 5.15.0) para realizar el sobrelape de las cepas y obtener un resultado más certero. Las secuencias se analizaron en la base de datos no redundante del National Center of Biotechnological Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

realizando un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para conocer la identidad de las secuencias por alineamientos locales de la secuencia problema. Para ello se utilizó la base de datos 16S ribosomal RNA Sequences (Bacteria and Archaea).

En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos mediante BLASTn de las secuencias de la cepas de interés.

**Tabla 26. Identidad de las secuencias de las cepas obtenida mediante BLASTn.**

Cepa	Identidad	Cobertura (%)	Identidad (%)	Expectancia
I3G	<i>Enterococcus faecium</i>	98	99	0.0
I3A	<i>Enterococcus faecium</i>	98	99	0.0
I4A1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98	98	0.0
I4A2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	98	0.0

El porcentaje de cobertura indica la cantidad de nucleótidos comparados de toda la secuencia. El porcentaje de identidad indica la similitud de la secuencia a analizar con la secuencia de referencia de la base de datos. El valor de la expectancia representa la posibilidad de que el resultado del alineamiento sea al azar, mientras más cercano a cero, más certera la identificación. El porcentaje de identidad confiable para el resultado de la secuenciación debe ser mayor a 97%, de modo que el resultado de la secuenciación de todas las cepas es aceptable y al considerar la expectancia, los resultados también son certeros.

Ya que diversos factores ambientales afectan la microbiota intestinal en los sistemas de acuicultura, es razonable asumir que la microbiota de las muestras de *L. vannamei* analizadas y utilizadas para el aislamiento de cepas bacterianas, sea producto circunstancial de un conjunto de factores del sistema de cultivo; por ejemplo, la salinidad, la temperatura, la calidad del agua, así como la dieta y los suplementos alimenticios, los que influyeron en el establecimiento de la microbiota de la muestra de *L. vannamei*. El enriquecimiento de bacterias anaerobias estrictas del género *Clostridium* y la especie *Faecalibacterium prausnitzii* (ver Tabla XII. 1 y Tabla XII.2 del Anexo II) nos da evidencia de que los medios de cultivo y técnicas anaerobias aplicadas para el aislamiento de bacterias anaerobias fue correcto. Sin embargo, no

fue posible obtener *Bifidobacterium*, uno de los géneros anaerobios a aislar planteado en los objetivos. Las razones pueden ser que i) la obtención y almacenamiento en condiciones no anaerobias de las muestras afectaron negativamente la recuperación de bifidobacterias, ii) no se encontraba desde un inicio en nuestras muestras de intestino en particular alguna célula de *Bifidobacterium*, iii) las bifidobacterias de las muestras sean más sensibles que *Clostridium* y *Faecalibacterium*, incluso a la luz, que la manipulación y procesamiento de las muestras impactó negativamente en su recuperación.

Hay que considerar que el análisis de los datos bioinformáticos, así como el tipo de muestra, el lugar de obtención, la forma de transportación y el procesamiento son diferentes en cada estudio, por lo que los resultados reportados en la literatura pueden variar. Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, se puede concluir que las cepas aisladas en este trabajo forman parte de la microbiota de *L. vannamei*. Se tienen evidencias adicionales que fortalecen esta conclusión, como se detalla a continuación.

Al buscar la presencia de las dos bacterias usando el gen ribosomal 16S de sus genomas, y mapeando en todas las secuencias de los bioensayos que realizó el grupo del Dr. Adrián Ochoa en los años 2016 y 2017, se confirmó la presencia de *E. faecium* y *K. pneumoniae* en la microbiota intestinal de *L. vannamei*, tanto de intestinos controles (de aquellos camarones que no fueron alimentados con agavinas) como en los camarones tratados (Tabla 27).

**Tabla 27. Abundancia relativa de las cepas identificadas en los intestinos y hepatopáncreas de los bioensayos en *L. vannamei* alimentados con fibra.**

Órgano	Control	Frecuencia (%) Agavina al 2%	Frecuencia (%) Agavina al 10%	Valor P entre tratamientos
<b><i>K. pneumoniae</i></b>				
Intestino	0	3.24E-04	3.98E-03	No proporcionado
<b><i>E. faecium</i></b>				
Hepatopáncreas	5.16E-03 ± 8.57E-03	2.25E-03 ± 2.990E-03	8.73E-03 ± 8.87E-03	0.11
Intestino	4.50E-02 ± 1.1E-01	7.36E-03 ± 8.48E-03	1.60E-02 ± 2.19E-02	0.34
Valor P entre órganos	0.033	0.013	0.6	

#### VII.4.1. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Se encontró que si bien *K. pneumoniae* está presente en la microbiota, se encuentra en una frecuencia menor al 0.005% por lo que los protocolos bioinformáticos utilizados por el equipo del Dr. Adrián Ochoa eliminan su presencia y no se observa en los resultados de secuenciación convencionales.

Es preciso mencionar que su enriquecimiento *in vitro*, pese a la posible presencia de otras bacterias en la muestra de intestino, se debe a su capacidad de degradar agavinas, y que en concordancia a los bioensayos metagenómicos en camarones alimentados con concentraciones de 2 y 10% de agavinas, se observa claramente el incremento de su abundancia al administrar agavinas, y su aparición en comparación con el control (Ver Tabla 27).

Hasta ahora, *K. pneumoniae* se ha reportado únicamente como potencial probiótico de origen marino aislado del camarón *P. monodon* y de la especie de langosta *Panulirus ornatus*, por su capacidad antimicrobiana, al inhibir el crecimiento de *V. owensii in vitro*, reportado como causante de AHPND en *L. vannamei*, aunque no de *V. parahemolyticus* (Nguyen *et al.*, 2014). Además, este hallazgo indica la presencia de *K. pneumoniae* en la microbiota intestinal de especies marinas, y no sólo en animales pecuarios o en humanos.

Las bacterias del género *Klebsiella* son causa frecuente de infecciones nosocomiales y enfermedades en animales. *Klebsiella* spp. es ubicua en la naturaleza, ya que se encuentra en el tracto gastrointestinal de mamíferos, en ambientes terrestres, acuáticos y en plantas. Su ocurrencia y distribución en el agua, designan a la especie *Klebsiella pneumoniae* como la de mayor predominancia. Los aislados ambientales de agua son capaces de inducir factores de virulencia tales como hemólisis, cápsula de polisacáridos, biopelículas, pili y sideróforos. Por otro lado, es resistente a antibióticos (Podschun *et al.*, 2001; Struve *et al.*, 2004; Barati *et al.*, 2016). Se requiere de más estudios a fin de verificar la patogenicidad potencial de los aislados de *K. pneumoniae*, evaluar su ocurrencia o transmisión a humanos vía consumo de productos marinos.

#### VII.4.2. *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

El género *Enterococcus* es un grupo diverso y de importancia ecológica y clínica. Miembros de este género están ampliamente distribuidos en la naturaleza, por ejemplo en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, en plantas terrestres y acuáticas, sedimentos y ambientes acuáticos (Byappanahalli *et al.*, 2012). *Enterococcus* juega un rol fundamental en la maduración de quesos que por sus propiedades lipolíticas y proteolíticas, confieren aroma y sabor (Olvera *et al.*, 2018). También *Enterococcus* spp. se encuentra formando parte de la microbiota nativa de carnes, vegetales y productos lácteos fermentados (Franz *et al.*, 2003). Además, exhiben la capacidad de producción de bacteriocinas que presentan actividad contra patógenos de importancia en alimentos en especies de *Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium*, *E. coli*, *S. aureus*, etc. (Fisher y Phillips, 2009; Olvera *et al.*, 2018).

*E. faecium* es conocida por ser una de las causas principales de infecciones nosocomiales en humanos. Es habitante del intestino en humanos y otros animales y actúa como un patógeno oportunista por la presencia de factores de virulencia al formar biopelículas. Su naturaleza patogénica es evidente en infecciones del tracto urinario, endocarditis e infecciones post-cirugía (Fisher y Phillips, 2009). Otra de sus características es su tolerancia intrínseca a antibióticos como los betalactámicos y las cefalosporinas; y la adquisición de resistencia a antibióticos de importancia clínica como la vancomicina y aminoglicósidos (Hollenbeck y Rice, 2012).

Al comparar los genomas de cepas de *E. faecium* de casos clínicos y aislados del tracto gastrointestinal humano o de fuentes alimenticias, es evidente su diferencia en cuanto a sus genomas por lo que se separan en dos clados distintos. De manera general, los aislados de origen intestinal o alimenticio contienen genes que codifican para factores de secreción asociados con la interacción y adhesión a superficies celulares para su colonización y genes que codifican bacteriocinas de clase II. Los aislados clínicos pertenecen a un grupo de subespecies que codifican genes resistentes a antibióticos y factores de virulencia que causan daño al huésped (Palmer *et al.*, 2012; Olvera *et al.*, 2018).

Numerosos reportes han validado la seguridad de *Enterococcus* en alimentos y como probióticos (Araújo y Ferreira, 2013; Huys *et al.*, 2013). La aplicación de *E.*



*faecium* SF68 en Suecia como probiótico y de *E. faecium* T110 en Japón sin efectos adversos reportados, son un ejemplo de su validación. *E. faecium* es uno de los microorganismos en alimentos reconocidos por la Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2018). Actualmente se permite su uso como suplemento probiótico en la dieta de aves de corral, perros y cerdos (Ghattargi *et al.*, 2018). Es evidente por lo tanto, la diversidad y la plasticidad genómica de *E. faecium* para existir como un patógeno oportunista o exhibir propiedades probióticas.

#### **VII.4.2.1. *Enterococcus faecium* en la acuicultura**

Aunque anteriormente se creía que las BAL no estaban asociadas a ambientes acuáticos, se ha demostrado actualmente que, algunas especies están ampliamente distribuidas en peces, crustáceos, moluscos, mariscos y su ambiente acuático, así como en productos marinos. Respecto a este punto, los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, constituyen la microbiota intestinal normal de animales acuáticos (Ringo y Gatesoupe., 1998; González *et al.*, 2000). *Enterococcus faecium* ha sido aislado de diversas fuentes de origen marino como atún blanco, bacalao, calamar, camarón, cangrejo, langosta, lubina, maruca, moluscos bivalvos, pulpo, salmón del Atlántico, trucha arcoíris (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013), por mencionar algunos; lo cual corrobora la presencia de *E. faecium* en diversas especies de ambientes acuáticos.

Por otro lado, las cepas de *E. faecium* aisladas en este trabajo, de acuerdo a la metagenómica de las muestras de bioensayos con camarones tratados con fibra, también están presentes en la microbiota de intestinos y hepatopáncreas de camarón (Tabla 27), aunque en muy baja frecuencia (la que normalmente tienen las bacterias transitorias). Pese a esto, dado el aislamiento a partir del intestino de camarón, se puede decir que no es una bacteria transitoria, sobre todo porque esta significativamente enriquecida en el intestino con respecto al hepatopáncreas, no así con respecto al prebiótico agavina, donde no existe diferencia significativa de su abundancia con respecto a las distintas concentraciones con el tratamiento prebiótico.

Es relevante mencionar una investigación en la que se acopló la metagenómica del intestino de *L. vannamei* con el aislamiento de bacterias para la selección de microorganismos probióticos específicos del huésped (Cui *et al.*, 2017). Los resultados que obtuvieron son semejantes a los nuestros de acuerdo con las siguientes consideraciones:

a) en comparación con los datos metagenómicos, las cepas BAL en cultivo estaban sobrerrepresentadas, es decir, se aislaron más cepas de géneros específicos que las BAL detectadas por secuenciación, e inclusive la especie asignada por metagenómica no coincidía con las especies cultivadas; lo que deja claro que es difícil acoplar el método de cultivo con la metagenómica para aislar BAL representativas de la comunidad microbiana dada la limitación de las bases de datos,

b) la familia *Enterococcaceae* dentro de las BAL, fue la más abundante en intestinos de camarón con una abundancia entre 0.0144 a 1.56%, en nuestro caso, la especie aislada representa un porcentaje similar de la microbiota intestinal; además, como sucede con nuestros resultados por métodos de cultivo, la familia más enriquecida fue *Enterococcaceae*,

c) sólo las cepas BAL presentes en la metagenómica y con actividad antimicrobiana contra *A. hydrophila*, *V. vulnificus* y *V. parahemolyticus* fueron seleccionadas, destacando a *E. faecium*. De la misma forma, detectamos la actividad antimicrobiana de *E. faecium* contra *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. parahemolyticus* (ver más adelante), además de presentarse en los análisis metagenómicos de nuestras muestras. Los puntos anteriores, fortalecen la selección de *E. faecium* como potencial probiótico, específico para *L. vannamei*.

En vista de que varios estudios demuestran que géneros como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Bacillus* son comunes tanto en sedimentos como en intestinos de *L. vannamei*, se sugieren como potenciales probióticos, a pesar de su poca abundancia (Zhang *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2018). Lo que es más, algunos estudios demuestran que *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bacillus* son los géneros probióticos más abundantes en el tracto digestivo (1,0%, 0.93% y 0.37% respectivamente), y ya que estos géneros son usados como probióticos en

humanos y otros animales de granja, se han usado en la acuicultura. Además se ha encontrado en muestras de sedimentos de granjas de cultivo de camarón, géneros considerados potenciales probióticos como *Bacillus* (0.0018%), *Lactococcus* (0.006%), *Streptococcus* (0.01%), *Streptomyces* (0.006%), *Enterococcus* (0.006%) y *Lactobacillus* (0.006%-1.92%), todos con una abundancia relativa muy baja (Zhang *et al.*, 2016). Con respecto a la escasa presencia de bacterias probióticas en el intestinos de *L. vannamei*, los resultados aquí presentados concuerdan con los de estudios previos. *Enterococcus faecium* se encuentra igualmente en abundancia poco representativa en el intestino de camarón, como sucede con otros probióticos usados en acuicultura, cuya abundancia menor al 1%, los hace en ocasiones indetectables. Es de notar que esta bacteria pudo provenir de los sedimentos del estanque de cultivo, como previamente se informa en estudios recientes, la composición de la microbiota intestinal de *L. vannamei* está estrechamente relacionada con los microorganismos presentes en los sedimentos (Cornejo-Granados *et al.*, 2017).

A pesar de la escasa presencia de *E. faecium* en el intestino de camarón, se ha reportado que su aplicación como probiótico fortalece el sistema inmune de *L. vannamei* y favorece su supervivencia frente a *V. parahemolyticus* (Sha *et al.*, 2016a; Sha *et al.*, 2016b). Sorprendentemente, Sha y colaboradores no detectaron a *Enterococcus* mediante secuenciación masiva luego del tratamiento por cuatro semanas con el probiótico, probablemente dada su escasa presencia. En este contexto, podemos decir entonces que, *Enterococcus faecium* forma parte de la microbiota intestinal de *L. vannamei* pese a que pocos estudios la reporten por su dificultad de detección.

### VII.5. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Para disponer de cantidades suficientes de las cepas con potencial probiótico, definir la viabilidad de producción y evaluar su capacidad antibacteriana se estudió su comportamiento durante el crecimiento. Se reporta en la literatura que la síntesis de compuestos proteínicos antibacterianos de *Enterococcus* es dependiente de la fase de

crecimiento, y es durante la fase logarítmica tardía o fase estacionaria temprana que ocurre la máxima síntesis de compuestos antibacterianos (Olvera *et al.*, 2015).

Las cinéticas de crecimiento se obtuvieron bajo las condiciones descritas en la metodología. En las Figuras 22 a 25 se muestran las cinéticas de crecimiento de cada cepa en las dos condiciones evaluadas: aerobiosis y anaerobiosis. Se presenta el promedio y la desviación estándar de 2 repeticiones para cada experimento.

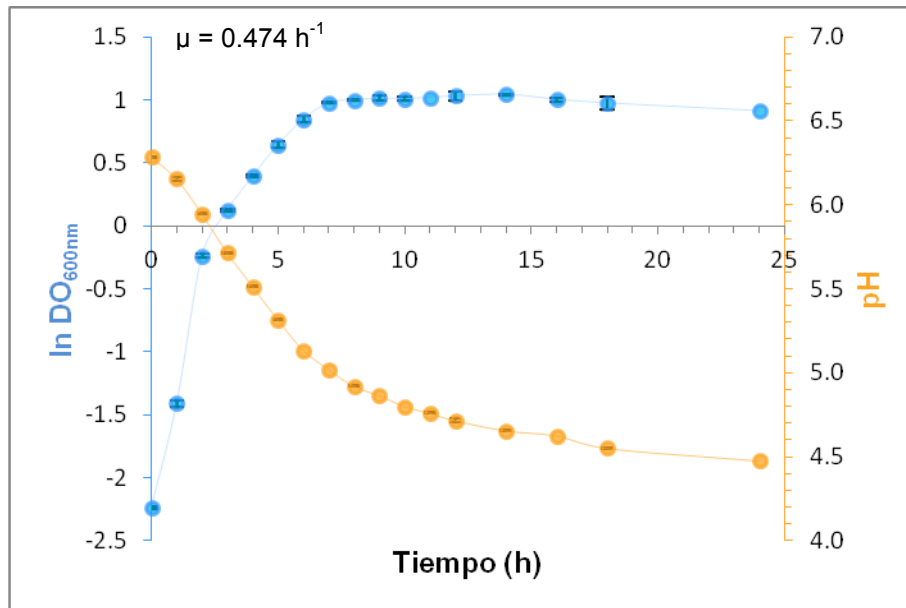


Figura 22. Cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* cepa I3G en aerobiosis.

