



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DEL SISTEMA DIGESTIVO EN EL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*

TESIS

que para obtener el grado académico de

**MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(Biología Marina)**

Presenta

Biol. LUIS EMANUEL AVILÉS GÓMEZ

Directora de Tesis: Dra. María Leticia Arena Ortiz

Comité Tutorial: Dr. Ernesto Pérez Rueda
Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez
Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera
Dr. Juan José Alpuche Osorno

Sisal, Yucatán, México 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS.

A mi esposa Elsy por todo su apoyo, comprensión, cariño y sobre todo por estar conmigo incondicionalmente.

A mis padres: Angel y Alma, por el apoyo y consejos, pero sobre todo por permitirme estar en esta vida.

A mis hermanos: Nancy, Delsy, Andres, Jose, y Jesús, por sus consejos y la confianza que me brindaron.

A la Dra. Maria Leticia Arena Ortiz y a su familia, por todo el apoyo brindado.

En memoria de Avelino, que se adelantó en el camino. Y en donde se encuentre estará feliz por este logro.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por todas las bendiciones que me ha brindado y por guiarme en alcanzar esta gran meta.

A mis padres por el don de la vida, por todo su apoyo y consejos.

A Nancy, Elut, Gaby y Jesús por todas las vivencias que hemos tenidos y por sus consejos.

A Delsy, Luis, Zahia y Romary, por toda la ayuda que me han brindado.

A Andres, Mary, Arlet y Rogelio, por estar siempre conmigo.

A Jose, Susi y Angel, por su ayuda y consejos incondicionales.

A Jesús por su apoyo y compañía.

A la UNAM y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por permitirme desarrollarme académicamente.

A Gerardo y Adolfo, por la amistad que nos une y por estar apoyándome en las buenas y en las malas.

A Nancy, Esther, Lenin, Nico, Leticia, Claudia, por su amistad, apoyo, y por qué siempre estamos para apoyarnos, muchísimas gracias.

A Karla Susana Escalante, por su amistad y por sus asesorías en el laboratorio.

A mis tutores: Ernesto Perez Rueda, Luis Maldonado Manjarrez, Rafael Rojas Herrera, Bruno Gómez Gil, Juan Alpuche Osorno, por sus observaciones y consejos en la elaboración de la tesis.

Al técnico Manuel Valenzuela y Gemma Leticia Moreno, por su apoyo en la obtención de los camarones y en acondicionamiento del experimento.

Pero sobre todo a Leticia Arena por su amistad, confianza, por abrirme las puertas de la UNAM, y sobre todo por su apoyo incondicional en la elaboración de la tesis, solo me queda decirle, graciassssssssssssss.

Las masas humanas más peligrosas
son aquellas en cuyas venas
ha sido inyectado el veneno del miedo....
del miedo al cambio.

Octavio Paz.

"No, el éxito no se lo deseo a nadie.
Le sucede a uno lo que a los alpinistas,
que se matan por llegar a la cumbre
y cuando llegan, ¿qué hacen? Bajar,
o tratar de bajar discretamente,
con la mayor dignidad posible."

Gabriel García Marquez.

"Los seres humanos no nacen para siempre
el día en que sus madres los alumbran,
sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez."

Gabriel García Marquez.

Acá hay tres clases de gente:
la que se mata trabajando,
las que deberían trabajar y
las que tendrían que matarse.

Mario Benedetti

ÍNDICE.

CONTENIDO	Pág.
DEDICATORIAS.	2
AGRADECIMIENTOS.	3
ÍNDICE DE FIGURAS.	8
ÍNDICE DE TABLAS.	12
ÍNDICE DE ANEXOS.	13
RESUMEN.	14
ABSTRACT.	15
I. INTRODUCCIÓN.	16
II. ANTECEDENTES.	20
2.1 Microbiota del tracto digestivo en organismos acuáticos.	20
2.2 Grupos de bacterias a estudiar.	22
2.3 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).	25
III. OBJETIVOS.	27
3.1 Objetivo general.	27
3.2 Objetivos específicos.	27
IV. HIPÓTESIS.	28
V. MATERIALES Y METODOS.	29
5.1 Obtención de los organismos.	29
5.2 Dispositivo experimental.	29
5.3 Extracción de ADN metagenómico.	31
5.4 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	32
5.5 DGGE.	33
5.6 Índices de diversidad.	35
5.7 Análisis bioinformático.	36

CONTENIDO	Pág.
VI. RESULTADOS y DISCUSIONES.	37
6.1 Extracción de ADN metagenómico.	37
6.2 Cebadores 338F y 518R.	38
6.3 <i>Vibrio</i> .	44
6.4 Actinobacterias.	55
6.5 Bacterias ácido lácticas.	62
VII. CONCLUSIONES.	91
VII. REFERENCIAS.	92
IX. ANEXOS.	114

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Pág.
1	Dispositivo experimental con los acuarios de 30 L. de agua y 10 camarones individualizados.	29
2	Estanque con separadores para mantener a los camarones en ayuno y evitar la carnivoría.	31
3	Intestino de camarón colocado en un tubo eppendorf para su almacenamiento.	31
4	Gel de agarosa al 1% donde se observa la calidad del ADN metagenómico del tracto digestivo del camarón.	37
5	Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 200 pb obtenidos con los cebadores 338 y 518.	38
6	DGGE con los cebadores de Eubacterias en camarones juveniles, con porcentaje de desnaturalización del 40 al 60%.	39
7	DGGE con los cebadores de Eubacterias en camarones adultos, con porcentaje de desnaturalización del 40 al 60%.	40
8	Riqueza de OTUs obtenido con los cebadores de Eubacterias.	41
9	Índice de Shannon–Wiener con cebadores de Eubacterias.	41
10	Índice de Simpson con cebadores de Eubacterias.	42
11	Índice de Evenness con cebadores de Eubacterias.	42
12	Método del vecino más cercano en camarones juveniles, con los cebadores de Eubacterias.	43
13	Método del vecino más cercano en camarones adultos, con los cebadores de Eubacterias.	44
14	Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 120 pb obtenidos con los cebadores de <i>Vibrio</i> .	44
15	DGGE con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones juveniles.	45
16	DGGE con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones adultos.	45

Figura		Pág.
17	Riqueza de OTUs obtenidos con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones juveniles y adultos.	46
18	Índice de Shannon - Wiener obtenido con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones juveniles y adultos.	47
19	Índice de Simpson obtenido con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones juveniles y adultos.	47
20	Índice de Evenness con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones juveniles y adultos.	48
21	Método del vecino más cercano con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones juveniles.	48
22	Método del vecino más cercano con los cebadores de <i>Vibrio</i> en camarones adultos.	49
23	Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 640 pb obtenidos con los cebadores de Actinobacterias.	55
24	DGGE con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles con un porcentaje de desnaturalización del 35 al 85%.	55
25	DGGE con los cebadores de Actinobacterias en camarones adultos, con un porcentaje de desnaturalización del 35 al 85%.	56
26	Riqueza de OTUs en la DGGE con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles y adultos.	58
27	Índice de Shannon–Wiener con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles y adultos.	59
28	Índice de Simpson con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles y adultos.	59
29	Índice de Evenness con cebadores de Actinobacterias en camarones adultos.	59
30	Método del vecino más cercano con cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles.	60

Figura		Pág.
31	Método del vecino más cercano con cebadores de Actinobacterias en camarones adultos.	60
32	Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 900 pb obtenidos con los cebadores BaciF:348-BaciR:1203.	62
33	Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 548 pb obtenidos con los cebadores Lb/F:696-GCBaciR:1203.	63
34	DGGE en camarones juveniles con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203, con porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%.	63
35	DGGE en camarones adultos con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203, con porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%.	64
36	Riqueza de OTUs con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos.	65
37	Índice de Shannon-Wiener con los cebadores Lb/F:696 - GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos.	66
38	Índice de Simpson con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos.	66
39	Índice de Evenness con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos.	66
40	Método del vecino más cercano con cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles.	68
41	Método del vecino más cercano con cebadores de Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones adultos.	68
42	Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 840 pb obtenidos con los cebadores Leu/F:403-GCBaciR/1203.	69
43	DGGE en juveniles con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%.	69

Figura		Pág.
44	DGGE en adultos con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%.	70
45	Riqueza de OTUs con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203.	71
46	Índice de Shannon-Wiener aplicados a la DGGE con los cebadores Leu/F:403 - GCBaci/R:1203.	72
47	Índice de Simpson aplicados a la DGGE con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203.	72
48	Índice de Evenness aplicados a la DGGE con los cebadores Leu/F:403- GCBaci/R:1203.	73
49	Método del vecino más cercano con cebadores de Leu/F:403 - GCBaci/R:1203 en camarones juveniles.	74
50	Método del vecino más cercano con cebadores de Leu/F:403- GCBaci/R:1203 en camarones adultos.	74
51	Géneros de BAL en el estómago de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> alimentados y en ayuno en diferentes tiempos.	75
52	Géneros de BAL en el hepatopáncreas de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> alimentados y en ayuno en diferentes tiempos.	76
53	Géneros de BAL en el intestino de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> alimentados y en ayuno en diferentes tiempos.	77
54	Géneros de BAL en el estómago de camarones hembras y machos <i>L. vannamei</i> adultos.	82
55	Géneros de BAL en el hepatopáncreas de camarones hembras y machos <i>L. vannamei</i> adultos.	82
56	Géneros de BAL en el intestino de camarones hembras y machos <i>L. vannamei</i> adultos.	83
57	Riqueza de OTUs en el Tracto Digestivo de camarones juveniles <i>L. vannamei</i> alimentados y en ayuno.	87
58	Riqueza de OTUs en el tracto digestivo de camarones machos y hembras <i>L. vannamei</i> adultos.	89

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla		Pag.
1	Diversidad de <i>Vibrios</i> reportados para <i>L. vannamei</i> (Gómez Gil <i>et al.</i> , 1998).	24
2	Cebadores que se utilizarón en el presente estudio.	33
3	Diversidad de <i>Vibrio</i> en el tracto digestivo de <i>L. vannamei</i> juveniles y adultos.	54
4	Reactivos para preparar TAE 50X.	115
5	Soluciones desnaturalizantes para DGGE con los cebadores 338F y 518R, con un porcentaje de poliacrilamida del 8%.	118
6	Soluciones desnaturalizantes para DGGE con los cebadores de <i>Vibrio</i> , con un porcentaje de poliacrilamida del 8%.	118
7	Soluciones desnaturalizantes para DGGE con los cebadores de Actinobacterias, con un porcentaje de poliacrilamida del 6%.	119
8	Soluciones desnaturalizantes para DGGE con los cebadores de bacterias ácido lácticas, con un porcentaje de poliacrilamida del 6%.	119

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo		Pag.
1	Protocolo de extracción de ADN, Rojas <i>et al.</i> , (2008).	114
2	Buffer TAE.	115
3	Condiciones de PCR para cada juego de cebadores.	116
4	Buffer para PCR.	118
5	Soluciones desnaturalizantes.	118

RESUMEN.

Muchos factores influyen en la abundancia y composición de la microbiota en el tracto digestivo de los invertebrados acuáticos, debido a esto el objetivo del presente trabajo fue evaluar si cambia la microbiota del sistema digestivo en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* al permanecer en ayuno 4 y 8 días, así como también si existen cambios en la microbiota de camarones hembras y machos adultos mediante una técnica independiente de cultivo, a los camarones en los diferentes tratamientos se les extrajo el estómago, hepatopáncreas e intestino los cuales se almacenaron a -80 °C hasta su utilización, la extracción de ADN metagenómico se realizó con el método de lisis *in situ* y adsorción en sílice, se realizaron pools de 10 muestras por tejido para eliminar la variabilidad individual. El análisis de las comunidades bacterianas presentes en los diferentes órganos de *L. vannamei* se realizó utilizando las regiones variables del gen 16S ARNr mediante el uso de cebadores específicos para: Actinobacterias, bacterias ácido lácticas (BAL), *Vibrio* y Eubacterias. Los productos de la PCR fueron desnaturalizados en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE). Los productos obtenidos de la DGGE fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los resultados nos indican que existen cambios en la composición de la microbiota del tracto digestivo de *L. vannamei* juveniles cuando son sometidos al ayuno, en el estómago y hepatopáncreas en ayuno 8 días se observa un mayor número de OTU's, en el intestino al ser alimentado se observan más diversidad de OTU's. La microbiota del tracto digestivo de *L. vannamei* adultos hembras y machos en BAL y Eubacterias es distinta en los tres órganos, en el hepatopáncreas e intestino de hembras y machos para *Vibrio* y Actinobacterias se observa el mismo número de OTU's y en la misma posición. Se observó un mayor número de OTUs con los cebadores de BAL para camarones juveniles y adultos. Los resultados obtenidos nos indican que si es posible constatar los cambios en la microbiota de camarones alimentados y en ayuno, machos y hembras mediante la DGGE, se observó que existen cambios debidos al ayuno y al sexo.

ABSTRACT.

Many factors affect the abundance and composition of the microbiota in the digestive tract of aquatic invertebrates, the objective of this study was evaluate changes in the microbiota of the digestive tract during starvation of 4 and 8 days in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, as well changes in the microbiota of shrimp adult females and males determinate by culture independent approach, shrimps in different treatments was used to obtain stomach, hepatopancreas and intestine, which were stored (-80°C) until use. Extraction of metagenomic DNA was performed with in situ lysis and adsorption on silica method, were done pools 10 samples for tissue to eliminate the individual variability. Analysis of bacterial communities present in different organs of shrimps was done using the variable regions of 16S RNAr gene by the use of specific primers of Actinobacteria, lactic acid bacteria (LAB), *Vibrio* and Eubacteria. The PCR products were denatured by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The products obtained from DGGE were sequenced in the Institute of Biotechnology of the UNAM. The results of this study shown changes in the microbiota composition of digestive tract of *L. vannamei* juveniles in starvation. In 8 days starvation group we observe a higger numbre of OTU's in stomach and hepatopancreas, in control group (feed) we observed higger number of OTU's in intestine. The microbiota of digestive tract of adult *L. vannamei*, male and female, in LAB and Eubacteria are distinct in each organs; in hepatopancreas and intestine of female and male for *Vibrio* and Actinobacteria, we observed the same number of OTU's in the same position. For BAL primers, we observed an higger number of OTU's for juvenile and adults of shrimp. Our results shown important changes in microbiota between feed and starved, male and female shrimps, by DGGE we observed changes during starvation and due sex of shrimps.

I. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de organismos acuáticos para consumo humano es una de las actividades productoras de alimento con mayor crecimiento a nivel mundial, así lo indica en su último informe del estado actual de las pesquerías y acuicultura, la FAO (2008) la cual señala que la producción se ha incrementado de un 3.9% de la producción total en peso en 1970 a un 36% en 2006. En el mismo periodo, el crecimiento de la producción acuícola fue más rápido que el de la población, y el suministro acuícola per cápita pasó de los 0.7 kg en 1970 a los 7.8 kg en 2006, lo cual supone un crecimiento medio anual del 7.0%. La acuicultura mundial se ha incrementado drásticamente en los últimos 50 años, una de las principales razones por las que se expande de manera vertiginosa es debido al bajo crecimiento de la producción de las pesquerías comerciales en todo el mundo, aunado a la intensificación y mayor eficiencia productiva acuícola (Klaenhammer y Kullen, 1999).

El cultivo de camarón es una industria que tuvo una producción estimada en el 2008 de 3.34 millones de toneladas (GOAL, 2008). La tendencia para satisfacer la demanda ha sido la de cultivar en altas densidades y probar alimentos artificiales, aumentando en consecuencia la probabilidad de exponer a los organismos cultivados a condiciones estresantes (Wang *et al.*, 2008). Las enfermedades y el deterioro del ambiente que genera esta actividad puede repercutir en serias pérdidas económicas y ecológicas (Bonand-Reantaso *et al.*, 2005). En las últimas décadas aditivos químicos y medicinas veterinarias han sido utilizados para la prevención y control de enfermedades. Una serie de dificultades que se derivan de su utilización, tales como, la resistencia que crean las bacterias a los antibióticos, los problemas ecológicos asociados con bacterias resistentes, los químicos tóxicos y el apareamiento posterior de drogas restringidas en los tejidos de los camarones, ha provocado la búsqueda de otras vías biológicas para

el control de las enfermedades (Alfonso *et al.*, 1996; Wang, *et al.*, 2004; Nomoto, 2005).

La microbiota intestinal juega un papel importante e influye de manera directa en la nutrición y la salud de los animales en general. Por esto mismo, al alterarla se afecta el estado fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, el crecimiento, y el desarrollo general (Al-Harbi y Uddin, 2005). Es necesario un profundo conocimiento de la microbiota para poder evaluar el efecto del uso de probióticos y contribuir a la preparación de estos aditivos. El uso de probióticos preparados con microorganismo se torna de gran interés en la acuicultura, particularmente en relación a la productividad, la nutrición, el control de enfermedades, en la calidad del agua de los estanques y el impacto de los afluentes en el ambiente (Moriarty, 1997). La diversidad microbiana es una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos.

En este sentido y en el caso particular del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se han estudiado diversos aspectos relacionados con la presencia de bacterias tanto en el agua, como en el tracto digestivo, ya sea en relación con la calidad del agua (Wang *et al.*, 2005), como el efecto de la presencia de microorganismos en el agua e influencia en la digestibilidad y actividad enzimática (Buford *et al.*, 2003; Moss *et al.*, 2001), en las rutas de colonización del tracto digestivo (Simoes *et al.*, 2002) y efecto en el crecimiento (Wang, 2007).

Una limitante en estos estudios ha sido el aislamiento e identificación de las bacterias, durante la década pasada el acercamiento al análisis de la composición microbial cambió considerablemente, debido a que las técnicas clásicas como el cultivo y la identificación microscópica no son suficientes para evaluar la diversidad de bacterias en muestras ambientales (Schäfer y Muyzer, 2001). Los métodos tradicionales para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes únicamente permiten recuperar entre 0.1 y 10% de las bacterias (Rondon *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Tiedje y Stein, 1999;

Handelsman *et al.*, 2002; Torsvik y Ovreås, 2002; Torsvik *et al.*, 2002). Para explicar este fenómeno se ha propuesto que se desconocen los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de un gran número de grupos microbianos en su ambiente natural. Además, existe información mínima sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que mantienen los miembros de una comunidad microbiana (McDougald *et al.*, 1998; Tiedje y Stein, 1999; Zengler *et al.*, 2002; Keller y Zengler, 2004).

Por estos motivos otras herramientas son requeridas para suplir las técnicas microbiológicas convencionales; la introducción de técnicas moleculares en microbiología, incluyen las que usan secuencias del gen SSU-RNA (del inglés, small subunit ribosomal) como marcador molecular para la identificación de microorganismos, que han venido a cambiar la percepción de la diversidad de comunidades microbiales (Schäfer y Muyzer, 2001; Cedeño, 2005a).

Las técnicas moleculares son rápidas y proveen un perfil de la diversidad genética de una comunidad bacteriana. Codificando el gen SSU-ARN se refleja la relación evolutiva de microorganismos y la secuencia de esos genes permite agrupar e identificarlos (Woese, 1987; Schäfer y Muyzer, 2001). Entre las técnicas moleculares que emplean la amplificación de genes del RNAs se encuentran los métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) tales como DGGE (Electroforesis de geles con gradiente desnaturizante), TGGE (Electroforesis de geles con gradiente de temperatura) entre otras (Sanz y Köchling, 2007; Cedeño, 2005b).

La DGGE se basa en la diferente movilidad de los fragmentos de ADN de acuerdo a su temperatura de fusión o disociación (melting). En un gel desnaturizante se pueden, separar fragmentos de ADN de organismos que difieren en una sola base en su secuencia (Sanz y Köchling, 2007). Ha sido ampliamente manejada con éxito para estudiar las comunidades microbianas en

sistemas biológicos con usos específicos en el tratamiento biológico, la salud pública y biorremediación (Cárdenas *et al.*, 2003; Muyzer y Smalla, 1998).

En este sentido, se han aplicado índices de diversidad a la DGGE, ya que las interacciones dentro de la comunidad bacteriana a menudo son complejas. Los índices de diversidad relacionan el número de especies y la importancia relativa de cada una de ellas, para comprender la dinámica de las poblaciones y el funcionamiento de los ecosistemas. Los dos principales componentes de la diversidad de especies son la riqueza de especies o variedad, y la uniformidad o equitatividad. La riqueza de especies puede expresarse mediante relaciones simples entre el número total de especies y el número total de organismos, en la DGGE la riqueza de especies se calcula de acuerdo al número de bandas, la equitatividad es una medida de la proporción es una medida de la proporción de individuos dentro de cada especie (Atlas y Bartha, 2001).

Considerando lo descrito anteriormente el presente trabajo tiene por objetivo el conocer la estructura de las comunidades bacterianas que habitan en el sistema digestivo del camarón blanco *L. vannamei*.

II. ANTECEDENTES.

2.1 Microbiota del tracto digestivo en organismos acuáticos.

La microbiota asociada a los organismos acuáticos, no existe como una entidad absoluta, por el contrario, existe una estrecha interacción entre el ambiente y el organismo, de tal forma que los hospederos y los microorganismos comparten un mismo ecosistema y son susceptibles a los cambios que se presentan. En el caso particular de los organismos en sistemas de cultivo quienes viven bajo condiciones controladas para promover su crecimiento y desarrollo, se encuentran expuestos a microorganismos patógenos a los que son más sensibles debido a las condiciones de estrés a los que son expuestos (Verschuerer *et al.*, 2000; Al-Harbi y Uddin, 2005).