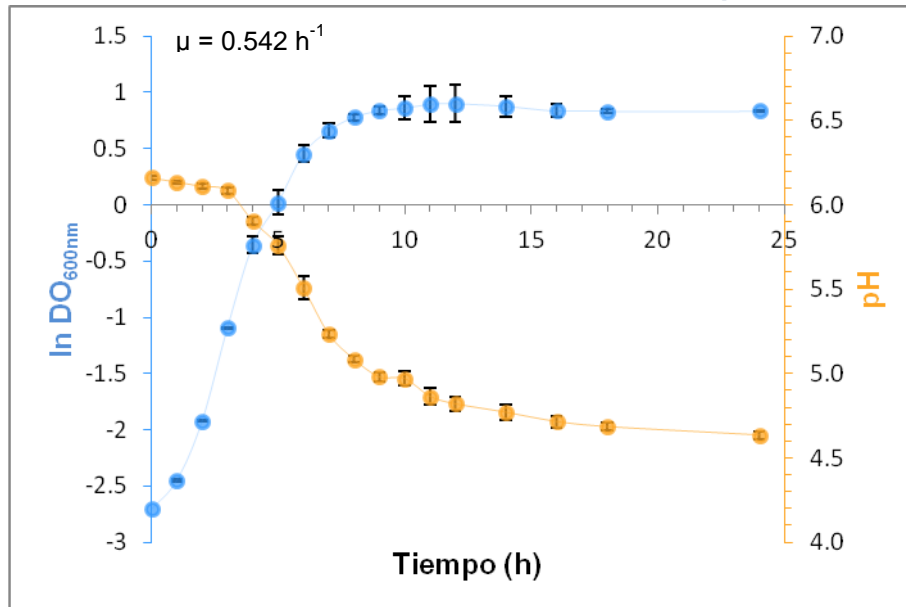


Figura 23. Cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* cepa I3G en anaerobiosis.

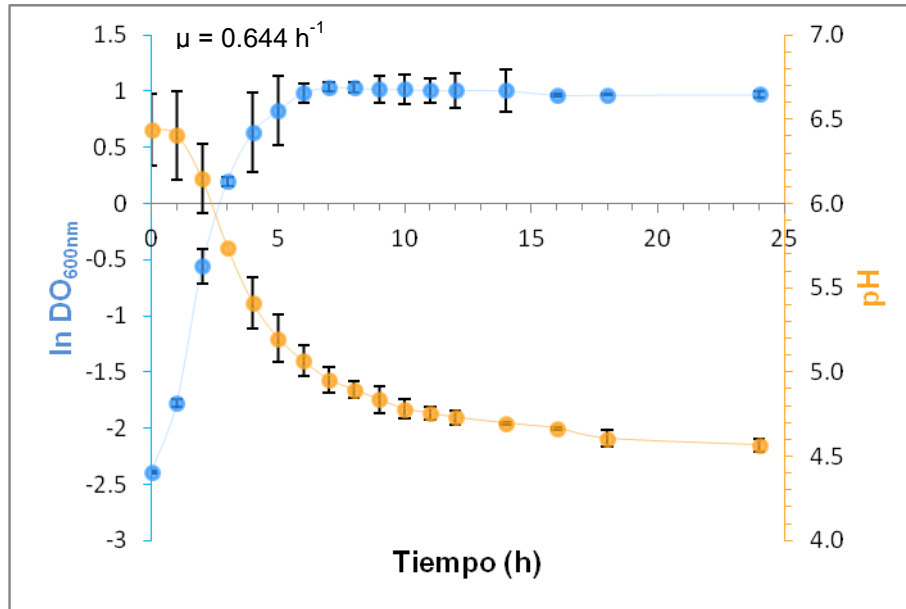


Figura 24. Cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* cepa I3A en aerobiosis.

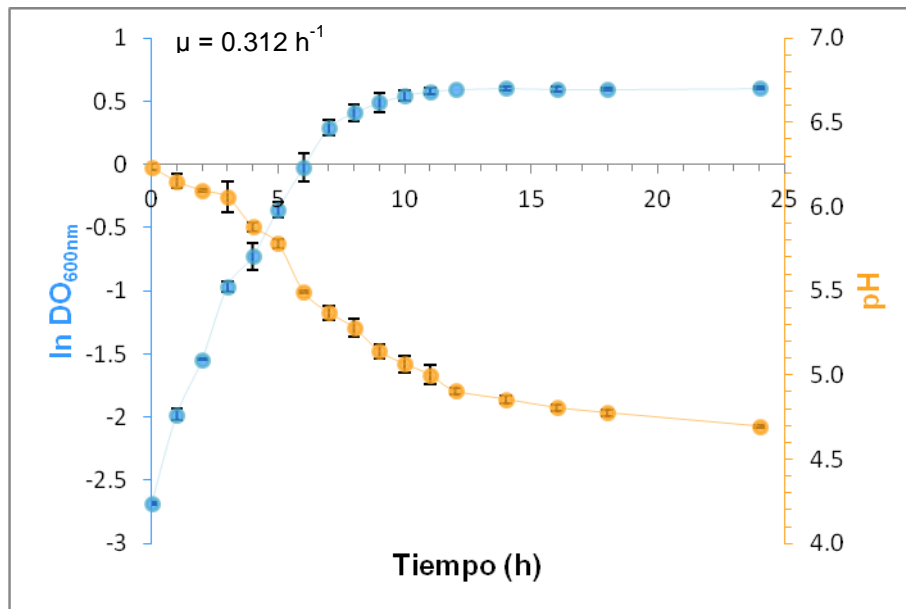


Figura 25. Cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* cepa I3A en anaerobiosis.

Como se puede observar en las Figura 22 a 25, en todos los cultivos en medio MRS la fase lag es prácticamente inexistente en los cultivos de ambas cepas, alcanzando la fase exponencial casi rápidamente, lo que indica su buena adaptación al medio MRS en ambas condiciones de aireación. La cepa I3A tiene un mejor crecimiento en aerobiosis, mientras que la cepa I3G crece eficientemente tanto en aerobiosis como anaerobiosis.

### VII.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y SALINIDAD

Complementando la caracterización fenotípica de *E. faecium*, se decidió estudiar su capacidad de crecimiento a diferentes pHs y niveles de salinidad. Los resultados se muestran en la Tablas 28 y 29.

**Tabla 28. Capacidad de crecimiento de *E. faecium* en diferentes condiciones de pH.**

pH	Aerobiosis				Anaerobiosis			
	Medio MRS		Medio MRS modificado		Medio MRS		Medio MRS modificado	
	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A
4.0	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	+	+	+	+	+	+	+	+
6.0	++	++	+	+	++	++	+	+
7.0	++	++	++	++	++	++	++	++
8.0	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++

(-) Sin crecimiento, (+) Crecimiento, (++) Buen crecimiento, (+++) Muy buen crecimiento.

**Tabla 29. Capacidad de crecimiento de *E. faecium* de crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl.**

NaCl (%)	Aerobiosis				Anaerobiosis			
	Medio MRS		Medio MRS modificado		Medio MRS		Medio MRS modificado	
	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A
6.5%	++	++	++	++	++	++	++	++
10%	+	+	+	+	+	+	+	+
12%	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Poco crecimiento, (++)Crecimiento.

Se encontró que *E. faecium* crece mejor en a un pH de entre 5 a 8 y además es capaz de crecer en condiciones de salinidad de hasta 120 g/L. Al evaluar la capacidad de crecimiento de *E. faecium* en diferentes pHs se hace evidente su capacidad de crecer a pHs alcalinos, como lo indica la literatura, donde se establece que crece entre 4.5 a 10, mostrando mejor crecimiento a pH 7.5 (Fisher y Phillips, 2009). La tolerancia de *E. faecium* a pHs alcalinos y a altas concentraciones de sal es debido a actividades

de P-ATPasas (Ramsey *et al.*, 2014). La capacidad de *Enterococcus* de crecer en presencia de 6.5% NaCl es una de las características fenotípicas del género, como se muestra en la Tabla 29, donde se observa también de crecer, aunque en menor medida, en salinidades entre 10 a 12%.

La salinidad a mayores concentraciones representa un factor abiótico de estrés para el crecimiento de *E. faecium* como anteriormente se ha reportado, por lo que se puede decir que existe una relación inversa entre la salinidad y la supervivencia de enterococos (Byappanahalli *et al.*, 2012). La homeostasis de *E. faecium* en condiciones alcalinas y salinidades altas ha sido reportada por la presencia de varios mecanismos independientes de transporte de sodio que permiten mantener las concentraciones citosólicas adecuadas: la expresión de genes que codifican antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  basada en la actividad por fuerza protón motriz y de ATPasas que utilizan la energía de hidrólisis de ATP. En específico, se trata de una clase vacuolar de enzimas  $\text{V}_0\text{V}_1$ -ATPasa que translocan sodio en lugar de protones fuera de la célula, cuyo operón *ntp* sólo se induce por i) altas concentraciones de sodio intracelular producidas por un exceso de sodio extracelular, ii) un pH alto cuando el antiportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  no es funcional y iii) cuando la fuerza motriz de protones ha sido disipada por ionóforos o una pérdida de  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPasa sintasa (Murata *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2005). La presencia de enzimas  $\text{V}_0\text{V}_1$ -ATPasas explica la homeostasis del sodio para el crecimiento de *E. faecium* en condiciones alcalinas por extrusión de sodio mediante catálisis rotacional.

La capacidad de *E. faecium* de crecer en condiciones adversas ambientales y cambiantes, como lo demuestran nuestros resultados, explican su habilidad de colonizar diferentes nichos ecológicos y su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y fisiológicas, por ejemplo ambientes acuáticos, con salinidades promedio de 35 g/L y la de tolerar múltiples pHs.

## VII.7. PERFIL DE DEGRADACIÓN DE AGAVINAS

No sólo es importante conocer si las cepas probióticas son capaces de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y fisiológicas, también es importante entender los factores que propician su supervivencia y colonización en el tracto gastrointestinal.

### VII.7.1. PERFIL DE DEGRADACIÓN DE AGAVINAS POR *E. FAECIUM*

Una de las hipótesis era que, si la adición de agavina a las dietas de camarón, favorecía el crecimiento de bacterias benéficas, éstas podrían metabolizar las agavinas y emplearlas para su proliferación en el intestino. Para confirmar ésta hipótesis, se evaluó el crecimiento de las cepas I3A y I3G en agavinas. Para ello se realizaron cultivos de 24 h en MRS modificado tanto en condiciones aerobias como anaerobias. En la Tabla 30 se observa el pH y DO promedio de dos ensayos realizados.

**Tabla 30 . Crecimiento de las cepas de *E. faecium* cepa I3G y I3A en medio MRS agavinas.**

	Control		Aerobio		Anaerobio	
	Cepa I3G	Cepa I3A	Cepa I3G	Cepa I3A	Cepa I3G	Cepa I3A
pH	6.445 ±0.007	6.44 ±0.014	5.29 ±0.014	5.28 ±0.014	5.42 ±0.021	5.41 ±0.007
DO <sub>600nm</sub>	0.343 ±0.004	0.362 ±0.008	1.443 ±0.018	1.519 ±0.072	1.234 ±0.013	1.275 ±0.009

Se encontró que *E. faecium* crece pobremente en agavinas comparado con su crecimiento en glucosa. Esto hace pensar que solo alguno(s) de los componentes de la mezcla de azúcares que conforman las agavinas permiten el crecimiento de *E. faecium* comparado al de la glucosa.

Con respecto a la capacidad de crecimiento de *E. faecium* en agavinas, un reporte reciente respalda los resultados obtenidos (Ayala *et al.*, 2018). Al evaluar el efecto prebiótico de la inulina de agave en el crecimiento *in vitro* de *E. faecium* aislado de la mucosa oral de becerros, se observó un mayor crecimiento bacteriano con el tratamiento con inulina de agave en comparación con inulina de achicoria, aunque los autores no reportaron el crecimiento de la cepa en glucosa. Lo anterior aunado a



nuestros resultados, es una prueba contundente de la capacidad de crecimiento de *E. faecium* en agavinas.

Con el fin de saber si el crecimiento de las cepas I3G y I3A se debía a la presencia de carbohidratos simples en la agavina y no por el metabolismo de agavinas, se realizó en el laboratorio la caracterización de los azúcares de la agavina mediante un análisis por HPLC. Puede observarse que las agavinas contienen cantidades muy pequeñas de mono y disacáridos, menores al 10% (Tabla 31).

**Tabla 31. Composición (%) de la agavina.**

Fructanas	92.6
Fructosa	2.8
Glucosa	1.9
Sacarosa	2.7

Ya que los datos nos informan que la presencia total de carbohidratos simples en la agavina es de tan sólo el 7.4%, mientras que el resto corresponde a fructanas, pareciera necesario que *E. faecium* metabolice fructanas para su crecimiento. Para confirmar si existía degradación de agavinas por *E. faecium*, se realizó cromatografía en capa fina (TLC), antes y después del cultivo (Figura 26).

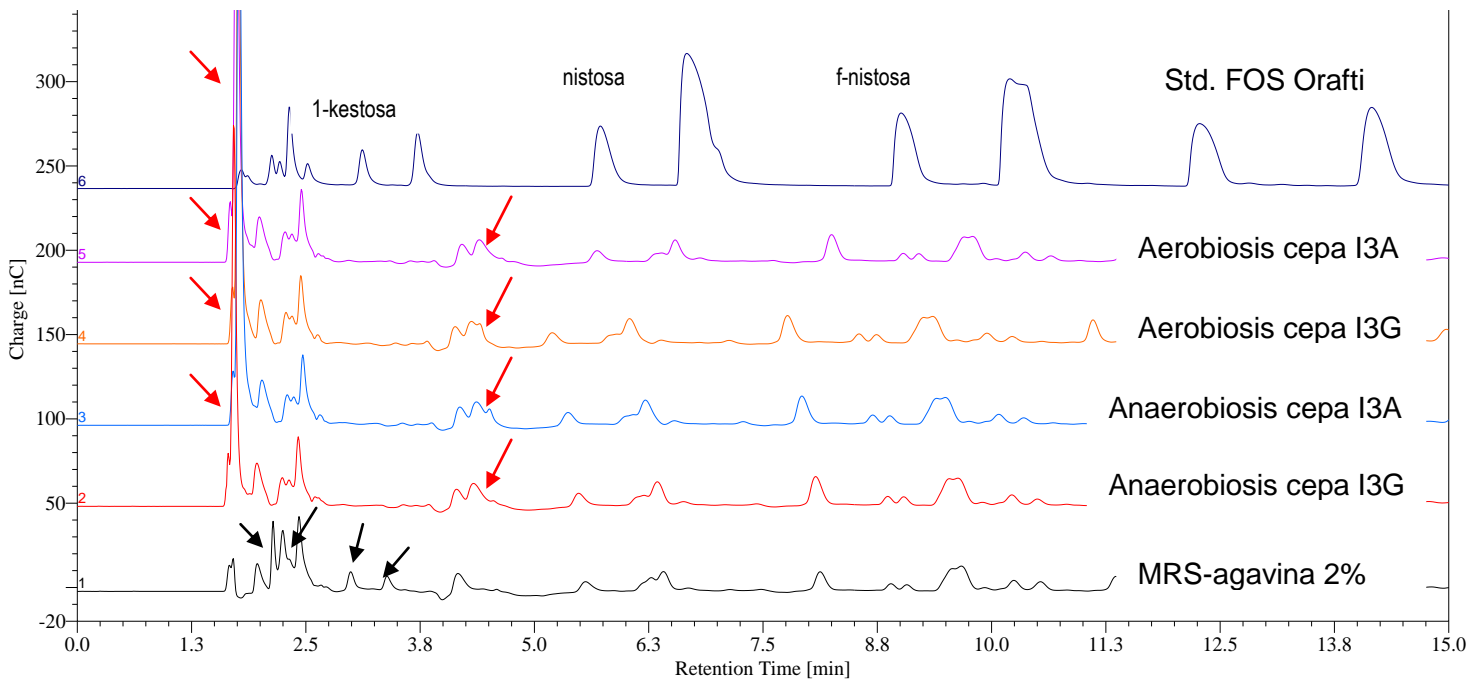


**Figura 26. Placa de la cromatografía en placa fina de los sobrenadantes de *E. faecium* después de 24 h de incubación.** 1) Estándar de Fru:Glu: Sac (10 g/L) + Inulina de Leuconostoc (4 g/L), 2) Estándar FOS Orafti®P95 (5 g/L), 3) Agavina microfiltrada (5 g/L), 4) MRS modificado, 5) Sobrenadante *E. faecium* cepa I3G anaerobiosis, 6) Sobrenadante *E. faecium* cepa I3A anaerobiosis, 7) Sobrenadante *E. faecium* cepa I3G aerobiosis, 8) Sobrenadante *E. faecium* cepa I3A aerobiosis.