El desarrollo de la microbiota del tracto digestivo es un proceso gradual que comienza después del nacimiento. En los animales terrestres, la microbiota materna es la fuente inicial de colonización bacteriana, mientras que en los animales acuáticos, esta acción está determinada por su contacto con el ambiente circundante e influida por la ingesta de alimento, la secreción de hormonas y la absorción de nutrientes, así como la aparición de proteínas y enzimas digestivas. Inicialmente, cepas anaerobias facultativas dominan en el intestino y posteriormente la variabilidad poblacional dependerá del tipo de dieta ingerida, la edad, la ubicación geográfica, los tratamientos con medicamentos y el estado general del organismo (Cahill, 1990; Isolauri *et al.*, 2001). En el caso particular del camarón blanco la colonización del tracto digestivo por microorganismo ocurre en el estadio de nauplio 5 ya que en este estadio presentan un poro anal con movimientos antiperistálticos (“anal drinking”) esto ocurre antes de que la boca se abra al exterior y comience la actividad de colonización (Simoes *et al.*, 2002).

Muchos factores influyen en la abundancia y composición de especies de bacterias que habitan el sistema digestivo de los invertebrados acuáticos. Varios de esos factores están relacionados a la anatomía y fisiología de los invertebrados anfitriones, incluyendo la estructura del sistema digestivo (Gunzl, 1991) y cambios ontogénicos exhibidos por el anfitrión (Yasuda y Kitao, 1980), El principal factor que influye en la variación de la microbiota gastrointestinal de los ambientes de cultivo es el estrés, el cual generalmente se relaciona con fluctuaciones en la salinidad y temperatura (Lea Mayer *et al.*, 1997), con la concentración de oxígeno, calidad y cantidad de alimento así como con la densidad de organismos (Suzuki *et al.*, 1989), además del manejo, higiene, y contaminantes en los sistemas de cultivo (Pal y Gupta, 1992; Straub y Dixon, 1993).

Como consecuencia del estrés, el sistema inmunológico se ve afectado y debilitado, lo cual es aprovechado por patógenos para proliferar de manera acelerada dentro del huésped. Si el organismo no se ajusta de manera adecuada a estas condiciones o si estas no son corregidas, los organismos dentro del cultivo comenzarán a presentar enfermedades (Verschuerer *et al.*, 2000).

Durante la vida del animal, la microbiota presenta funciones metabólicas, tróficas y protectoras; la función metabólica tiene como finalidad ayudar en los procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo, mientras que la función trófica fomenta el crecimiento y la diferenciación celular, además de estimular el sistema inmune del organismo. Su función protectora se desarrolla desde el nacimiento, ya que actúa como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos, exógenos u oportunistas, creando el efecto barrera (Isolauri *et al.*, 2001).

El conocimiento de la microbiota de los animales de cultivo permite establecer estrategias para el manejo de las enfermedades partiendo del criterio de inicialmente prevenirlas y posteriormente tratarlas (Escobar *et al.*, 2006), y mejorar la digestión de los alimentos. Por consiguiente es de suma importancia

para la acuicultura del camarón un conocimiento profundo de la microbiota de *L. vannamei*.

2.2 Grupos de bacterias a estudiar.

Entre las principales bacterias que se encuentran en el tracto digestivo de los organismos se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL) (Fuller, 1989; Tannock, 1995; Ringo, 2004; Weese *et al.*, 2004; Vaughan *et al.*, 2005). Las BAL están constituidas por un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, con un metabolismo estrictamente fermentativo (Holzapfel *et al.*, 2001), presentan forma de cocos o bacilos anaerobios que producen mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos, así como un bajo contenido de guanina y citocina (Axellsson, 1998).

Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno como por ejemplo, la leche y sus derivados, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, entre otros. Se han reportado como habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre, animales terrestres, peces, del estiércol y de aguas residuales (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Cintas *et al.*, 2000). Han tenido un extenso uso en la fermentación de alimentos y como suplementos alimenticios por sus propiedades metabólicas, resistencia a procesos industriales y sustentabilidad en el producto final (Saarela *et al.*, 2000).

La mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para acuicultura pertenecen a las BAL, de los cuales los géneros utilizados más comúnmente son *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Holzapfel *et al.*, 1998; Strom y

Olfasen, 1990; Ringo y Strom, 1994; Ringo *et al.*, 1998). Una de las principales causas por las que las bacterias ácido lácticas son utilizadas como probióticos en la acuicultura, es por que presentan la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otras bacterias relacionadas con ellas, lo que se conoce como antagonismo láctico (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981).

Otro grupos de bacterias con importancia en la acuicultura son las que pertenecen al género *Vibrio*, por su capacidad de infectar un amplio rango de organismos acuáticos, como son; camarones peneidos, varias especies de peces y moluscos, corales, esponjas, y zooplancton, por mencionar algunos (Rheinheimer, 1992; Lightner, 1993; Verdonck *et al.*, 1994; Verdonck *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998; Vandenberghe *et al.*, 1998; Austin and Austin, 1999; Rosenberg y Ben, 2002; Vandenberghe *et al.*, 2003). Numerosas especies de *Vibrios*, tales como *Vibrio alginolyticus*, han sido caracterizados como probióticos o bien como patógenos (Gómez-Gil *et al.*, 2000).

Los *Vibrios* incluyen diversos grupos de bacterias marinas heterótrofas (Thompson *et al.*, 2004), son abundantes en ambientes acuáticos, incluyendo estuarios, aguas de la costa marina, y sedimentos (Barbieri *et al.*, 1999; Denner *et al.*, 2002; Heidelberg *et al.*, 2002; Ortigosa *et al.*, 1989; Ortigosa *et al.*, 1994; Rehnstam *et al.*, 1993; Urakawa *et al.*, 2000; Yumoto *et al.*, 1999).

Gómez *et al.*, 1998 realizaron un trabajo para conocer las especies de *Vibrio* que se encuentran presentes en camarones *L. vannamei* saludables basados en indentificación fenotípica, los tejidos analizados fueron el estómago, hepatopáncreas, e intestino así como la hemolinfa (tabla 1).

Tabla 1. Diversidad de *Vibrios* reportados para *L. vannamei* (Gómez Gil *et al.*, 1998).

Diversidad de especies				
	Est	Hep	Int	Hem
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	-	+	+
<i>V. pelagius</i>	+	+	-	-
<i>V. splendidus</i>	+	+	+	-
<i>V. tubiashii</i>	+	+	+	-
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	-
<i>V. damsela</i>	-	+	-	-
<i>V. mimicus</i>	-	+	+	-
<i>V. vulnificus</i>	-	+	-	+
<i>V. phosphoreum</i>	-	+	+	-
<i>V. ordalli</i>	-	-	+	-

Est: Estómago; **Hep:** Hepatopáncreas; **Int:** Intestino; **Hem:** Hemolinfa; **(+):** Presencia; **(-):** Ausencia.

Las Actinobacterias, son conocidas comúnmente como habitantes de suelos (Goodfellow and Williams, 1983; Rheims *et al.*, 1999), sin embargo se han encontrado también en ambientes marinos y de agua dulce (Crump *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Methé *et al.* 1998; Sekar *et al.*, 2003; Selje *et al.*, 2005). El Phylum Actinobacteria en términos de números y variedad de especies identificadas representa una de las unidades taxonómicas más extensas entre los 18 linajes actualmente reconocidos dentro del dominio Bacteria (Stackebrandt *et al.*, 1997). Los miembros del taxón son de interés por su importancia en la agricultura, ecología, industria y medicina (McNeill and Brown, 1994; Strohl, 2003). Algunas Actinobacterias son patógenas de plantas y animales y otras fijan nitrógeno asociadas con plantas no leguminosas (Benson y Silvester, 1993; Locci, 1994; McNeill y Brown, 1994; Trujillo y Goodfellow, 2003). Actualmente las Actinobacterias, especialmente los actinomycetes formadores de esporas representan los procariontes con más valor económico y biotecnológico, produciendo más de la mitad de los componentes bioactivos de los antibióticos

(Lazzarini *et al.*, 2000), agentes antitumorales (Dieter *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2000), enzimas (Oldfield *et al.*, 1998; Peczyńska-Czoch y Mordarski, 1988), e inhibidores de enzimas (Umezawa, 1988).