El solución estándar mezcla de mono y disacáridos se muestra en el primer carril. Los FOS Orafti®P95, son fructooligosacáridos con un GP de entre 2 a 8, y una pureza de  $\geq 93.2\%$ , el resto corresponde a azúcares simples por lo que en la placa TLC puede observarse un punto poco nítido hasta arriba del punto de aplicación correspondiente a glucosa ( $\sim 1.8\%$ ), fructosa ( $\sim 2.8\%$ ) y sacarosa (0.5%). El porcentaje de fructanas reportados en FOS OraftiP95 es de 2.1%, de FOS con GP=5-10 de 38.5%, de nistosa 35.6% y 1-kestosa 18.4% (Alvarado *et al.*, 2014). El perfil del medio con agavinas mostrado en el carril 4 confirma la presencia de carbohidratos simples en las agavinas, como anteriormente se había determinado por HPLC; además se observa la presencia de cadenas con alto grado de polimerización.

En el caso de las muestras, la placa de cromatografía muestra en todos los casos tanto de fermentación aerobia y anaerobia como para ambas cepas de *E. faecium*, la desaparición del estándar de Fru:Glu:Sac, y de un producto que eluye entre la 1-kestosa y la nistosa, indicando su consumo durante la fermentación por las cepas de *E. faecium*. Sin embargo, parece que *E. faecium* no lleva a cabo la degradación de agavinas, ya que no se presenta la acumulación de productos intermediarios de degradación y el perfil control prácticamente no cambia.

Con el objetivo de determinar si efectivamente no se producía la degradación de agavinas por las cepas I3G, I3A, I4A1 y I4A2; de manera complementaria, se obtuvo un perfil de degradación de agavinas para *E. faecium* cepa I3G y I3A, así como de *K. pneumoniae* cepa I4A1 y I4A2, mediante un análisis por HPAEC-PAD. Los cromatogramas de los perfiles se muestran en la Figura 27 y 28, respectivamente.



**Figura 27. Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de degradación de agavinas de las cepas aisladas de *E. faecium*.** Sobrenadantes a las 24 h de cultivo. La acumulación de productos de degradación se marca con flechas rojas y la desaparición por el consumo de compuestos se indica en flechas negras.

Al comparar el perfil de productos al final del cultivo de 24 h en presencia de agavinas (Figura 27) se demuestra la degradación parcial de agavinas por las cepas de *E. faecium*, lo que da lugar a la aparición de señales de residuos de glucosa, en comparación con el control del medio, mientras que la fructosa y la sacarosa se consumen; y la desaparición de dos señales correspondientes a cadenas de bajo GP u oligosacáridos presentes en el control; mientras que los sustratos de mayor peso molecular al parecer permanecen sin modificación. Esto significa que, además de los azúcares simples, solo las moléculas de oligosacáridos de bajo GP se están degradando/consumiendo, dando lugar a productos de menor peso molecular.

Es interesante observar la aparición de un pico predominante en todos los casos correspondiente a un producto que eluye entre la 1-kestosa y la nistosa, que, dada su ubicación, probablemente corresponda a un trisacárido de fructosa (levanotriosa), 6-kestosa o neokestosa. Esta señal indica la liberación de productos de degradación intermediarios por hidrólisis de compuestos de mayor tamaño, o la acción enzimática que sintetiza compuestos que se internalizan para su metabolismo intracelular. Esto

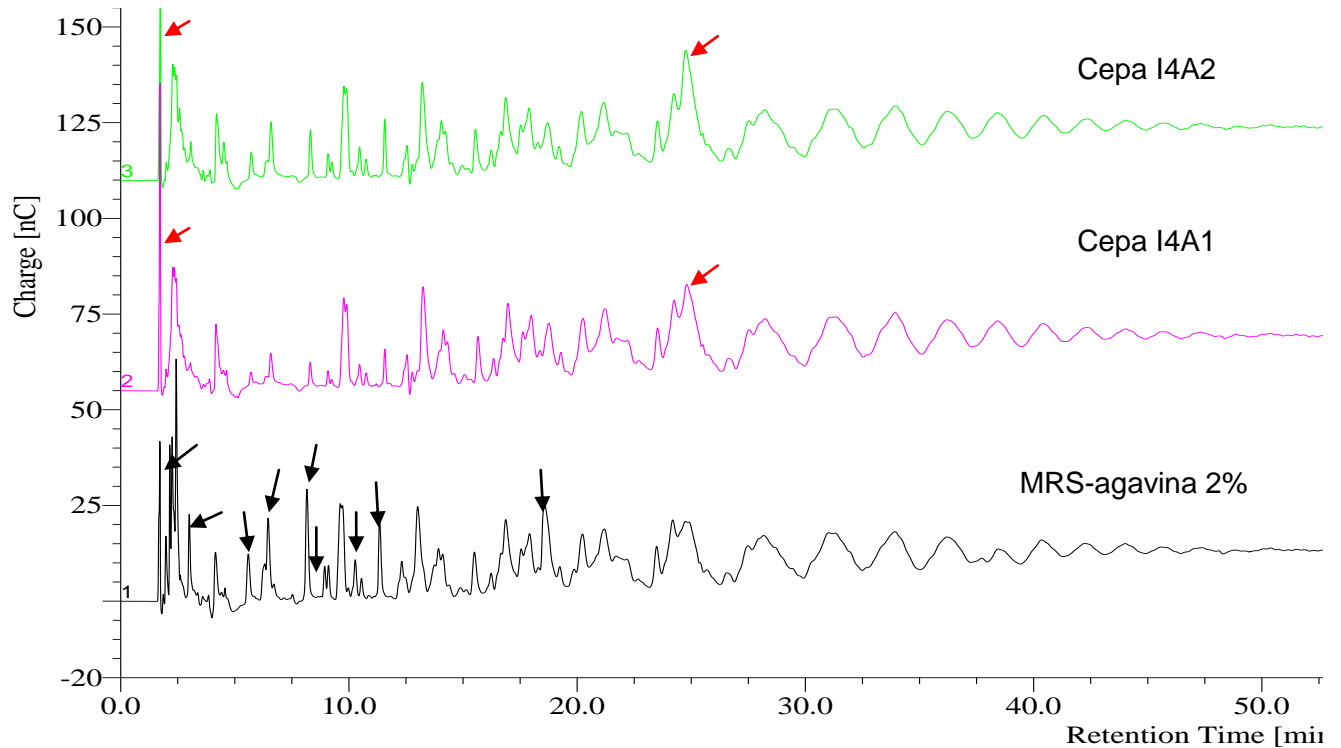
explicaría la presencia de residuos de monosacáridos que no se aprovechan al final de la fermentación. Las fructosiltransferasas por ejemplo, catalizan la transferencia del grupo fructosilo de una molécula de sacarosa a la fructosa de una molécula aceptora (polímero en crecimiento), al tiempo que liberan una molécula de glucosa, por lo que es posible la presencia de fructosiltransferasas en *E. faecium*.

De acuerdo a la cuantificación de carbohidratos simples presentes en las agavinas de nuestro estudio, es de considerarse que el crecimiento en agavinas de *E. faecium*, no se deba al bajo porcentaje (7.4%) de mono y disacáridos presentes en el medio de cultivo. Probablemente el bajo crecimiento en agavinas, comparado al crecimiento en glucosa, se mantiene por el consumo de FOS de bajo grado de polimerización, entre la 1-kestosa y la nistosa, cuyas señales desaparecen luego de las 24 h de cultivo, tiempo en el cual se encuentra en fase estacionaria. Estos resultados coinciden con un estudio en el que *E. faecium* crece pobremente en inulina de cadenas cortas (comparado a su fermentación en glucosa), usando fructosa, sacarosa y aprovechando sólo las fracciones con grados de polimerización de entre 3 a 5 (como la 1-kestosa), pero no de cadenas de mayor tamaño (Boger *et al.*, 2018).

Aunque se requieren más estudios para verificarlo, se podría suponer que el metabolismo de agavinas por *E. faecium* es vía hidrólisis y consumo de FOS con GP entre 3 a 5 ya presentes en las agavinas porque aumenta los residuos de mono y disacáridos pero se observa que ya no los consume, por medio de sistemas de transporte específicos seguido de su metabolismo intracelular. Sin embargo, no hay degradación de cadenas con mayor GP, como ocurre en otros sistemas como el de bifidobacterias (Cuevas-Juárez, 2014).

Por otro lado, podemos afirmar, que el crecimiento en el medio tampoco se debe al aprovechamiento de aminoácidos del medio de cultivo como fuente de carbono, ya que el control sin agavinas, no muestra el crecimiento alcanzado con agavinas, que es aproximadamente 4 veces mayor. Por añadidura, el pH también disminuye, lo que confirma el aprovechamiento de la fuente de carbono por acidificación del medio (Ver Tabla 30).

El patrón de degradación entre las dos cepas de *E. faecium* no es diferente entre ellas, sin embargo, si difiere respecto al patrón de *K. pneumoniae* (Figura 28). Cada especie de cepa fermenta las agavinas de manera específica. Pese a esto, los resultados son similares, ya que ambas son: i) incapaces de degradar las agavinas de alto peso molecular, ii) degradan y/consumen oligosacáridos. Estas características de degradación, pueden explicar la diferencia en crecimiento y disminución de pH por *E. faecium* con preferencia de crecimiento en glucosa, de rápida y fácil asimilación, y agavinas de bajo aprovechamiento. Por lo tanto, el poco crecimiento de *E. faecium* en agavinas en comparación con glucosa, se debe a su capacidad limitada de degradación de agavinas, cuya estructura compleja dificulta su hidrólisis.

VII.7.2. PERFIL DE DEGRADACIÓN DE AGAVINAS POR *K. PNEUMONIAE*

**Figura 28. Perfil de degradación de agavinas de las cepas aisladas de *K. pneumoniae*.** La acumulación de productos de degradación se marca con flechas rojas y la disminución o desaparición por el consumo de compuestos se indica en flechas negras.

Los FOS y la inulina son selectivamente utilizados, particularmente por bifidobacterias. Sin embargo, interesantemente, *K. pneumoniae* aislada aumenta conforme la cantidad de agavina aumenta, lo que sugiere que en campo, se enriquece esta bacteria con la agavina. Se ha demostrado que dicha bacteria puede crecer utilizando FOS e inulina como fuente de carbono (Hidaka *et al.*, 1986; Hartemink *et al.*, 1997), pero no se había reportado la degradación de agavinas por *Klebsiella pneumoniae*. Probablemente el perfil de degradación de agavinas en *K. pneumoniae* que difiere del observado en bifidobacterias, se debe a la degradación parcial de las agavinas, con preferencia por oligosacáridos pequeños. Estos resultados coinciden con los previamente reportados por Hartemink *et al.* (1997) observaron que *K. pneumoniae* degradaba oligosacáridos (GF, GF2, GF3, F3, GF4, F4) rápidamente, seguido de la degradación de compuestos de mayor GP (GF5, F5).

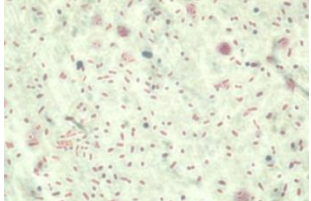
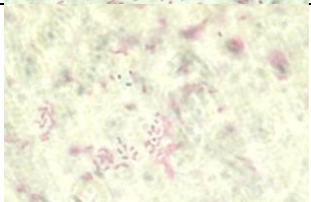

## VII.8. EVALUACION DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

### VII.8.1. PRUEBAS INDIRECTAS DE GOTA SOBRE LA SUPERFICIE DE AGAR

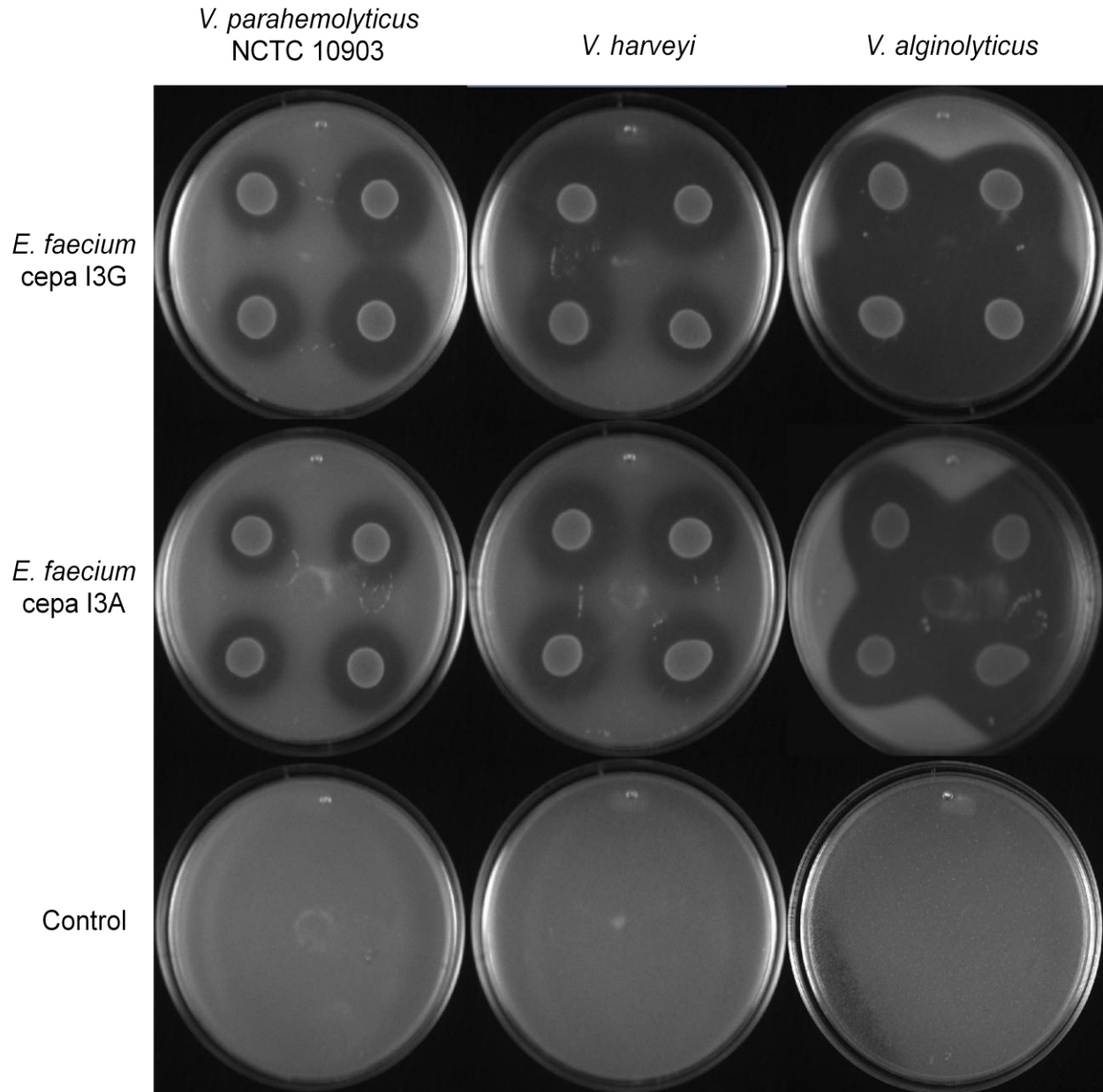
Uno de los criterios de selección de probióticos es que posean capacidad antimicrobiana contra patógenos de interés. Con esta finalidad, se realizaron pruebas de difusión en agar para detectar la posible actividad antimicrobiana contra especies de *Vibrio* conocidas por causar enfermedades en *L. vannamei*.

Como primer paso, se realizó la tinción de Gram de cada microorganismo blanco para confirmar su pureza y su morfología microscópica (Tabla 32).