2.3 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

El uso de las técnicas microbiológicas tradicionales no es suficiente para evaluar comunidades bacterianas en muestras ambientales ya que la proporción de células bacterianas cultivables en medios convencionales es del orden de 0.1% al 10% de la población total. En este sentido, los métodos moleculares complementan los métodos tradicionales para el estudio y análisis de comunidades bacterianas (Cedeño, 2005b). El aislamiento directo de ADN de una determinada muestra nos permite el acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables (Ferrer, 2004).

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas dada su presencia en todos los organismos celulares y conservación. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970, sus estudios originaron la división de los procariontes en dos grupos o reinos: Eubacteria y Archaeobacteria. Desde entonces el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro y para la clasificación e identificación bacteriana.

Entre las técnicas moleculares que han sido ampliamente utilizadas para fines taxonómicos se encuentran DGGE, TGGE, y la FISH (hibridación fluorescente *in Vitro*). Considerando lo anteriormente descrito, en la presente investigación se empleará la herramienta del DGGE, para estudiar la comunidad bacteriana en distintos tejidos y en distintas condiciones alimenticias.

El DGGE, es una técnica que se desarrolló para detectar mutaciones puntuales en las secuencias del ADN a partir de muestras ambientales o de organismos. El DGGE es una técnica molecular introducida en la ecología microbiana por Muyzer *et al.*, (1993) y ha sido adaptada como una herramienta para determinar la diversidad microbiana en muestras ambientales (Schaefer y Muyzer, 2001).

En breve, el método requiere la extracción de ADN a partir de muestras ambientales y su posterior amplificación por PCR con iniciadores (primers) universales o que pueden ser específicos para un fragmento del 16S ADN bacteriano. Los productos de la PCR amplificados son desnaturalizados en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante donde los fragmentos de ADN que son de un mismo tamaño pero de diferente secuencia migran de manera diferencial. Los perfiles de bandas que se obtienen son analizados posteriormente caracterizando el número, posición (ausencia o presencia de bandas particulares) e intensidad relativa de las bandas, donde cada banda representa una especie diferente, de esta manera se calculan los índices de biodiversidad de los grupos bacterianos (Cedeño, 2005b).

Esta técnica permite monitoreos rápidos y simples de la variabilidad espacio-temporal de poblaciones microbianas; es relativamente fácil obtener una perspectiva de las especies dominantes de un ecosistema y permite analizar un gran número de muestras; entre las desventajas se encuentran que dependiendo de la naturaleza de la muestra la extracción y amplificación de ADN puede ser dificultoso, el número de bandas detectadas es usualmente pequeño lo cual implica que el número de especies identificadas es pequeño; las bandas corresponden, aunque no necesariamente a la especie dominante en la muestra (Sanz y Köchling, 2007).

III. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Evaluar la diversidad de bacterias ácido lácticas, Actinobacterias y *Vibrio* que componen la comunidad bacteriana del tracto digestivo (estómago, hepatopáncreas e intestino) en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, utilizando una técnica molecular independiente del cultivo.

3.2 Objetivos específicos.

Evaluar la diversidad genética de la microbiota en el tracto digestivo del camarón.

Evaluar si cambia la comunidad microbiana presente en el tracto digestivo de camarones juveniles al permanecer en ayuno.

Evaluar la microbiota del tracto digestivo entre machos y hembras adultos de camarón.

IV. HIPÓTESIS.

La composición de la microbiota que habita el sistema digestivo del camarón blanco *L. vannamei* se modificará al exponerlos a cambios de alimentación.

La microbiota del tracto digestivo de hembras y machos de camarones adultos *L. vannamei* es distinta.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de los organismos.

Los organismos que se utilizaron pertenecen a la especie *Litopenaeus vannamei*, los cuales fueron adquiridos en la granja comercial “La Marca” en la etapa de postlarvas y alimentados hasta la etapa de juveniles en el área de estanques de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), perteneciente a la Facultad de Ciencias de la UNAM, en Sisal, Hunucma, Yucatán. Su dieta consistió en alimento comercial.

5.2 Dispositivo experimental.



Figura 1. Dispositivo experimental con los acuarios de 30 L. de agua y 10 camarones individualizados.

Se desarrollo un experimento en el que se mantuvieron en condiciones controladas camarones en el estadio de juveniles y adultos. Los camarones juveniles fueron acondicionados en 11 acuarios con capacidad de 30 litros (Figura

1), las cuales estuvieron divididas en 12 partes para individualizar a los camarones y con esto evitar la carnivoría (Figura 2), el sistema contó con filtros biológicos, en un sistema de recirculación de agua cerrado, en un sistema de aireación para cada acuario; en cada acuario se colocaron 10 camarones. Los parámetros fisicoquímicos de oxígeno (6 a 8 mg/L), salinidad (36 PSU) y temperatura (28 °C) fueron registrados 2 veces al día, a las 8 horas y a las 20 horas.

Se tomó un grupo control de 30 camarones directamente del estanque, para extraerles el estómago, hepatopáncreas e intestino, estos camarones no fueron sometidos al ayuno. Al 50% de los camarones colocados en los acuarios permanecieron 4 días en ayuno; al restante 50% se les dejó 8 días en ayuno, en ambos casos al cumplirse el tiempo deseado los camarones fueron sacrificados por decapitación y se les extrajo los tejidos mencionados con anterioridad, los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80 °C hasta su utilización (Figura 3).

En la segunda parte del experimento se tomaron camarones directamente de los estanques en el estadio de adultos, los cuales fueron sexados, para tener machos y hembras, a los cuales se les extrajo el intestino, estómago y hepatopáncreas que fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su utilización, para corroborar si existe diferencia en la microbiota intestinal entre sexos.

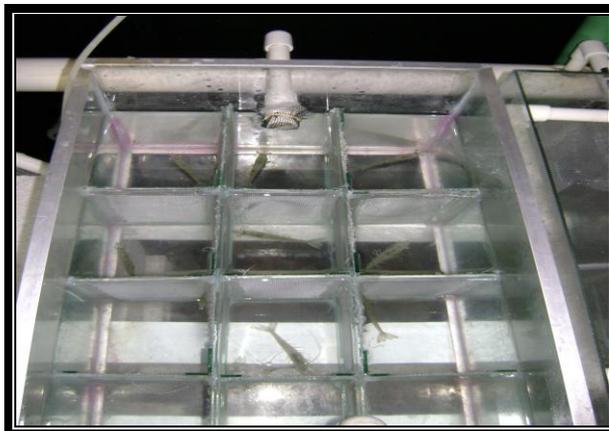


Figura 2. Estanque con separadores para mantener a los camarones en ayuno y evitar la carnivoría.



Figura 3. Intestino de camarón colocado en un tubo eppendorf para su almacenamiento.