**Tabla 32. Tinción de Gram de las cepas para el espectro de inhibición.**

Cepa	Microscopía			
	Gram	Forma	Agrupación	Tinción
<i>V. parahemolyticus</i>	-	Bacilos pequeños ligeramente curvados	Sin agrupación definida	
<i>V. harveyi</i> 89375	-	Bacilos curvos muy pequeños	Sin agrupación definida	
<i>V. alginolyticus</i> 98393	-	Bacilos curvos muy pequeños	Sin agrupación definida	

Luego de comprobar la pureza de las cepas de *Vibrio*, se realizó la prueba de gota sobre la superficie de agar. La actividad cualitativa antimicrobiana *in vitro* de las cepas de *E. faecium* contra las bacterias patógenas de *Vibrio*, se muestran en la Figura 29.



**Figura 29. Efecto antimicrobiano célula-célula de las cepas aisladas de *E. faecium* contra *V. parahemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.**

El promedio del diámetro de los halos de inhibición  $\pm \sigma$  (mm) se muestran en la Tabla 33.

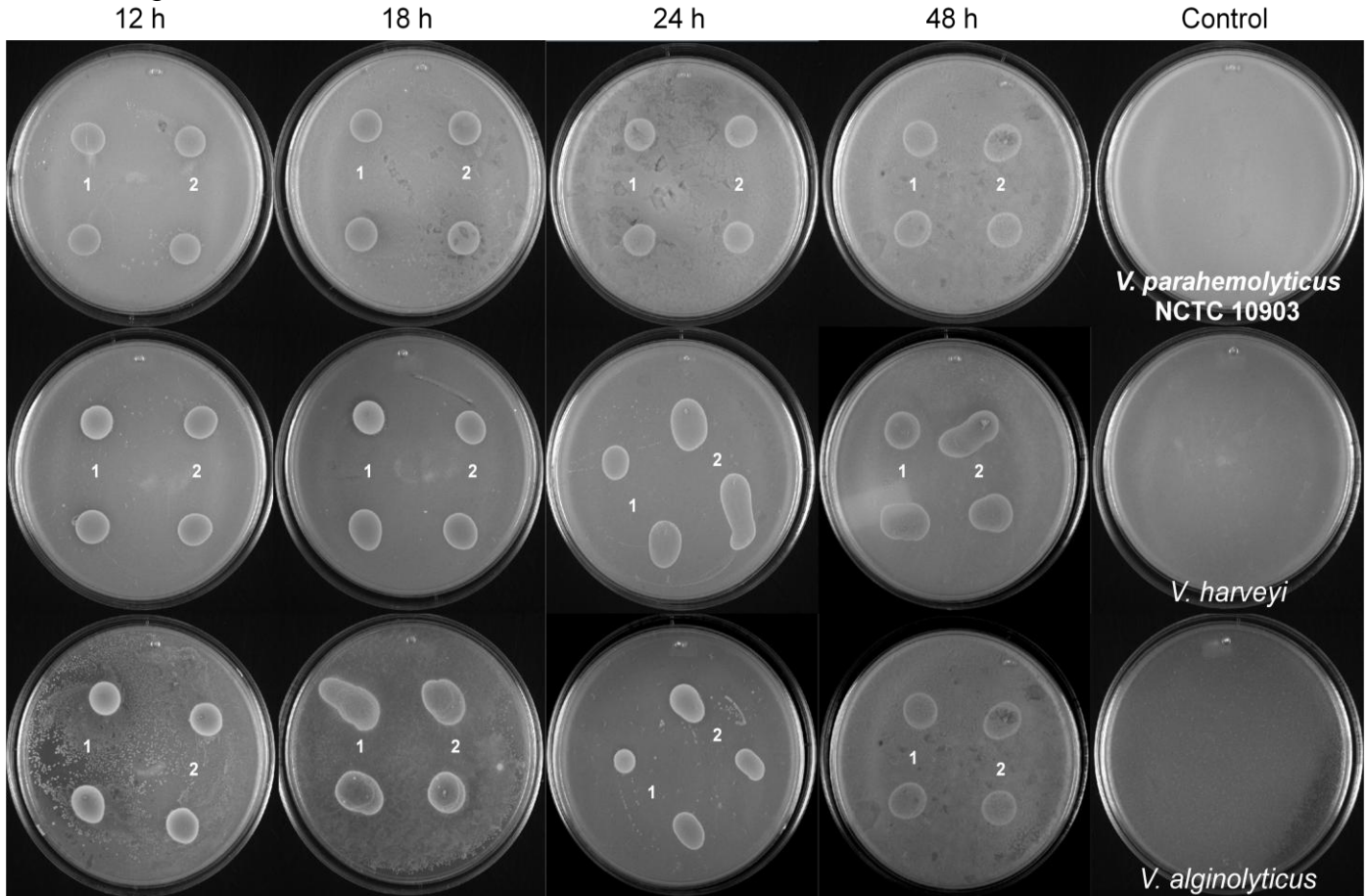
**Tabla 33. Halos de inhibición producidos por las cepas aisladas contra *Vibrio*.**

Patógeno	<i>E. faecium</i> cepa I3G	<i>E. faecium</i> cepa I3A
<i>V. parahemolyticus</i>	12.5 $\pm$ 3	10.0 $\pm$ 1.6
<i>V. harveyi</i>	15.5 $\pm$ 3.4	14.3 $\pm$ 1.3
<i>V. alginolyticus</i>	Los halos de inhibición se omiten debido a la forma heterogénea de la zona de inhibición.	



Sorprendentemente, se obtuvieron halos de inhibición contra los patógenos estudiados *Vibrio parahemolyticus* NCTC 10903, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*. Cepas de *E. faecium* de especies acuáticas también han demostrado actividad antimicrobiana contra patógenos de peces, como *Listonella anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. La actividad antimicrobiana de dichas cepas se ha atribuido no sólo por acción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y diacetilo, sino también a compuestos proteínicos (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013; García-Cano *et al.*, 2014; Olvera-García *et al.*, 2018). Además, no sólo se ha detectado actividad antimicrobiana, sino también actividad antiviral causada por una enterocina como se demostró en una cepa de *E. faecium* aislada de salmón (Todorov *et al.*, 2010; Juturu *et al.*, 2018).

Con la finalidad de determinar *in vitro* si uno de los posibles mecanismos de acción de *E. faecium* como probiótico también se produce cuando los camarones son alimentados con fructanas, se procedió a realizar las pruebas en medio suplementado con agavinas.



**Figura 30. Efecto antimicrobiano célula-célula de las cepas aisladas de *E. faecium* contra *V. parahemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* a diferentes tiempos de crecimiento de *E. faecium* en medio MRS-agavinas. (1) Cepa I3G, (2) Cepa I3A.**

Contrario a lo que se esperaba, no se observaron halos de inhibición con agavinas para ninguna cepa contra ningún patógeno, aún a distintos tiempos de fermentación (Figura 30). Probablemente el bajo crecimiento en agavinas, comparado al crecimiento en glucosa, se mantiene por el consumo de FOS de baja polimerización entre la 1-kestosa y la nistosa y la carencia de enzimas que hidrolicen agavinas y por ende de sistemas de transporte de productos de mayor peso molecular.

Una situación similar se ha reportado también en *E. faecium* al ser capaz de producir compuestos antibacterianos cuando su fuente de carbono es glucosa o melazas que contiene grandes cantidades de azúcares simples (fructosa, glucosa y sacarosa), pero no cuando se emplea bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono, sustrato con contenido casi nulo de azúcares simples. Estas observaciones muestran que la producción de compuestos antibacterianos está estrechamente relacionada con el tipo y cantidad de la fuente de carbono en el medio (Audisio *et al.*, 2001).

Posiblemente lo que sucede *in vivo* es una alimentación cruzada entre cepas probióticas sobre las agavinas, el cual implique que previamente enzimas con actividad glicosil hidrolasa exo o endo actúen sobre los enlaces del polímero de agavina. Los residuos FOS de bajo GP, resultado de la hidrólisis, pueden ser ahora aprovechados para favorecer el crecimiento de otras bacterias con actividad antimicrobiana contra patógenos, por mencionar a *E. faecium*.

A pesar de estos resultados, es claro que las cepas aisladas en este trabajo exhiben propiedades antimicrobianas contra patógenos del camarón blanco del Pacífico causantes de vibriosis y AHPND. Las cepas pueden deber su actividad antimicrobiana a la producción de ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno, pero también se identifican por la producción de bacteriocinas y PGHs de origen proteico. De hecho, la producción de bacteriocinas o PGHs se ha propuesto para la selección de BAL probióticas aplicadas en acuicultura en calidad de alternativas a antibióticos para enfrentar infecciones de origen bacteriano (Desriac *et al.*, 2010).

## VII.9. DETERMINACIÓN DE OTROS FACTORES ANTIMICROBIANOS: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES

### VII.9.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

A fin de descartar la influencia de otros factores antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y reuteriicina en la actividad antimicrobiana, los sobrenadantes del cultivo de las cepas I3G y I3A, tratados y concentrados, como se describió en la Metodología. La producción de compuestos antibacterianos de origen proteínico se da generalmente en baja concentración, por lo que son difíciles de detectar y analizar. Por ello es necesario la cuantificación y concentración de proteínas totales de los sobrenadantes, lo que se logró previa liofilización. Para detectar la actividad de PGHs no es necesario que se encuentren puras, por lo que pueden analizarse los extractos crudos o parcialmente purificados vía precipitación con sulfato de amonio. La cuantificación de proteínas por mediante estas dos estrategias de concentración se muestran en la Tabla 34.

**Tabla 34. Concentración de proteínas de los sobrenadantes crudos y de sus diferentes tratamientos de concentración.**

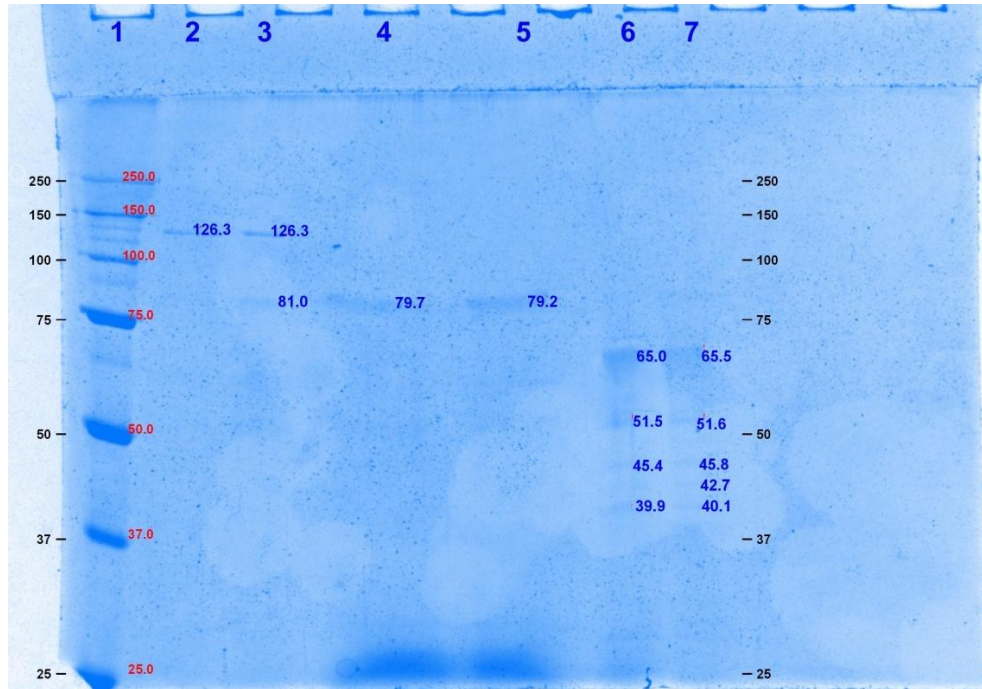
Cepa \ Método de concent.	Sobrenadante neutralizado y $\mu$ filtrado ( $\mu\text{g/mL}$ )	Liofilizado <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>E. faecium</i> cepa I3G	265.6	2,600.0	2,100.0
<i>E. faecium</i> cepa I3A	200.0	4,835.0	8,613.5

<sup>a</sup>Se liofilizaron 25 mL de sobrenadante y se resuspendieron en 2 mL de PBS.

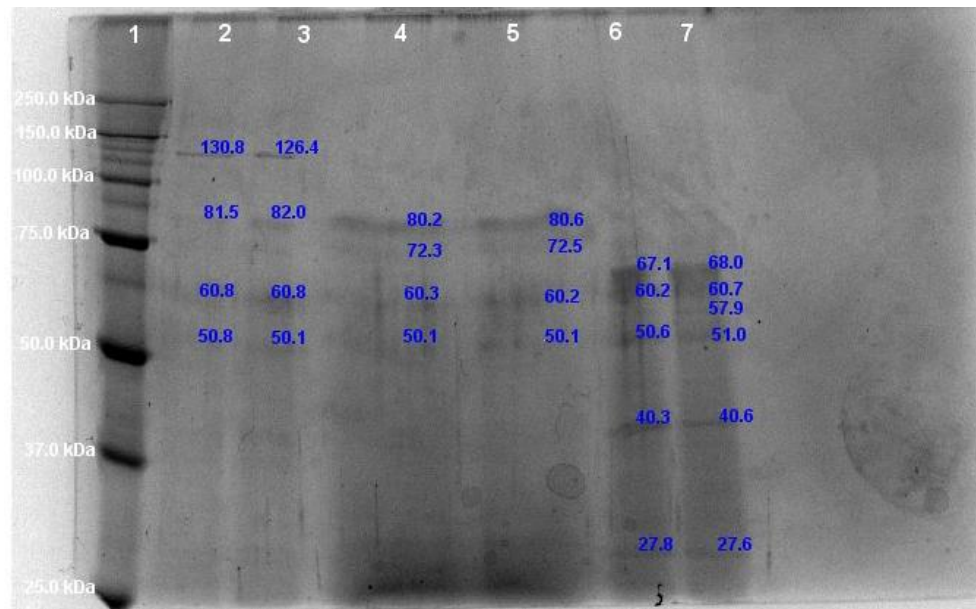
<sup>b</sup>Se precipitaron 75 mL de sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL de PBS.

### VII.9.2. SDS-PAGE

Las muestras de los sobrenadantes de todos los tratamientos se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE, con el propósito de establecer el perfil de proteínas y determinar los pesos moleculares aproximados, además de permitir identificar bandas con actividad antibacteriana mediante zimogramas. El perfil electroforético de las muestras se muestra en la Figura 31 con tinción de Coomassie. Las mismas muestras pero con tinción de plata, se muestran en la Figura 32. La Tabla 35 muestra de forma resumida los pesos moleculares aproximados de los compuestos de naturaleza proteínica.



**Figura 31. Perfil electroforético de los sobrenadantes crudos y tratados de las cepas *E. faecium* I3G e I3A.** (1) marcador de peso molecular, sobrenadantes crudos (2) I3G e (3) I3A, liofilizados (4) I3G e (5) I3A, precipitados con sulfato de amonio (6) I3G e (7) I3A. Gel SDS-PAGE Tris-Glicina 12% con Tinción de Coomassie.



**Figura 32. Perfil electroforético de los sobrenadantes crudos y tratados de las cepas *E. faecium* I3G e I3A.** (1) marcador de peso molecular, sobrenadantes crudos (2) I3G e (3) I3A, liofilizados (4) I3G e (5) I3A, precipitados con sulfato de amonio (6) I3G e (7) I3A. Gel SDS-PAGE Tris-Glicina 12% con Tinción de plata.

**Tabla 35. Pesos moleculares aproximados de las proteínas extracelulares presentes en los sobrenadantes del cultivo de *E. faecium*.**

Sobrenadantes crudos		Liofilizado		Pp con Sulfato de amonio		
	Cepa I3G	Cepa I3A	Cepa I3G	Cepa I3A	Cepa I3G	Cepa I3A
Tinción de Plata	130.8 kDa	126.4 kDa	80.2 kDa	80.6 kDa	67.1 kDa 60.2 kDa 50.6 kDa 40.3 kDa 27.8 kDa	67.1 kDa 60.2 kDa 57.9 kDa 51.0 kDa 40.6 kDa 27.6 kDa
	81.5 kDa	82.0 kDa	72.3 kDa	72.5 kDa		
	60.8 kDa	60.8 kDa	60.3 kDa	60.2 kDa		
	50.8 kDa	50.1 kDa	50.1 kDa	50.1 kDa		
Tinción de Coomassie	126.3 kDa	126.3 kDa 81.0 kDa	79.9 kDa	79.2 kDa	65.0 kDa 51.5 kDa 45.4 kDa 39.9 kDa	65.5 kDa 51.6 kDa 45.8 kDa 42.7 kDa 40.1 kDa

Nota: Las muestras de sobrenadante fueron procesadas según se describe en la Metodología.