5.3 Extracción de ADN metagenómico.

Para la extracción del ADN metagenómico del estómago, hepatopáncreas, e intestino, de camarones juveniles y adultos *L. vannamei*, se siguió el método descrito por Rojas *et al* (2008), Anexo 1.

Para visualizar el ADN, se realizaron geles de agarosa al 1%, los cuales fueron teñidos con SYBR® (INVITROGEN), corridos a 80 volts por 40 minutos, en cámaras electroforéticas que contenían buffer TAE 1X (Anexo 2). Una vez terminado el tiempo de corrida los geles fueron digitalizados y analizados en un fotodocumentador GEL DOC XR + IMAGING SYSTEM de la casa comercial BIO RAD®.

Se determinó la absorbancia del ADN a 260 nm (ácidos nucleicos) en el espectrofotómetro (GENÈSIS 10UV, Thermo Scientific), posteriormente se calculó la concentración de ADN con la siguiente formula (lectura a 260 nm/ 20) (factor de dilución); todas las muestras fueron diluídas a la concentración menor en este caso fue 50ng; se mezclaron 10 órganos por muestra (pooles) con el fin de eliminar la variabilidad individual y analizar los cambios por órgano.

5.4 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El análisis de las comunidades bacterianas presentes en los diferentes órganos de *L. vannamei* se realizó utilizando las regiones variables del gen 16S ARNr mediante el uso de cebadores (iniciadores o primers) para distintos grupos como se aprecia en la tabla 1, una secuencia rica en GC fue agregada en el extremo 5', comúnmente llamada GC-clamp (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989), la secuencia rica en GC actúa como un alto dominio de melting que previene que dos hebras de ADN se disocien completamente en una sola hebra, el tamaño del GC-clamp puede variar entre 30 y 50 nucleótidos (Muyzer *et al.*, 1997). Cabe señalar que la PCR se realizó a los pooles. El equipo empleado para la PCR fue un termociclador IQ 5 de la casa comercial BIO RAD®. En el anexo 3 se describen las condiciones para el PCR de cada grupo de bacterias que se estudiaron en el presente trabajo.

resultaron de la PCR con los cebadores 338 y 518, en la literatura se establece que el porcentaje de desnaturalización es de 40 a 60% (Nikolausz *et al.*, 2005; El Fantroussi *et al.*, 1999; Befring *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2008), el porcentaje de desnaturalización para los cebadores de *Vibrio* fue de 45 a 70% (Eiler y Bertilsson, 2006), para Actinobacterias de 35 a 85% (Stevens *et al.*, 2006), para ácido lácticas los gradientes fueron; gcBaciR: 1203 - Lb/F:696 y gcBaciR: 1203 - Leu/F:403 de 40 a 55%.

El porcentaje de poliacrilamida para el gel con los cebadores 338 y 518 es del 8% (Muyzer *et al.*, 1993), para el gel con los cebadores de *Vibrio* es de 8%, para los cebadores de Actinobacterias y ácido lácticas el porcentaje de poliacrilamida fue del 6% (Escalante, 2010).

La electroforesis fue corrida a 60 °C por 20 horas a 70 volts en una solución buffer de TAE 1 X, posteriormente el gel fue teñidos con SYBR GREEN® (INVITROGEN) por 60 minutos. Pasado el tiempo de incubación en el SYBR el gel de DGGE fue digitalizado por medio de un fotodocumentador Quantity one marca BIO RAD®. Los patrones de bandas serán analizados por su intensidad en pixeles y por presencia o ausencia para realizar los análisis que se describen posteriormente. La recuperación del ADN del DGGE se llevo a cabo cortando cada banda del gel, las bandas fueron colocadas en tubos eppendorf y resuspendidas en 50 µl de agua esteril, se dejaron eluir 24 horas en refrigeración, posteriormente se realizó una PCR con los cebadores correspondientes al grupo que se realizo el DGGE, los productos de la PCR de la reamplificación de las bandas fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la casa comercial Promega, los productos de la purificación se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

5.6 Índices de diversidad.

En el caso de la electroforesis del DGGE se calcularon índices de diversidad de acuerdo a la intensidad de pixeles de cada banda y cada banda es considerada un Unidad Taxonómica Operacional (OTU, es el elemento que se va clasificar, según Sneath y Sokal, 1973) según Cedeño (2005b):

Riqueza de especies (S): Se define como el número de diferentes especies presentes en una muestra (número de bandas presentes en DGGE). No toma en cuenta la proporción y distribución de cada especie en la comunidad. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$S = \# \text{ de bandas detectadas}$$

Índice de Shannon–Wiener: Esta medida se calcula en base a las bandas de los perfiles obtenidos del DGGE, toma en consideración el número y la intensidad relativa de las bandas en una línea individual. Se calcula con la siguiente ecuación:

$H' = - \sum P_i \cdot \ln P_i$, donde P_i es la intensidad relativa de las bandas en un perfil.

El índice de Shannon Wiener expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Es una medida de la incertidumbre para predecir a que OTU pertenecerá un individuo elegido al azar de una muestra de S especies y N individuos (Peet, 1974; Magurran, 1988; Baev y Penev, 1995). Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Este índice presenta un rango máximo en torno a 5, en donde valores por arriba de 3 son típicamente interpretados como diversos.

Índice de Simpson: Es una medida de la dominancia y se expresa como:

$$\text{Índice de Simpson} = \lambda = \sum p_i^2$$

Siendo p_i la proporción del número de individuos de la especie i con respecto a N . es un índice estructural de dominancia, pudiéndose calcular la diversidad como $1 - \lambda$ (Lande, 1996). Manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra pertenezcan al mismo OTU (Moreno, 2001).

Igualdad u homogeneidad (Evenness): Se define como una medida que expresa que tan similar es la abundancia de diferentes especies. Este parámetro siempre tomara valores comprendidos entre 0 y 1. Se calcula a partir del índice de riqueza de especies (S) y el índice de Shannon-Weaver (H). Se calcula con la siguiente ecuación:

$$E = H / \ln(S)$$

5.7 Análisis bioinformático.

La última etapa fue la comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo en bases de datos, las secuencias de Actinobacterias y bacterias ácido lácticas se analizaron en el software en línea Rapid Annotation using Subsystem Technology (MG-RAST), con los siguientes parámetros: valor de E : $1e-05$; tamaño mínimo del alineamiento: 100 pb; base de datos: Ribosomal Database Project (RDP). Las secuencias de *Vibrio* fueron analizadas en el GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1 Extracción de ADN metagenómico.

El método de extracción de ADN metagenómico utilizado en el presente trabajo estuvo basado en adsorción de sílice y precipitación con etanol (Rojas *et al.*, 2008), el cual funcionó para todos los tejidos. Los valores de la concentración de ADN fluctúa entre 300 ng/μl del hepatopáncreas de las hembras y 75 ng/μl en el estómago de las hembras y de los machos.

Para visualizar el ADN se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% (figura 4) en donde se observó ADN libre de contaminación con ARN y no degradado. Sagova *et al.*, (2008) menciona que diferentes rendimientos de ADN se pueden deber a la sensibilidad o la tasa de agresividad de los métodos individuales de extracción en la evaluación de la comunidad microbial; esto se debe a que diferentes partículas se adhieren al ADN y a la presencia de otros organismos lo cual tiene que ver con la sensibilidad del método de extracción.

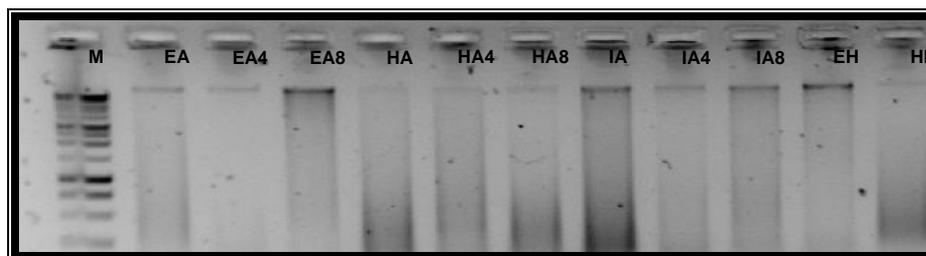


Figura 4. Gel de agarosa al 1% donde se observa la calidad del ADN metagenómico del tracto digestivo del camarón. Dónde: **M**: Marcador de 1000 pb; **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8.

6.2 Cebadores de Eubacterias (338F y 518R).

La PCR con estos cebadores dio como resultado un amplicón de 200 pares de bases (pb), tal como se esperaba, y se presenta en la Figura 5, en donde se aprecia ADN de buena calidad.

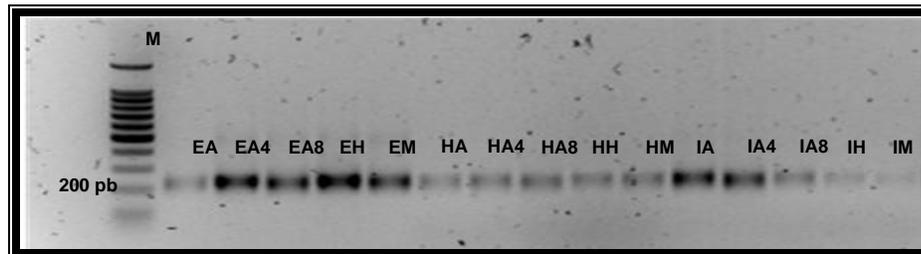


Figura 5. Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 200 pb obtenidos con los cebadores 338 y 518. Dónde: **M:** Marcador de 100 pb; **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

Se realizó una DGGE a los amplicones obtenidos con estos cebadores para tener un estimado de la diversidad bacteriana presente en los distintos tejidos del camarón (Figuras 6 y 7), con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 60%.

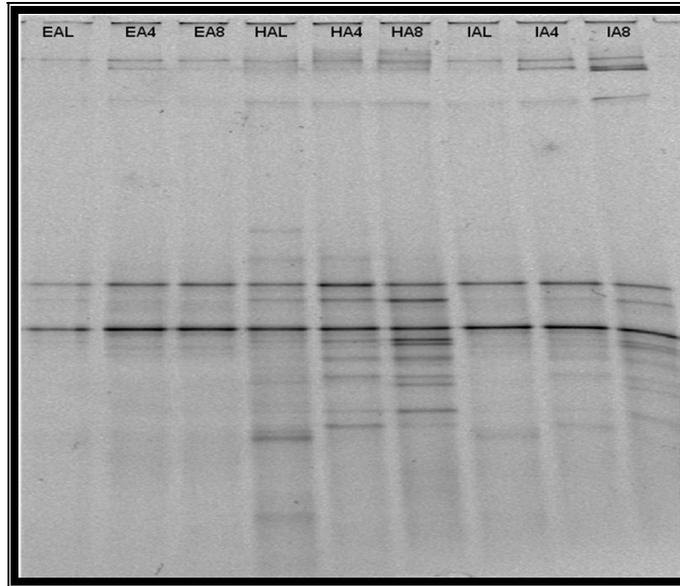


Figura 6. DGGE con los cebadores de Eubacterias (338F y 518R) en camarones juveniles, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 60%. Dónde: **EAL**: estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **HAL**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IAL**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8.

En la DGGE de camarones juveniles en sus diferentes tratamientos se obtuvieron 33 OTU's distintos, en donde el hepatopáncreas alimentado tuvo la mayor diversidad con 19, y el estómago alimentado presento la menor diversidad con 7, mientras que en la DGGE de camarones adultos se obtuvieron 29 OTU's, en donde el intestino de los machos presentó mayor diversidad con 14, y la menor diversidad se observó en el hepatopáncreas de los macho (Figura 8).

En el análisis de la DGGE de juveniles se observó que para el estómago la comunidad bacteriana aumenta 4 OTU's en ayuno con respecto a los que son alimentados, la microbiota del hepatopáncreas disminuye cuando son sometidos al ayuno y finalmente la del intestino aumenta en 2 OTU's (4 días de ayuno) y 3 OTU's (8 días de ayuno), por lo tanto se producen cambios en la composición bacteriana por el ayuno, Simpson y colaboradores (2001) utilizando la DGGE en el tracto gastrointestinal del salmón, observaron cambios en la microbiota debidos al ayuno, encontrando que al someter a los organismos al ayuno su microbiota

aumenta y obtuvo una mayor diversidad a los 7 días de ayuno, por su parte Hovda *et al.*, (2007) compararon la diversidad del tracto digestivo del salmón, con métodos de cultivo y extracción directa de ADN, aplicando DGGE con los mismos cebadores que el presente trabajo, los resultados fueron una mayor diversidad con la extracción directa del ADN, por lo que el DGGE es una técnica confiable para el estudio del tracto digestivo de especies acuáticas.

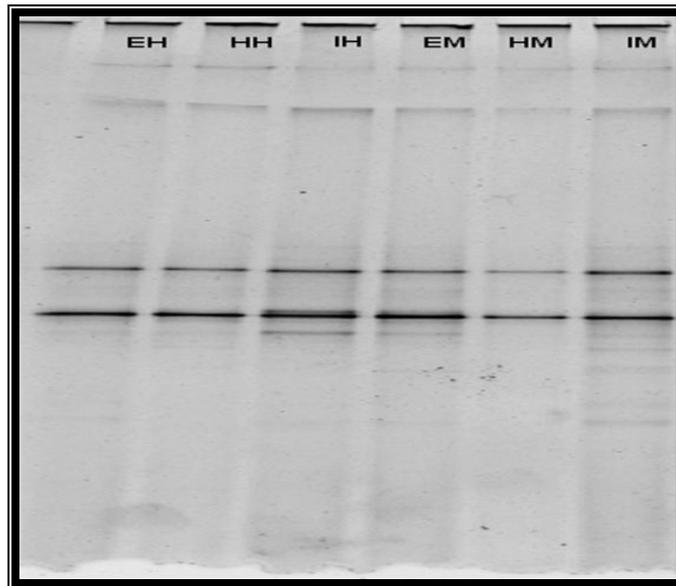


Figura 7. DGGE con los cebadores de Eubacterias (338F y 518R) en camarones adultos, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 60%. Dónde: **EH**: Estómago hembra; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **IH**: Intestino hembra; **EM**: Estómago macho; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IM**: Intestino macho.

En el caso de adultos, después de la DGGE se observaron cambios entre hembras y machos, en el estómago se obtuvieron 11 OTU's tanto en hembras como en machos, pero en diferente posición lo que nos dice que existe cambios debidos al sexo, el hepatopáncreas presentó mayor diversidad en hembras (9 OTU's) que en machos (5 OTU's), en el intestino el sexo que presentó mayor diversidad fue el de los machos con 14 OTU's; observando distintos patrones de bandeado en los tres tejidos.