Al comparar los perfiles proteínicos de todos los tratamientos de la fase logarítmica tardía, se observan diferentes patrones de bandeo electroforético. Sin embargo, se pueden apreciar bandas similares en todas ellas, por lo que se decidió analizar mediante un zimograma todas las muestras tratadas. Se resalta que, los perfiles electroforéticos de las muestras liofilizadas tienen baja resolución e interferencias de color ámbar dadas por el medio MRS, resultado de reacciones de Maillard, por tratarse de un medio rico en glucosa y peptona. Además, como se puede observar en la Tabla 34, las muestras precipitadas con sulfato de amonio están más concentradas.

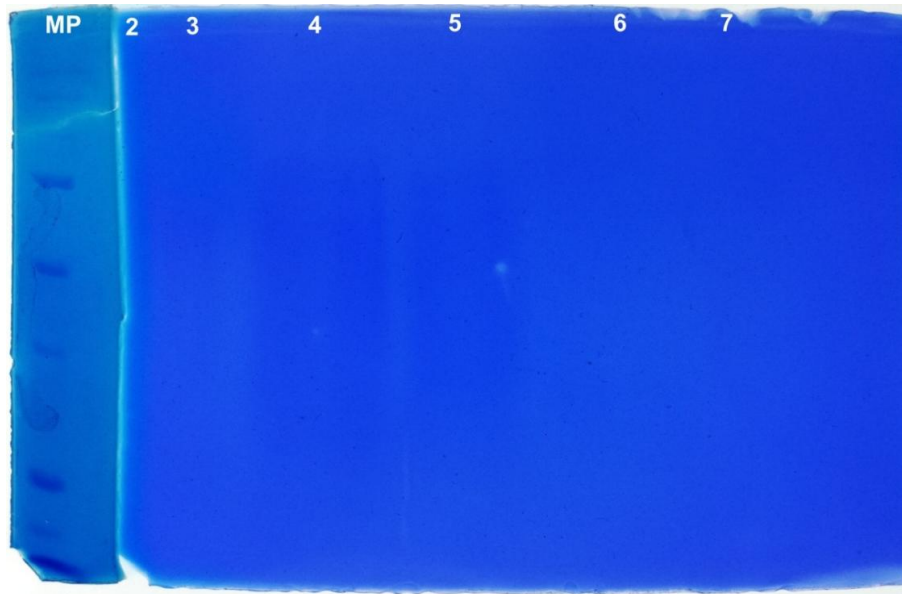
### VII.9.3. ZIMOGRAFÍA

Con el propósito de conocer si la actividad antibacteriana producida por *E. faecium* se debía a la producción de compuestos de naturaleza proteínica, como las bacteriocinas y las enzimas que degradan la pared celular de bacterias (p. ej. PGHs), se aplicó como estrategia de identificación la zimografía.

Curiosamente, se observaron bandas líticas mejor definidas cuando no se aplicó ningún método de semipurificación. Sin embargo, en algunos casos hay bandas en la fracción precipitada con sulfato de amonio, que no se observan en los sobrenadantes crudos. De igual forma, en la fracción precipitada con sulfato de amonio, se observan bandas corridas, por lo que es difícil apreciarlas claramente. Este fenómeno se puede explicar porque en los sobrenadantes, las proteínas extracelulares no tuvieron un tratamiento como las demás (precipitación con sulfato de amonio y un paso de desnaturalización).

La liofilización también desactivó la actividad antimicrobiana de las proteínas, sensibles ya sea a la congelación o al calentamiento que requiere la liofilización a presión reducida. De esta manera, algunas proteínas pudieron perder actividad luego de la precipitación y/o luego de la electroforesis, por añadidura, otras pudieron no renaturalizarse después del paso de desnaturalización, con la pérdida de actividad concomitante.

Adicionalmente, al realizar un primer ensayo de electroforesis con células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (bacteria también conocida como *M. luteus*) embebidas en el gel como prueba presuntiva de identificación de bandas que mostraran actividad lítica en condiciones desnaturalizantes ( $\beta$ -mercaptoetanol y ebullición), no se detectó actividad lítica en ninguna de las cepas (Figura 33), a pesar de la capa delgada de mureína que caracteriza a las células de *M. luteus*. Es probable que las interacciones por puentes disulfuro, rotas por el  $\beta$ -mercaptoetanol, sean fundamentales para mantener la estabilidad y/o actividad lítica de las proteínas. Por tal motivo, las electroforesis en las que se emplearon a los microorganismos blanco como sustrato, se realizaron en condiciones no desnaturalizantes.

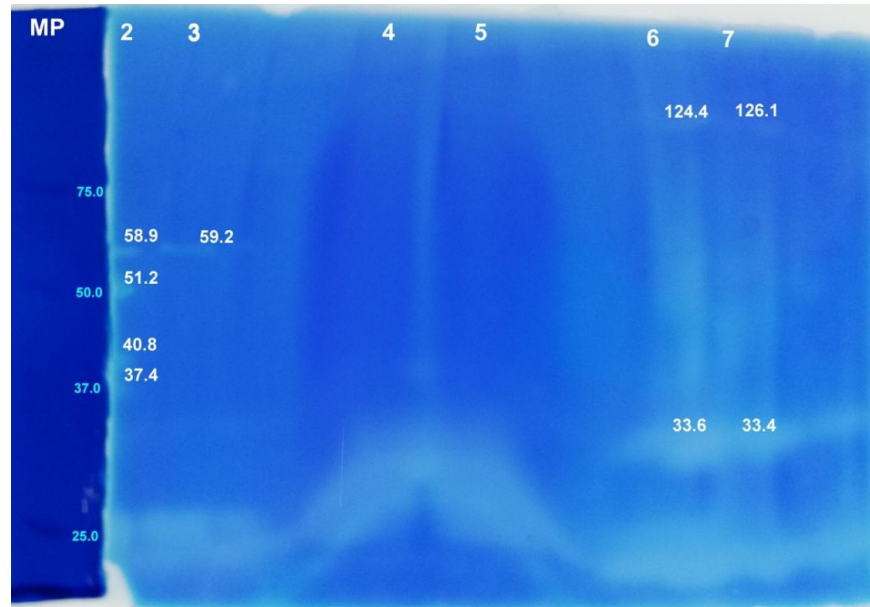


**Figura 33. Zimograma de actividad lítica contra *Micrococcus lysodeikticus*.** Gel SDS Tris-Glicina 12% con *M. luteus* como sustrato incorporado al gel. (MP) marcador de peso molecular. Se aplicaron los sobrenadantes de las cepas de *E. faecium* crudos: (2) cepa I3G, (3) cepa I3A; liofilizados (4) cepa I3G, (5) cepa I3A; y precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80%: (6) cepa I3G, (7) cepa I3A, No se muestran bandas con actividad lítica.

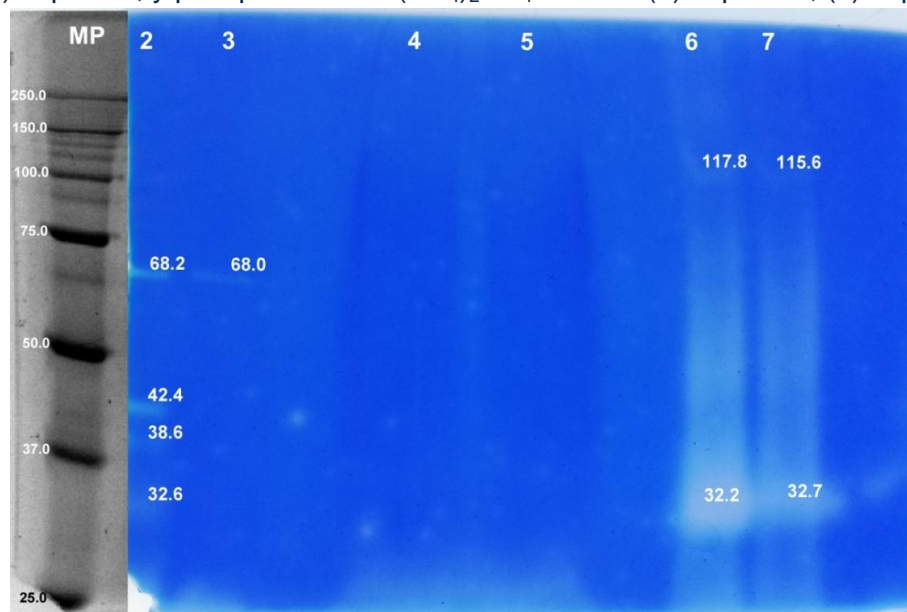
Los zimogramas de las figuras 34 a 36, contra las cepas de *Vibrio* blanco, nos permiten observar la actividad inhibitoria de los extractos de las cepas de *E. faecium*.

Los resultados de estas figuras, demuestran contundentemente la presencia de actividad antibacteriana por la vía de las proteínas extracelulares (Figuras 33, 34 y 35).

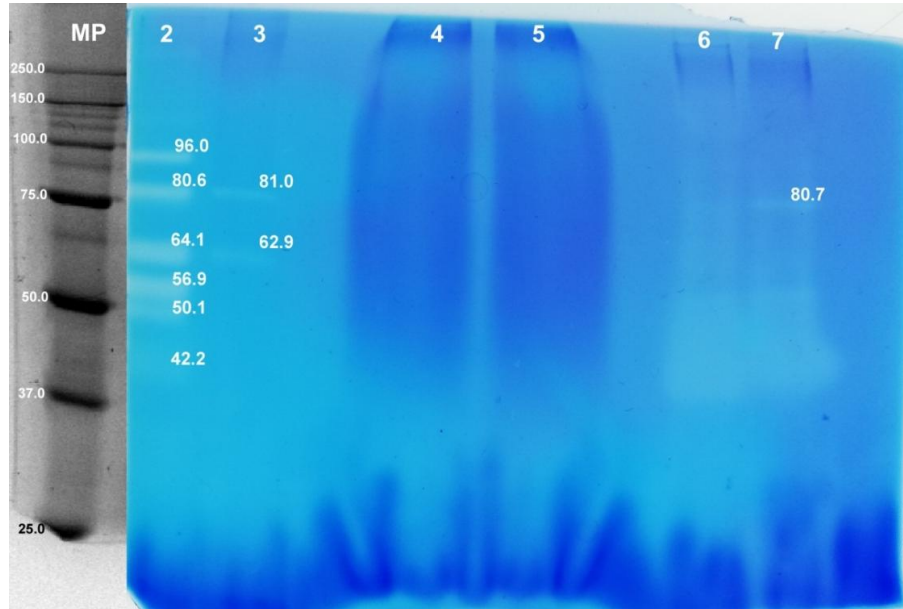




**Figura 34.** Zimograma que muestra actividad lítica de los sobrenadantes crudos y concentrados de *E. faecium* contra células de *V. parahemolyticus*. Gel SDS Tris-Glicina 12% con células de *V. parahemolyticus* incorporadas al gel. La actividad enzimática se muestra como zonas traslúcidas en el gel. (MP) marcador de peso molecular. Se aplicaron los sobrenadantes de las cepas de *E. faecium* crudos: (2) cepa I3G, (3) cepa I3A; liofilizados (4) cepa I3G, (5) cepa I3A; y precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80%: (6) cepa I3G, (7) cepa I3A.



**Figura 35.** Zimograma que muestra actividad lítica de los sobrenadantes de *E. faecium* contra células de *V. harveyi*. Gel SDS Tris-Glicina 12% con células de *V. harveyi* incorporadas al gel. La actividad enzimática se muestra como zonas traslúcidas en el gel. (MP) marcador de peso molecular. Se aplicaron los sobrenadantes de las cepas de *E. faecium* crudos: (2) cepa I3G, (3) cepa I3A; liofilizados (4) cepa I3G, (5) cepa I3A; y precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80%: (6) cepa I3G, (7) cepa I3A.



**Figura 36. Zimograma que muestra actividad lítica de los sobrenadantes crudos y concentrados de *E. faecium* contra células de *V. alginolyticus*.** Gel SDS Tris-Glicina 12% con células de *V. alginolyticus* incorporadas al gel. La actividad enzimática se muestra como zonas traslúcidas en el gel. (MP) marcador de peso molecular. Se aplicaron los sobrenadantes de las cepas de *E. faecium* crudos: (2) cepa I3G, (3) cepa I3A; liofilizados (4) cepa I3G, (5) cepa I3A; y precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80%: (6) cepa I3G, (7) cepa I3A.

Las proteínas extracelulares de ambas cepas de *E. faecium* mostraron actividad bacteriolítica por zimografía contra *V. parahemolyticus*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, mostrando mayor actividad ambas cepas contra *V. alginolyticus*, y mayor número de bandas líticas *E. faecium* I3G frente a todos los microorganismos blanco. En la Tabla 36, se muestra el peso molecular aproximado de las proteínas con actividad lítica de las Figuras 34, 35 y 36.

**Tabla 36. Pesos moleculares aproximados de las bandas con actividad lítica vs *Vibrio*.**

	<i>V. parahemolyticus</i>		<i>V. harveyi</i>		<i>V. alginolyticus</i>	
	Cepa I3G	Cepa I3A	Cepa I3G	Cepa I3A	Cepa I3G	Cepa I3A
Sobrenadantes crudos	58.9 kDa 51.2 kDa 40.8 kDa 37.4 kDa	59.2 kDa	68.2 kDa	68.0 kDa	96.0 kDa 80.6 kDa	81.0 kDa  62.9 kDa
			42.4 kDa 38.6 kDa 32.6 kDa		64.1 kDa 56.9 kDa 50.1 kDa 42.2 kDa	
PP sulfato de amonio	124.4 kDa	126.1 kDa	117.8 kDa	115.6 kDa		80.7 kDa
	33.6 kDa	33.4 kDa	32.2 kDa	32.7 kDa		
	Se observan bandas corridas con actividad lítica. Por lo que no fue posible determinar los pesos moleculares. No se realizaron geles de Tris-Tricina al 16%, específicos para detectar proteínas de bajo peso molecular entre 5 y 20 kDa (Schagger y Von Jagow, 1987).					

La cepa I3G presenta cuatro bandas de actividad lítica tanto para *V. parahemolyticus* como para *V. harveyi*, a diferencia de la cepa I3A que sólo presenta una banda para ambos microorganismos blanco. La mayor actividad lítica se presenta contra *V. alginolyticus*, con seis bandas de actividad por la cepa I3G y dos de la cepa I3A. Dicha diferencia de actividad lítica puede explicarse por la presencia de diferentes proteínas tanto en la cepa I3G como la cepa I3A provenientes de diferentes condiciones de aislamiento en términos de la fuente de carbono, *E. faecium* I3G con glucosa y *E. faecium* I3A con agavinas. Por otro lado, la multiplicidad de las bandas con actividad lítica no necesariamente refleja el número absoluto de autolisinas diferentes, porque las proteínas con actividad lítica pueden ser procesadas proteolíticamente y conservar su actividad enzimática (Dolinger *et al.*, 1989; Bernadsky *et al.*, 1994).

Previamente se han reportado bacteriocinas en su mayoría, y escasos reportes de peptidoglicano hidrolasas (García-Cano *et al.*, 2014) de *E. faecium* antagónicas de patógenos de importancia en alimentos y en salud humana Gram positivos en su mayoría, como *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*,

*Clostridium* spp, *Bacillus* spp, *Propionibacterium* spp. Asimismo, se han detectado compuestos antimicrobianos proteínicos contra bacterias Gram negativas, pese a que la membrana de lipopolisacáridos actúa como una barrera natural frente al ataque de bacteriocinas o PGHs, entre ellas *Salmonella* sp., *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Y. enterocolítica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *P. aeruginosa* y *P. larvae* (García-Cano *et al.*, 2014; Kaškonienė *et al.*, 2017). Los compuestos con actividad bacteriolítica que exhiben las cepas en estudio, pueden deberse a PGHs, compuestos proteínicos que se caracterizan por tener un peso molecular entre 30 a 140 kDa (Olvera-García *et al.*, 2015).

Se trata, de la primera vez que se reporta la posible actividad bacteriolítica de tipo PGHs antagonistas de patógenos de camarón del género *Vibrio*, como mecanismo de acción antimicrobiana en *E. faecium* contra bacterias de significancia en la acuicultura. Para confirmar que se trate de PGHs es necesario llevar a cabo análisis de secuenciación de proteínas extracelulares de las cepas en estudio o la búsqueda de genes que codifiquen para dominios con actividad bacteriolítica en el genoma de los aislados.

Las autolisinas son un grupo de enzimas endógenas que hidrolizan específicamente los enlaces en peptidoglicanos, dañando la integridad de la membrana de mureína. Las enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces covalentes se denominan N-acetilmuramidasa (lisozimas) y N-acetilglucosaminidasa que hidrolizan el enlace  $\beta(1\rightarrow4)$  entre los disacáridos, N-acetilmuramyl-L-alanin amidasa que rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina, endopeptidasas y transglicosilasas que rompen enlaces peptídicos (Ghuysen *et al.*, 1966).

La presencia de bacteriocinas o PGHs en BAL en un probiótico, es una ventaja para en la aplicación *in vivo* e *in vitro* contra bacterias patógenas Gram positivas y negativas, pueden presentar incluso actividad contra bacterias resistentes a antibióticos por su mecanismo de acción único y diferente a los antibióticos (Cotter *et al.*, 2013). De hecho, no sólo representan una potencial aplicación en la

biopreservación de alimentos, sino también en la salud animal y en ambientes acuáticos. Así, es posible aplicar directamente –previa evaluación– los compuestos proteínicos antimicrobianos en vez del microorganismos productor, en este caso *E. faecium* que aún no es considerado GRAS o QPS. Por ejemplo, la actividad de bacteriocinas, péptidos con pesos moleculares generalmente  $\leq 10$  kDa, de modo que en las condiciones probadas en estos experimentos se excluye un grupo importante de proteínas, por lo que es posible exista actividad de enterocinas que también sean responsables de la lisis bacteriana observada para *Vibrio*.

#### VII.10. *Enterococcus*

*Enterococcus faecium* pertenece a uno de los géneros más controversiales del grupo de las BAL. Contrariamente a *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*, no ha sido reconocida como GRAS ni QPS por la FDA y EFSA, respectivamente (EFSA, 2019). Generalmente es un microorganismo comensal que se encuentra en el intestino de animales y humanos. *E. faecium* ha sido reconocida en numerosos estudios (EFSA, 2005; Rychen *et al.*, 2018; Bampidis *et al.*, 2019) por sus beneficios probióticos y es ampliamente utilizada en la industria probiótica. Uno de los principales beneficios de *E. faecium* es que es capaz de sobrevivir el paso en el tracto digestivo y proliferar en el intestino. Promueve la homeostasis en el intestino al competir por los nutrientes que organismos nocivos pueden aprovechar para su crecimiento, también, compite por sitios de adhesión. En el anexo A se presenta un análisis sobre el potencial de aplicación de *E. faecium* como probiótico en general. Se discute la situación regulatoria en diversos países y la eventual posibilidad de que las cepas aisladas repercutan en acuicultura. En concreto, de dicho Anexo B podemos concluir que si bien se trata de una especie patógena en hospitales, resistente a diversos antibióticos, hay diversos enfoques en relación con su aplicación como probiótico, dependiendo del país. Así, mientras que en EUA y Taiwán no se permite el uso del género en general, en Japón y la Unión Europea se aborda el uso de *E. faecium* de manera diferente, se enfoca en demostrar que la cepa es segura al diferenciarla de aquellas de importancia nosocomial. Para ello se debe analizar al interrogar al genoma completo de la cepa a evaluar.

## VIII. CONCLUSIONES

- Con el método experimental planteado para la recuperación de los microorganismos a partir de muestras de intestino de camarón alimentado con una dieta adicionada con fibra se lograron aislar dos géneros bacterianos: *Enterococcus* y *Klebsiella*.
- La secuenciación rDNA 16S permitió definir la naturaleza de la población bacteriana presente en el medio de cultivo para BAL en dos tiempos distintos de fermentación.
- A pesar de que metagenómica ha permitido elucidar el importante rol de la microbiota intestinal en la salud y enfermedad, la tecnología genómica provee de una perspectiva limitada al no poder detectar poblaciones bacterianas menores. En este sentido hemos comprobado que, *Enterococcus faecium* y *Klebsiella pneumoniae* son habitantes de la microbiota intestinal de *L. vannamei*.
- Se logró el aislamiento de dos cepas de la especie *Enterococcus faecium* reportada como potencial probiótico con aplicación en la acuicultura.
- Las cepas aisladas de *Enterococcus faecium* exhiben propiedades antibacterianas de naturaleza proteínica, posiblemente de actividad peptidoglicano hidrolasas (PGHs), contra *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio alginolyticus*, microorganismos patógenos en la acuicultura del camarón *L. vannamei*.
- Debido a que *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista, de amplia distribución ecológica y con carga virulenta considerable, no se considera a las cepas aisladas de *K. pneumoniae* como potenciales probióticas para su aplicación en la acuicultura de *L. vannamei*, debido a las serias complicaciones que involucran su uso.

## IX. PERSPECTIVAS

- Posterior a la anotación del genoma de *Enterococcus faecium* (cepa I3G) llevada a cabo recientemente como parte de este proyecto, realizar la búsqueda de enzimas con actividad fructanasa que repercutan en la degradación de agavinas.
- Identificar los genes responsables de las actividades antibacterianas demostradas en este trabajo.
- Evaluar la seguridad *in vitro* de las cepas de origen acuático, para ello es necesario determinar la patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas, tanto en estudios de su genoma con test aceptados internacionalmente.
- Evaluar *in vitro* el efecto de las cepas en la viabilidad y estimulación de leucocitos de *L. vannamei*.
- Evaluación *in vitro* de las propiedades funcionales y probióticas de las cepas: evaluar su capacidad de sobrevivir en medio acuático, la capacidad de adhesión al mucus del intestino.
- Determinar los compuestos que actúan como antibacterianos, con el fin de elucidar el mecanismo de acción certero frente a los microorganismos patógenos.
- Estudiar la efectividad de la administración de las cepas en experimentos en los que se someta a reto contra *Vibrio parahaemolyticus*.
- Evaluar *in vivo* la seguridad de las cepas para larvas y juveniles de *L. vannamei*.
- Evaluar *in vivo* el efecto de las cepas en la modulación de la expresión de genes de inmunidad.
- Definir las condiciones de producción y manejo de *E. faecium* con vías al estudio de su impacto en las dietas de camarón.

## X. REFERENCIAS

- Akhter, N., Wu, B., Mahmood, A., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, *45*(2), 733–741.
- Alvarado, C., Camacho, R. M., Cejas, R., & Rodríguez, J. A. (2014). Profiling of Commercial Agave Fructooligosaccharides using ultrafiltration and high performance thin layer chromatography. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *13*(2), 417–427.
- Andlid, T., Juárez, R. V., & Gustafsson, L. (1995). Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology: An International Journal*, *30*(3), 321–334.
- Araújo, T. F., & Ferreira, C. L. de L. F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: Safety Concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *56*(3), 457–466.
- Association of American Feed Control Officials (AAFCO). (2018). *2018 AAFCO Annual Meeting Committee Reports. July 30–August 1, 2018 Marriott Harbor Beach Fort Lauderdale, Florida*.
- Audisio, M. C., Oliver, G., & Apella, M. C. (2001). Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, *63*(3), 235–241.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens*. (6.<sup>a</sup> ed.). New York: Springer.
- Ayala Monter, M. A., Hernández Sánchez, D., Pinto Ruiz, R., González Muñoz, S. S., Barcena Gama, J. R., Hernández Mendo, O., & Torres Salado, N. (2018). Prebiotic effect of two sources of inulin on in vitro growth of *Lactobacillus salivarius* and *Enterococcus faecium*. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, *9*(2), 346–361.
- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, *114*(3–4), 173–186.
- Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. D. L., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., Pizzo, F. (2019). Safety and efficacy of Bonvital (*Enterococcus faecium*, DSM 7134) as an additive in water for drinking for sows. *EFSA Journal*, *17*(2), 5612.
- Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(3), 260–265.
- Barati, A., Ghaderpour, A., Chew, L. L., Bong, C. W., Thong, K. L., Chong, V. C., & Chai, L. C. (2016). Isolation and characterization of aquatic-borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*(4), 1–16.
- Barreto, A., Martínez, E., & Herrera, C. (2012). *Manual de infraestructura acuícola*. León: Departamento de Acuicultura UNAN-León.



- Bernadsky, G., Beveridge, T. J., & Clarke, A. J. (1994). Analysis of the sodium dodecyl sulfate-stable peptidoglycan autolysins of select gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of bacteriology*, 176(17), 5225–5232.
- Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., & Marion, D. (1996). Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* VI that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4410–4416.
- Boger, M. C. L., Bueren, A. L. Van, & Dijkhuizen, L. (2018). Cross-Feeding among probiotic bacterial strains on prebiotic inulin involves the extracellular exo-inulinase of *Lactobacillus paracasei* strain W20. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), 1–16.
- Boonthai, T., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2011). Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Nutrition*, 17(6), 634–644.
- Boyd, C. E. (2009). *Codes of practice for responsible shrimp farming*, Global Aquaculture Alliance. EUA.
- Boyd, C. E., Kwei Lin, C., Pantoja, C. R., Lightner, D. V., Brock, J. a., Johnson, K., & Treece, G. D. (2005). *Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo de Camarón*. The David and Lucile Packard Foundation. United States Agency for International Development (Cooperative Agreement No. PCE-A-00-95- 0030-05).
- Burridgea, L., Weis, S. J., CabelloS, F., Pizarro, J., & Bosticke, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306, 7–23.
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685–706.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137–1144.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Dölz, H. J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e127–e133.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917–1942.
- Chiu, C.-H., Guu, Y.-K., Liu, C.-H., Pan, T.-M., & Cheng, W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23, 364-377.

- Chythanya, R., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208(1–2), 1–10.
- Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014). Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Molecular Endocrinology*, 28(8), 1221–1238.
- CONAPESCA. (2017). *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. De [https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_2017.pdf](https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf)
- Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Leonardo-Reza, M., Ochoa-Romo, J. P., & Ochoa-Leyva, A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*, 6(e5382), 1–25.
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., Ochoa-Leyva, A. (2017). Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15.
- Corsin, F., Mohan, C. V, Padiyar, A., Yamamoto, K., Chanratchakool, P., & Phillips, M. (2008). Codes of Practice and Better Management: A Solution for Shrimp Health Management?. En *Disease in Asian Aquaculture VI* (pp. 419–432). Filipinas, Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Corteel, M., & Decamp, O. (2016). *A holistic management approach to EMS*. Global Aquaculture Alliance. Recuperado de <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/a-holistic-management-approach-to-ems/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82oWZBA>
- Crosa, J. (1980). A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature*, 284(5756), 566–568.
- Cuéllar-Anjel J. (2013). *Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)*. The Center for Food Security and Public Health. De <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/parasitic-disease-es.pdf>
- Cuéllar-Anjel, J. (2015). *Enfermedades parasitarias en camarones*. The Center for Food Security and Public Health. De <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/parasitic-disease-es.pdf>
- Cuéllar-Anjel, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A., & García Suárez, O. (2010). *Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco Penaeus vannamei*. OIRSA-OSPESCA, C.A. Panamá: New Concept Publications, Inc.
- Cui, J., Xiao, M., Liu, M., Wang, Z., Liu, F., Guo, L., Liu, C. (2017). Coupling metagenomics with cultivation to select host-specific probiotic micro-organisms for subtropical aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5), 1274–1285.
- De Silva, S. S. (2012). Aquaculture: A newly emergent food production sector-and perspectives of its impacts on biodiversity and conservation. *Biodiversity and Conservation*, 21(12), 3187–3220.

- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., & Fleury, Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*, 8(4), 1153–1177.
- Dolinger, D. L., Daneo-Moore, L., & Shockman, G. D. (1989). The second peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 covalently binds penicillin. *Journal of Bacteriology*, 171(8), 4355–4361.
- Donohue, D., & Salminen, S. (1996). Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 5, 25–28.
- EFSA. (2012). Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal*, 10(5), 2682. Recuperado de <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2682>
- EFSA. (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 2740. Recuperado de <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>
- EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of the product Lactiferm for chickens for fattening for use as a feed additive. *EFSA Journal*, 3(5), 207. Recuperado de <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.207>
- EFSA, Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Herman, L. (2019). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 10: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2019. *EFSA Journal*, 17(7). Recuperado de <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5753>
- EFSA, Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Galobart, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16(3), 1–24. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E. E., Raggi, L., Segovia, L., Merino, E., Gutiérrez-Rios, R. M., ... Sanchez-Flores, A. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Scientific Reports*, 8(1).
- European Food Safety Authority. (2012). Technical guidance -Update of the criteria used in the assessment of bacteria resistance to antibiotics of human or veterinary importance- Prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed. *EFSA Journal*, 732, 1–15.
- Fan, L., Wang, Z., Chen, M., Qu, Y., Li, J., Zhou, A., Zou, J. (2019). Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Science of the Total Environment*, 657, 1194–1204.
- FAO. (2005). Visión General del sector acuícola nacional México. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. En *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [en línea]. Roma. Actualizado el 10 Junio de 2013.

- FAO. (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Vietnam, 25-27 Junio, 2013. En *FAO Fisheries and Aquaculture Report*, 1053, 54 pp.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. En *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.*
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749–1757.
- Flegel, T. W., Lightner, D. V, Lo, C. H. U. F., & Owens, L. (2008). Shrimp Disease Control : Past , Present and Future. En *Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society* (pp. 355–378). Filipinas, Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Flegel, T., & Pasharawipas, T. (1998). Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. En *Advances in shrimp biotechnology* (pp. 245–250). Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Funge-Smith, S., & Briggs, M. (2003). The introduction of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* into the Asia-Pacific region. En *International Mechanisms for the Control and Responsible Use of Alien Species in Aquatic Ecosystems. Report of an Ad Hoc Expert Consultation, 27-30 August 2003, Xishuangbanna, China.*
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Ohta, M. (2003). Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5336–5342.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C. E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., & Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 26–34.
- García-Martos, J. M.-G. P. (1997). Vibrios de origen marino en patología humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 15(7).
- Ghattargi, V. C., Gaikwad, M. A., Meti, B. S., Nimonkar, Y. S., Dixit, K., Prakash, O., Dhotre, D. P. (2018). Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in *Enterococcus faecium* strains. *BMC Genomics*, 19(1), 1–16.
- Ghuysen, J.-M., Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1966). Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods in Enzymology*, 8, 685–699.

- Gibson, G. R., & B.Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics (critical review). *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412.
- González, C. J., Encinas, J. P., García-López, M. L., & Otero, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17(4), 383–391.
- González-Félix, M. L., Gatlin, D. M., Urquidez-Bejarano, P., de la Reé-Rodríguez, C., Duarte-Rodríguez, L., Sánchez, F., ... Perez-Velazquez, M. (2018). Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 491(March), 239–251.
- Hartemink, R., Van Laere, K. M. J., & Rombouts, F. M. (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 83(3), 367–374.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., & Tashiro, Y. (1986). Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria and Microflora*, 5(1), 37–50.
- Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421–433.
- Hou, D., Huang, Z., Zeng, S., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2018). Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 792–799.
- Hu, X., Yang, H. L., Yan, Y. Y., Zhang, C. X., Ye, J. dan, Lu, K. Le, Sun, Y. Z. (2018). Effects of fructooligosaccharide on growth, immunity and intestinal microbiota of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with fish meal partially replaced by soybean meal. *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 194–204.
- Huang, Z., Li, X., Wang, L., & Shao, Z. (2016). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47(6), 1737–1746.
- Huynh, T. G., Hu, S. Y., Chiu, C. S., Truong, Q. P., & Liu, C. H. (2019). Bacterial population in intestines of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed a synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide. *Aquaculture Research*, 50(3), 807–817.
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., Daube, G. (2013). Microbial characterization of probiotics-Advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(8), 1479–1504.
- Hwang, C. Y., Lee, I., Hwang, Y. J., Yoon, S. J., Lee, W. S., & Cho, B. C. (2016). *Pseudoalteromonas neustonica* sp. nov., isolated from the sea surface microlayer of the Ross Sea (Antarctica), and emended description of the genus *Pseudoalteromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3377–3382.

- Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M., & Muroga, K. (1995). *Vibrio penaeicida* sp. nov., a Pathogen of Kuruma Prawns (*Penaeus japonicus*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 134–138.
- Jayasree, L., Janakiram, P., & Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(4), 523–532.
- Johansson, M. W., & Soderhall, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5(6), 171–176.
- Jory, D. E. (1998). Use of probiotics in *Penaeid* shrimp growout. *Aquaculture Magazine*, 24(1), 62–67.
- Jory, D. E. (2018). Summaries of relevant papers presented at annual World Aquaculture Society conference. En *Updates on shrimp diseases AHPND, NHP at Aquaculture America 2018. Global Aquaculture Advocate* (pp. 7–11).
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2187–2200.
- Karunasagar, I., & Ababouch, L. (2012). Shrimp viral diseases, import risk assessment and international trade. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 141–148.
- Karunasagar, I., Vinod, M. G., Kennedy, B., Vijay, A., Deepanjali, A., Umesh, K. R., & Karunasagar, I. (2005). Biocontrol of Bacterial Pathogens in Aquaculture with Emphasis on Phage Therapy. En *Diseases in Asian Aquaculture V* (pp. 535–542). Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbiraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1323–1335.
- Kim, D. H., & Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 513–524.
- Kondo, H., Van, P. T., & Dang, L. T. (2015). Draft Genome Sequence of Non- *Vibrio parahaemolyticus* Acute Diseased Shrimp in Vietnam. *Genome announcements*, 3(5), 2014–2015.
- Landsman, A., St-Pierre, B., Rosales-Leija, M., Brown, M., & Gibbons, W. (2019). Impact of Aquaculture Practices on Intestinal Bacterial Profiles of Pacific Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 7(4), 1–14.
- Lee, C.-T., Chen, I.-T., Yang, Y.-T., Ko, T.-P., Huang, Y.-T., Huang, J.-Y., Lo, C.-F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10798–10803.

- Li, H. dong, Tian, X. li, & Dong, S. lin. (2019). Growth performance, non-specific immunity, intestinal histology and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* fed on a diet supplemented with live cells of *Clostridium butyricum*. *Aquaculture*, 498, 470–481.
- Li, J., Tan, B., & Mai, K. (2009). Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291(1–2), 35–40.
- Li, P., Burr, G. S., Gatlin, D. M., Hume, M. E., Patnaik, S., Castille, F. L., & Lawrence, A. L. (2007). Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in a Recirculating System. *The Journal of Nutrition*, 137(12), 2763–2768.
- Li, P., Burr, G. S., Gatlin, D. M., Hume, M. E., Patnaik, S., Castille, F. L., & Lawrence, A. L. (2018). Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in a Recirculating System. *The Journal of Nutritional Immunology*, 137(12), 2763–2768.
- Li, Y., Liu, H., Dai, X., Li, J., & Ding, F. (2018). Effects of dietary inulin and mannan oligosaccharide on immune related genes expression and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 76(February), 78–92.
- Lightner, D. V. (1993). Diseases of Cultured Penaeid Shrimps. En *Handbook of Mariculture*, (pp 393–486). EUA: CRC Press.
- Lightner, D., Redman, R., Pantoja, C., Noble, B., & Tran, L. (2012). Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 40(January/February).
- Lightner, D. V. (1996). *A handbook of pathology diseases of penaeid shrimp and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*. EUA: World Aquaculture Society.
- Lightner, D. V. (1985). A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and development. En *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps, 4-7 Dec 1984. Filipinas* (pp. 79–103).
- Liu, C.-H., Chiu, C.-H., Wang, S.-W., & Cheng, W. (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4), 699–706.
- Liu, K. F., Chiu, C. H., Shiu, Y. L., Cheng, W., & Liu, C. H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5–6), 837–844.

- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Díaz, G. (2003). molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835–7840.
- Luis-Villaseñor, I. E., Macías-Rodríguez, M. E., Gómez-Gil, B., Ascencio-Valle, F., & Campa-Córdova, Á. I. (2011). Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 321(1–2), 136–144.
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832–7839.
- Martínez-Córdova, R. (1999). *Cultivo de camarones peneidos: principios y prácticas*. España: AGT editor.
- Mastan, S. A., & Begum, S. K. A. (2016). Vibriosis in farm reared White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei* in Andhra Pradesh-Natural Occurrence and Artificial Challenge. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 4(2), 217–222.
- Menon, S. M. (2019). *Functional ingredients driving shrimp feed innovation*. Global Aquaculture Alliance. Recuperado de <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/functional-ingredients-driving-shrimp-feed-innovation/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82oWZBA>
- Morales, V. (1990). *Levantamiento larvario de camarones peneidos. Cartilla de Predepesca*.
- Munn, C. B. (1978). Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*. *FMES Microbiology Letters*, 3, 265–268.
- Muñoz-Atienza, E. (2015). *Caracterización y evaluación in vitro e in vivo de bacterias lácticas de origen acuático como probióticos para el cultivo del rodaballo (Scophthalmus maximus L.)*. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Murata, T., Kawano, M., Igarashi, K., Yamato, I., & Kakinuma, Y. (2001). Catalytic properties of Na<sup>+</sup>-translocating V-ATPase in *Enterococcus hirae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1505(1), 75–81.
- Murata, T., Yamato, I., & Kakinuma, Y. (2005). Structure and Mechanism of Vacuolar Na<sup>+</sup>-Translocating ATPase from *Enterococcus hirae*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(6), 411–413.
- NACA. (2012). *Final Report Asia Pacific Emergency Regional Consultation on the Emerging Shrimp Disease: Early Mortality Syndrome (EMS)/Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS), 9-10 Agosto 2012*. Tailandia: Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific.
- Namikoshi, A., Wu, J. L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., & Muroga, K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 229(1–4), 25–35.



- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspectives, *Fish. Fish & Shellfish Immunology*, 29, 2–14.
- Nayak, S., Singh, S. K., Sreepada, & Ramaiah, N. (2010). Identification of upregulated immune-related genes in *Vibrio harveyi* challenged *Penaeus monodon* postlarvae. *Fish. Fish & Shellfish Immunology*, 29(3), 544–549.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., & Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8–9), 807–825.
- Nguyen, V. D., Pham, T. T., Nguyen, T. H. X., Nguyen, T. T. X., & Hoj, L. (2014). Screening of marine bacteria with bacteriocin-like activities and probiotic potential for ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(1), 49–60.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., & E. Lilius. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15, 43–52.
- Nilsson, L., Ng, Y. Y., Christiansen, J. N., Jørgensen, B. L., Grótinum, D., & Gram, L. (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 133–143.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(1), 81–86.
- Olsson, J. C., Westerdahl, A., Patricia, C., & Kjelleberg, S. (1992). Intestinal colonization potential of Turbot (*Scophthalmus maximus*) - and Dab (*Limanda limanda*) - Associated bacteris with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2), 551–556.
- Olvera, C., Castillo, E., & López-Munguía, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología*, 14, 327–346.
- Olvera-García, M. (2010). *Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos por Enterococcus sp.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- Olvera-García, M., Serrano-Maldonado, E. C., & Quirasco, M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *BioTecnología*, 19(1), 25–43.
- Panigrahi, A., & Azad, I. S. (2007). Microbial intervention for better fish health in aquaculture: The Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(4), 429–440.
- Partida-Arangure, B. O., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., Flores-Miranda, C., & González-Ocampo, H. A. (2013). Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus ( WSSV ) in *Litopenaeus*

- vannamei* cultured under laboratory conditions. *African Journal Of Biotechnology*, 12(21), 3366–3375.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133–146.
- Pilet, M. F., Dousset, X., Barre, R., Novel, G., Desma- Zeaud, M. and Piard, J. C. (1995). Evidence of two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.*, 58, 256–262.
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., & Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3325–3327.
- Raa, J. (1996). The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4, 229–288.
- Ramírez-Martínez, C., & Sánchez, V. (1998). *Una propuesta de Diversificación Productiva en el uso del agua a través de la acuicultura*. Subsecretaría de Pesca. Dirección General de Acuicultura México.
- Ramsey, M., Hartke, A., & Huycke, M. (2014). The Physiology and Metabolism of Enterococci. En *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* (pp. 1–55). Boston, Massachusetts: Eye and Ear Infirmary.
- Reddy, R. S., Swapna, L. A., Ramesh, T., Singh, T. R., Vijayalaxmi, N., & Lavanya, R. (2011). Bacteria in Oral Health – Probiotics and Prebiotics A Review Probiotics Prebiotics CH SH (methyl mercaptan). *International Journal of Biological & Medical Research Int J Biol Med Res*, 2(4), 1226–1233.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., & Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191(4), 271–288.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136.
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Ringø, E. & G. F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(44), 177–203.
- Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 223–230.

- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K., & Rawls, J. F. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J*, 5(10), 1595–1608.
- Romero, J., Gloria, C., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. En *Health and Environment in Aquaculture*. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/antibiotics-in-aquaculture-use-abuse-and-alternatives>
- 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(3), 1–10.
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D. L., Bories, G., Saarela, M. (2018). Efficacy of Cylactin® (*Enterococcus faecium* NCIMB 10415) as a feed additive for pigs for fattening. *EFSA Journal*, 16(3).
- Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 135–143.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379.
- SENASICA. (2003). *Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad Alimentaria*. Mazatlán, Sinaloa, México: CIAD, A.C. Unidad Mazatlán.
- Sha, Y., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Qi, C., & Wang, L. (2016). Bacterial population in intestines of *Litopenaeus vannamei* fed different probiotics or probiotic supernatant. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1736–1745.
- Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., & Wang, B. (2016). Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 452, 28–36.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176–195.
- SIAP. (2018). Atlas agroalimentario 2012-2018. Recuperado de [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018)
- Simões, N., Jones, D., Soto-Rodríguez, S., Roque, A., Gómez-Gil, B. (2002). Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena de larvas de camarones peneidos. Efectos de calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. En *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002*. Cancún, Quintana Roo, México.

- Sindermann, C. (1989). The shell diseases syndrome in marine crustaceans. En *NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-64*. Recuperado de <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/5848/Share>
- Sindermann, C. (1988). Molluscan diseases. En *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*. Amsterdam: Elsevier.
- Sirvas-Cornejo, S., Latchford, J. W., & Jones, D. A. (2007). Effect of microencapsulated diets supplemented with genetically modified bacteria on the growth and survival of *Fenneropenaeus indicus* postlarvae. *Aquaculture Nutrition*, 13(1), 10–16.
- Snydman, D. R. (2008). The Safety of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s2), S104–S111.
- Stoffels, G., Nes, I. F., & Gudmundsdottir, A. (1992). Isolation and properties of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 309–326.
- Struve, C., & Krogfelt, K. A. (2004). Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environmental Microbiology*, 6(6), 584–590.
- Sun, Y., Wang, G., Peng, K., Huang, Y., Cao, J., Huang, W., ... Hu, J. (2018). Effects of dietary xylooligosaccharides on growth performance, immunity and *Vibrio alginolyticus* resistance of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 50(1), 358–365.
- Suo, Y., Li, E., Li, T., Jia, Y., Qin, J. G., Gu, Z., & Chen, L. (2017). Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 63, 87–96.
- Tapia-Paniagua, S. T., Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Esteban, M. Á., Clavijo, E., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2011). Modulation of the Intestinal Microbiota and Immune System of Farmed *Sparus aurata* by the Administration of the Yeast *Debaryomyces hansenii* L2 in Conjunction with Inulin. *Journal of Aquaculture Research & Development*, s1, 1–12.
- Tepaamorndech, S., Chantarasakha, K., Kingcha, Y., Chaiyapechara, S., Phromson, M., Sriariyanun, M., Visessanguan, W. (2019). Effects of *Bacillus aryabhatai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 4–13.
- Todorov, S. D., Wachsman, M., Tomé, E., Dousset, X., Destro, M. T., Dicks, L. M. T., Drider, D. (2010). Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 27(7), 869–879.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., & Gatesoupe, F. J. (2002). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax* larvae). *Aquaculture*, 204, 113–123.

- Trejo Flores, J., Luna Gonzalez, A., Alvarez Ruiz, P., Escamilla Montes, R., Fierro Coronado, J., Peraza Gomez, V., Rubio Castro, A. (2018). Immune related gene expression in *Penaeus vannamei* fed *Aloe vera*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(4), 756–764.
- 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), 1–10.
- Van Schaik, W., Top, J., Riley, D. R., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J. E. P., Schapendonk, C. M. E., Willems, R. J. L. (2010). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*, 11(239), 1–18.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655–671.
- Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F. J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., & Quentel, C. (2006). Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258(1–4), 470–478.
- Wan, L., Wang, J., Gao, F., Yang, S., & Wang, N. (2006). Bacterial flora in intestines of white leg shrimp (*Penaeus vannamei* Booen). *Fisheries Science*, 25, 13–15.
- Wang, Y. B. (2007). Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269(1–4), 259–264.
- Wang, Y. B., Tian, Z. Q., Yao, J. T., & Li, W. fen. (2008). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277(3–4), 203–207.
- Wang, Y., & Gu, Q. (2010). Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Marine Biology Research*, 6(3), 327–332.
- Wangman, P., Longyant, S., Taengchaiyaphum, S., Senapin, S., Sithigorngul, P., & Chaivisuthangkura, P. (2018). PirA & B toxins discovered in archived shrimp pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks. *Aquaculture*, 497, 494–502.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- WHO. (2014). *Antimicrobial Resistance: Fact sheet*. (194), 1–7.
- Wickins, J. F., & Lee, D. (2002). *Crustacean Farming: Ranching and Culture*. (2.<sup>a</sup> ed.). Oxford: Editorial Blackwell Science.
- Wiegel, J., Tanner, R., & Rainey, F. (2006). An introduction to the Family *Clostridiaceae*. En *The Prokaryotes* (pp 654-678). New York: Springer.

- Wu, S., Gao, T., Zheng, Y., Wang, W., Cheng, Y., & Wang, G. (2010). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 303, 1–7.
- Wu, S., Wang, G., Angert, E. R., Wang, W., Li, W., & Zou, H. (2012). Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PLoS ONE*, 7(E30440).
- Yang, Y., Chen, I., Lee, C., Chen, C., Lin, S., Hor, L., Huang, Y. (2014). Draft Genome Sequences of Four Strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause Early Mortality Syndrome / Acute. *Genome*, 2(5), 2–3.
- Yun, J. W., Kim, D. H., Kim, B. W., & Song, S. K. (1997). Production of inulo-oligosaccharides from inulin by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas* sp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(4), 369–371.
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, 5(e3986).
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., & Xu, D. (2012). Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4), 1027–1032.
- Zhang, J., Jiang, R. B., Zhang, X. X., Hang, B. J., He, J., & Li, S. P. (2010). *Flavobacterium haoranii* sp. nov., a cypermethrin-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2882–2886.
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Li, E. (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434, 449–455.
- Zhang, M., Sun, Y., Liu, Y., Qiao, F., Chen, L., Liu, W. T., Li, E. (2016). Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. *Aquaculture*, 454, 72–80.
- Zhao, J. S., Manno, D., Leggiadro, C., O'Neil, D., & Hawari, J. (2006). *Shewanella halifaxensis* sp. nov., a novel obligately respiratory and denitrifying psychrophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 205–212.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 501–509.
- Zhou, Z., Ding, Z., & Huiyuan, L. V. (2007). Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 296–301.

## XI. ANEXO A

## 1. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MRS (BD DIFCO) Y MRS MODIFICADO

MRS BD Difco		Medio MRS modificado	
Lactobacilli MRS Broth		Agavinas al 2%	
Peptona de proteosa No.3	10.0 g	Peptona Bacteriológica (Oxoid)	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g	Extracto de levadura (Difco)	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g	Agavina	20.0 g
Glucosa	20.0 g	Tween 80	1 mL
Polisorbato 80	1.0 g	Citrato de amonio	2.0 g
Citrato de amonio	2.0 g	Acetato de sodio	5.0 g
Acetato de sodio	5.0 g	Sulfato de magnesio	0.2 g
Sulfato de magnesio	0.2 g	Sulfato de manganeso	0.05 g
Sulfato de manganeso	0.05 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g
Fosfato dipotásico	2.0 g	L-Cisteína-HCl	0.5 g
L-Cisteína-HCl	0.5 g	pH	6.0-6.5
pH	6.5±0.2		
Preparación 1. Disolver 55 g/L en agua destilada. 2. Mezclar hasta que esté completamente disuelto. 3. Ajustar pH con NaOH al 1% o HCl al 1% 4. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C		Preparación 1. Pesar los componentes individualmente. 2. Disolver en agua destilada. 3. Mezclar hasta que esté completamente disuelto. 4. Ajustar pH con NaOH al 1% o HCl al 1% 5. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C	

## 2. REACTIVOS PARA LA ELABORACIÓN DE GELES SDS-PAGE GLICINA

### 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tris base	18.15 g
Agua desionizada	100 mL
Disolver tris base en agua desionizada, ajustar a pH 8.8 y almacenar a 4 °C	

### 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tris base	6.0 g
Agua desionizada	100 mL
Disolver tris base en agua desionizada, ajustar a pH 6.8 y almacenar a 4 °C	

### Solución de acrilamida al 30% (w/v)

Formulación	Para 100 mL de preparación
Acrilamida	29.2 g
N´N´-bis-metilen-acrilamida	0.8 g
Agua desionizada	100 mL
Pesar la acrilamida N´N´-bis-metilen-acrilamida y disolverlos en agua desionizada. Ajustar a pH 8.8 y almacenar a 4 °C protegido de la luz	

### SDS al 10% (w/v)

Formulación	Para 100 mL de preparación
SDS	10.0 g
Agua desionizada	100 mL
Disolver SDS en agua desionizada y caliente, almacenar a temperatura ambiente.	

### Persulfato de amonio (APS) al 10% (w/v)

Formulación	Para 1 mL de preparación
APS	100.0 mg
Agua desionizada	1 mL
Disolver y homogeneizar APS en agua desionizada, almacenar a -20 °C	



## Buffer de carga

Formulación	Para 9.5 mL de preparación
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL
Glicerol	2.5 mL
SDS 10% (w/v)	2.0 mL
Azul de bromofenol 0.5% (w/v)	0.2 mL
Agua desionizada	3.55 mL
a) Disolver y homogeneizar 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol y agua desionizada. b) Adicionar a la mezcla la solución de SDS al 10%, agitando suavemente. c) Adicionar azul de bromofenol 0.5% (w/v). d) Realizar alícuotas y adicionar, en su caso, la cantidad correspondiente de $\beta$ -mercaptoetanol. Almacenar a 4 °C. NOTA: Por cada 950 $\mu$ L de buffer de carga, adicionar 50 $\mu$ L de $\beta$ -mercaptoetanol antes de utilizar. Diluir la muestra al menos 1:2 con el buffer	

## Buffer de corrida o tanque desnaturizante 10X, pH 8.3

Formulación	Para 1 L de preparación
Tris base	30.3 g
Glicina	144.0 g
SDS	10.0 g
Agua desionizada	1 L
a) Adicionar la glicina poco a poco en ~800 mL de agua desionizada hasta disolver por completo. b) Adicionar tris base hasta disolver y llevar a 1 L con agua desionizada. c) Adicionar poco a poco SDS hasta disolver completamente. Almacenar a 4°C	

## 3. TINCIÓN DE AZUL DE COOMASIE

## Reactivos para la Tinción de Coomasie

## Solución teñidora de azul de Coomasie

Formulación	Para 1 L de preparación
Ácido acético	100 mL
Metanol-Agua desionizada (1:1)	900 mL
Azul de Coomasie G-250	2.5 g
Adicionar y homogeneizar metanol, ácido acético glacial y agua desionizada. Disolver al Azul de Coomasie. Almacenar a temperatura ambiente.	

## Solución desteñidora

Formulación	Para 100 mL de preparación
Metanol	10 mL
Ácido acético glacial	10 mL
Agua desionizada	80 mL
Adicionar y homogeneizar metanol, ácido acético glacial y agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.	

**Pasos para la Tinción de Coomasie**

1. Colocar el gel en un recipiente y agregar solución teñidora durante 18 h con agitación constante y cubierto con aluminio.
2. Retirar la solución teñidora y realizar dos lavados con agua desionizada con agitación constante durante 10 min.
3. Retirar el agua de lavado y la adicionar la solución desteñidora. Dejar actuar toda la noche.
4. Retirar la solución desteñidora y enjuagar dos veces con agua destilada.

## 4. TINCIÓN DE PLATA DEL GEL SDS-PAGE

**Reactivos para la Tinción de plata**

## Solución fijadora

Formulación	Para 300 mL de preparación
Etanol	30%
Ácido acético glacial	10%
Agua desionizada	300 mL
Adicionar y homogeneizar etanol, ácido acético glacial y agua desionizada.	

## Solución de nitrato de plata

Formulación	Para 200 mL de preparación
AgNO <sub>3</sub>	0.1%
Agua desionizada	200 mL
Adicionar y homogeneizar el nitrato de plata y agua desionizada.	

## Solución reveladora

Formulación	Para 300 mL de preparación
Carbonato de sodio	3%
Formaldehído	0.13%
Agua desionizada	300 mL
Adicionar y homogeneizar carbonato de sodio y agua desionizada. Adicionar al final el formaldehído.	

## Solución de paro

Formulación	Para 300 mL de preparación
Ácido acético glacial	10%
Agua desionizada	300 mL
Adicionar y homogeneizar ácido acético glacial y agua desionizada.	

**Pasos para la Tinción de plata**

5. Colocar el gel en un recipiente y agregar solución fijadora durante 18 h con agitación constante y cubierto con aluminio.
6. Retirar la solución fijadora y lavar dos veces con etanol al 30% (v/v) durante 30 min.
7. Realizar dos lavados con agua desionizada con agitación constante durante 10 min.
8. Retirar el agua de lavado y adicionar la solución de nitrato de plata (0.1%) dejando agitar por 30 min y sin que reciba luz directamente.
9. Retirar la solución de nitrato de plata y realizar dos lavados con agua desionizada con agitación constante durante 40 s.
10. Retirar el agua de lavado, asegurándose de que no queden restos de nitrato de plata en el recipiente.
11. Adicionar la solución reveladora (preparada al momento) con agitación constante, hasta observar bandas.
12. Retirar la solución reveladora y enjuagar dos veces con agua.
13. Adicionar solución de paro con agitación constante.

## XII. ANEXO B

## 1. ASIGNACIÓN TAXONÓMICA A NIVEL ESPECIE DE LAS MUESTRAS DEL INTESTINO 1 POR MEDIO DE LA SECUENCIACIÓN DEL 16S

TABLA XII.1. ASIGNACIÓN CON LA BASE DE DATOS GREEN GENES

OTU	Abundancia relativa		OTU	Abundancia relativa	
	0 h	6 h		0 h	6 h
f_Acidobacteriaceae;g__;s__	0.014%	0.010%	g_Clostridium;s__butyricum	0.042%	0.020%
g_Brevibacterium;s__casei	0.281%	0.117%	g_Clostridium;s__gasigenes	0.063%	0.046%
g_Corynebacterium;s__	0.611%	0.414%	g_Clostridium;s__perfringens	0.169%	0.101%
f_Microbacteriaceae;g__;s__	0.021%	0.023%	g_Clostridium;s__sardiniense	0.021%	0.013%
o_Sphingobacteriales;f__;g__;s__	0.049%	0.000%	g_Sarcina;s__	0.063%	0.007%
g_Sediminibacterium;s__	0.267%	0.003%	f_Lachnospiraceae;g__;s__	0.049%	0.010%
o_Stramenopiles;f__;g__;s__	0.000%	0.013%	g_Epulopiscium;s__	0.028%	0.013%
o_Bacillales;f__;g__;s__	0.007%	0.033%	f_Peptostreptococcaceae;g__;s__	0.534%	0.372%
f_Bacillaceae;g__;s__	0.007%	0.007%	f_Ruminococcaceae;g__;s__	0.077%	0.049%
g_Bacillus;s__	0.007%	0.016%	g_Faecalibacterium;s__prausnitzii	0.000%	0.010%
g_Bacillus;s__horti	0.007%	0.020%	g_Ruminococcus;s__	0.014%	0.016%
g_Bacillus;s__mannanilyticus	0.007%	0.029%	f_Mogibacteriaceae;g__;s__	0.928%	0.603%
g_Paenibacillus;s__	0.401%	0.847%	g_GW-34;s__	0.007%	0.007%
o_Lactobacillales;f__;g__;s__	0.358%	0.887%	g_Coprobacillus;s__cateniformis	0.042%	0.007%
g_Granulicatella;s__	0.007%	0.023%	c_Alphaproteobacteria;o__;f__;g__;s__	0.014%	0.003%
f_Enterococcaceae;g__;s__	0.520%	0.463%	o_Rhizobiales;f__;g__;s__	0.028%	0.003%
g_Enterococcus;s__	33.111%	56.949%	g_Bradyrhizobium;s__	0.077%	0.010%
g_Enterococcus;s__casseliflavus	0.288%	0.355%	f_Phyllobacteriaceae;g__;s__	0.028%	0.000%
g_Enterococcus;s__cecorum	0.124%	0.070%	g_Defluviobacter;s__	0.112%	0.010%
g_Enterococcus;s__haemoperoxidus	0.134%	0.212%	g_Mesorhizobium;s__	0.049%	0.003%
g_Melissococcus;s__plutonius	0.007%	0.016%	g_Agrobacterium;s__	0.035%	0.003%
g_Vagococcus;s__	0.014%	0.026%	f_Pelagibacteraceae;g__;s__	0.007%	0.007%
g_Vagococcus;s__salmoninarum	0.323%	0.668%	o_Sphingomonadales;f__;g__;s__	0.260%	0.010%
g_Lactobacillus;s__	0.014%	0.007%	f_Sphingomonadaceae;g__;s__	0.134%	0.007%
f_Streptococcaceae;g__;s__	0.232%	0.479%	g_Kaistobacter;s__	0.021%	0.000%
g_Lactococcus;s__	1.391%	2.937%	g_Sphingomonas;s__	0.162%	0.003%
g_Lactococcus;s__garvieae	0.372%	0.557%	g_Sphingopyxis;s__alaskensis	0.010%	0.084%
g_Streptococcus;s__	0.794%	1.473%	g_Variovorax;s__paradoxus	0.098%	0.003%
c_Clostridia;o__;f__;g__;s__	0.049%	0.078%	f_Campylobacteraceae;g__;s__	0.014%	0.003%
o_Clostridiales;f__;g__;s__	0.014%	0.023%	f_Helicobacteraceae;g__;s__	0.000%	0.010%
f_Clostridiaceae;g__;s__	50.495%	27.850%	f_Alteromonadaceae;g__;s__	0.098%	0.059%
g_Caloramator;s__	0.021%	0.007%	f_Enterobacteriaceae;g__;s__	0.028%	0.026%
g_Candidatus Arthromitus;s__	0.007%	0.000%	g_Pseudomonas;s__	0.625%	0.020%
g_Clostridium;s__	6.134%	3.872%	g_Pseudomonas;s__viridiflava	0.049%	0.003%

TABLA XII.2. ASIGNACIÓN CON LA BASE DE DATOS METAXA2

OTU	Abundancia relativa (6 h)	OTU	Abundancia relativa (6 h)
g_Afipia_genosp._11	0.026%	g_Enterococcus;s__phoeniculicola	7.636%
g_Afipia_genosp._4	0.007%	g_Enterococcus;s__pseudoavium	0.785%
g_Bacillus;s__pumilus	0.118%	g_Enterococcus;s__raffinosis	0.007%
g_Bacillus_sp._B5-4b	0.366%	g_Enterococcus;s__ratti	0.072%
g_Bacillus_sp._G5-6b	0.075%	g_Enterococcus;s__saccharolyticus	0.029%
g_Bacillus_sp._S110(3)-1	0.072%	g_Enterococcus;s__silesiacus	0.042%
g_Bosea;s__vestrisii	0.010%	g_Enterococcus;s__sulfureus	0.010%
g_Bosea_sp._MF18	0.007%	g_Enterococcus;s__thailandicus	0.196%
g_Clostridium;s__baratii	27.979%	g_Enterococcus;s__faecium	52.068%
g_Clostridium;s__moniliforme	0.082%	g_Enterococcus_sp._AK61	0.356%
g_Clostridium;s__quinii	0.007%	g_Enterococcus_sp._Fn2	0.013%
g_Clostridium;s__sardiniense	0.023%	g_Enterococcus_sp._M1T7B1	0.029%
g_Clostridium;s__septicum	0.007%	g_Enterococcus_sp._P8403	0.016%
g_Clostridium_sp.	7.803%	g_Enterococcus_sp._PPC15	0.026%
g_Enterococcus;s__bacterium_74	0.007%	g_Enterococcus_sp._SI8(2011)	0.297%
g_Enterococcus;s__bacterium_Te49A	0.013%	g_Enterococcus_sp._YL4	0.010%
g_Enterococcus;s__bacterium_Te51A	0.150%	g_Lytechinus;s__variegatus_(green_sea_urchin)	0.007%
g_Enterococcus;s__bacterium_Te6A	0.059%	g_Mesorhizobium;s__loti	0.010%
g_Enterococcus;s__canis	0.016%	g_Mesorhizobium_sp._mat904	0.007%
g_Enterococcus;s__casseliflavus	0.209%	g_Pedomicrobium_australicum	0.007%
g_Enterococcus;s__dispar	0.912%	g_Pseudomonas;s__poae	0.010%
g_Enterococcus;s__durans	0.121%	g_Pseudomonas_sp._MAN_1	0.010%
g_Enterococcus;s__faecalis	0.010%	g_Sphingomonas_sp._BR12257	0.023%
g_Enterococcus;s__italicus	0.010%	g_Vagococcus;s__carniphilus	0.010%
g_Enterococcus;s__mundtii	0.062%	g_Vibrio;s__parahaemolyticus	0.007%

## 2. ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE *E. faecium* COMO PROBIÓTICO PARA LA ACUICULTURA.

Algunas cepas de *E. faecium* pueden ser patógenas y nocivas para los humanos, causando bacteriemia, endocarditis, infecciones urinarias y otras enfermedades. Además, se ha reportado AMR a varios antibióticos comúnmente usados, sin mencionar que *E. faecium* es el principal agente causal de infecciones enterocócicas en humanos resistentes a múltiples fármacos. Su virulencia aún no es completamente bien conocida, sin embargo, la presencia de adhesinas, hemolisinas, hialuronidasas y gelatinasas son factores putativos de virulencia. Los genes de virulencia pueden ser transferidos por plásmidos conjugativos o transposones a cepas endógenas presentes en el tracto gastrointestinal del camarón, contribuyendo al incremento de los factores de virulencia del género y de cepas endógenas.

La bioseguridad de *E. faecium* como probiótico en la industria alimenticia es cuestionada precisamente por ser propensa a desarrollar y adquirir determinantes AMR, en especial de vancomicina y ampicilina. La FDA estadounidense y taiwanesa sustentan que la resistencia antimicrobiana puede ser transferida de bacterias wild-type residentes en el intestino a probióticos en su tránsito a través del intestino. Demostrar que una cepa probiótica es segura es complicado. Sin embargo, las cepas seguras no pueden transmitir AMR si no poseen genes de virulencia o toxicidad, por ello, el riesgo de adquirir y consecutivamente diseminar AMR por cepas seguras de *E. faecium*, es prácticamente bajo.

Existen diferentes puntos de vista y enfoques regulatorios de *E. faecium* alrededor del mundo. La FDA taiwanesa prohíbe el uso de *E. faecium* como suplemento alimenticio. En EUA, la bioseguridad de los microorganismos es evaluada a nivel especie y no a nivel cepa, así, cuando algún miembro de la especie es considerado patógeno para humanos, la especie completa es considerada inapropiada como ingrediente alimenticio; *E. coli*, *E. faecalis* y *E. faecium* no se permiten. Este enfoque rígido es tomado debido a la falta de un consenso que permita validar métodos científicos que sean capaces de distinguir entre cepas patógenas de las no patógenas, o prevenir transferencia horizontal de genes entre miembros de la misma especie.

La Unión Europea aborda el uso de *E. faecium* de manera diferente, se enfoca en demostrar que la cepa es segura al diferenciarla de aquellas de importancia nosocomial. La EFSA y las industrias alimenticias reconocen que *E. faecium*, al igual que otras BAL y *Bacillus spp.* están presentes en alimentos fermentados, suplementos alimenticios y preparaciones farmacéuticas. Este abordaje, permite el uso de microorganismos conocidos en alimentos y suplementos al demostrar que son seguros y que no contribuyen al *pool* genético microbiano de AMR. En 2018 la EFSA publicó una versión para la caracterización de microorganismos, en el que se incluye a *E. faecium* (EFSA, 2012; EFSA, 2018). En la versión se divide a *E. faecium* en dos subgrupos: el primero agrupa a aislados de heces de individuos sanos, susceptibles a ampicilina, el segundo incluye a los provenientes de cuadros nosocomiales resistentes a ampicilina. Los factores de virulencia y marcadores *IS16*, *hylEfm* y *esp* son considerados relevantes para su evaluación. Se deben de analizar al interrogar el genoma completo de la cepa a evaluar, además, la CMI a varios antibióticos debe ser determinada.

El problema radica en la inexistencia de regulaciones respecto al uso de microorganismos en varios países, por lo que es mejor prohibir el uso de la especie *E. faecium* en vez de asegurar el uso de microorganismos demostrados como seguros. Sin embargo, se puede superar este problema al proporcionar una correcta asesoría a la industria, similares a las establecidas en la Unión Europea (EFSA), mediante la implementación de legislaciones para la regulación de microorganismos, lo que la forzará a ser más responsable por inspecciones continuas.

Si *E. faecium* es evaluada como segura, sin genes de virulencia o toxinas, con bajo riesgo de contribuir al *pool* de genes de resistencia a antibióticos, no hay razón lógica para no permitir su uso. Los operadores de la cadena de producción deben asegurar que las cepas sean seguras antes de comercializarlas, con estándares de alto nivel y técnicas validadas. De esta manera, las industrias alimenticia, alimentaria y farmacéutica deben ser proactivas para evitar una respuesta inapropiada a la gestión de riesgos por parte de científicos y reguladores.