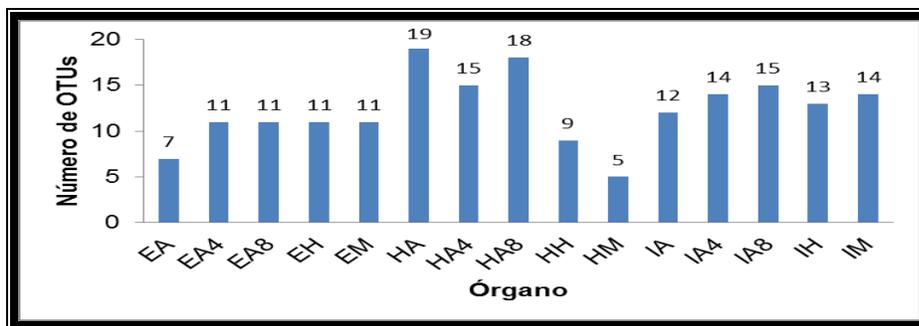


Figura 8. Riqueza de OTU’s obtenidos con los cebadores de Eubacterias (338F y 518R). Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8 días; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

En las Figuras 9, 10 y 11 se presentan los índices de diversidad calculados para los análisis donde se utilizaron los cebadores 338 y 518.

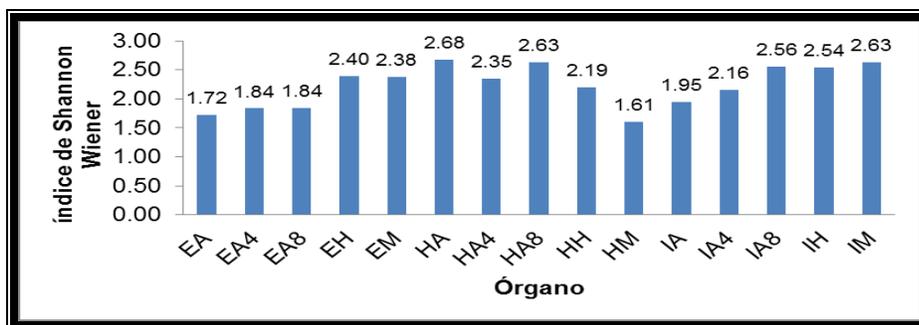


Figura 9. Índice de Shannon–Wiener con cebadores de Eubacterias (338F y 518R). Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8 días; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

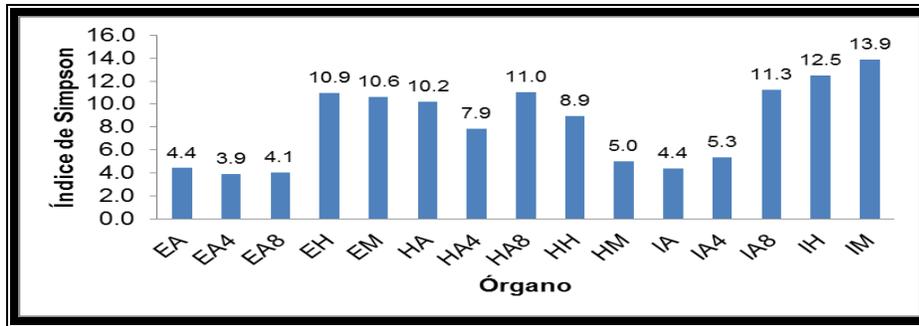


Figura 10. Índice de Simpson con cebadores de Eubacterias (338F y 518R). Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8 días; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

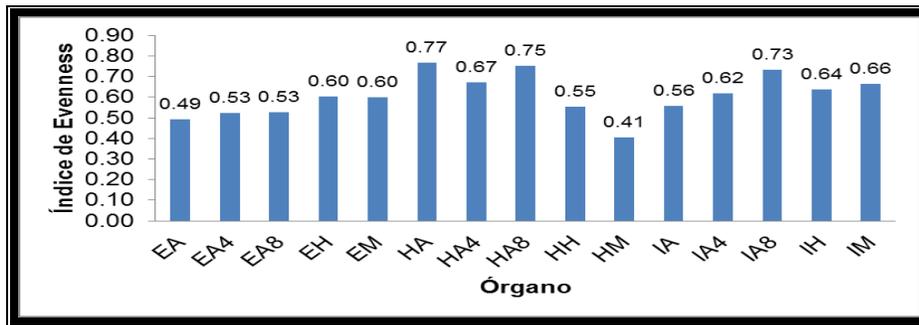


Figura 11. Índice de Evenness con cebadores de Eubacterias (338F y 518R). Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8 días; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

Los índices de Shannon–Wiener para los juveniles van de 1.72 (estómago alimentado) a 2.68 (hepatopáncreas alimentado), por su parte los valores de los adultos van de 1.61 (hepatopáncreas macho) a 2.63 (intestino macho), el valor mayor del índice de Simpson para juveniles fue de 11.3 (intestino en ayuno 8 días), en adultos el valor mayor fue del intestino de camarones machos con 13.9, las comunidades bacterianas distribuidas más uniformemente según el índice de Evenness para los juveniles fue del hepatopáncreas alimentado, y para adultos el intestino de los machos.

En la figura 12 se observa el análisis del vecino más cercano para juveniles teniendo dos grupos notables, uno formado por el estómago y otro por el intestino, los tejidos que se encuentran con mayor relación son el estómago en ayuno 4 días y a los 8 días los cuales se unen al estómago alimentado, en el segundo grupo los más cercanos son el intestino en ayuno 4 días y 8 días y con mayor distancia se unen al intestino alimentado; el hepatopáncreas en ayuno a los 4 días se encuentra relacionado con el hepatopáncreas en ayuno 8 días. Lo cual nos indica que al dejar en ayuno (4 y 8 días) a los camarones la microbiota autóctona es decir la propia del camarón se encuentra con mayor relación que cuando son alimentados pudiendo ser que entran una gran cantidad de partículas con el alimento.

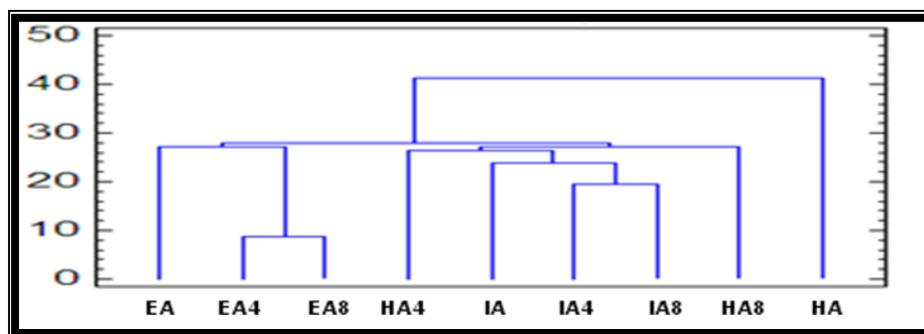


Figura 12. Método del vecino más cercano en camarones juveniles, con los cebadores de Eubacterias (338F y 518R). Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8.

En el análisis del vecino más cercano para los adultos (Figura 13) se observa que los tejidos que se encuentran mas cercanos son los de la hembra, siendo los más cercanos el hepatopáncreas y el estómago de la hembra, y con mayor distancia el intestino. La composición bacteriana en ambos sexos tienen OTU's en común.

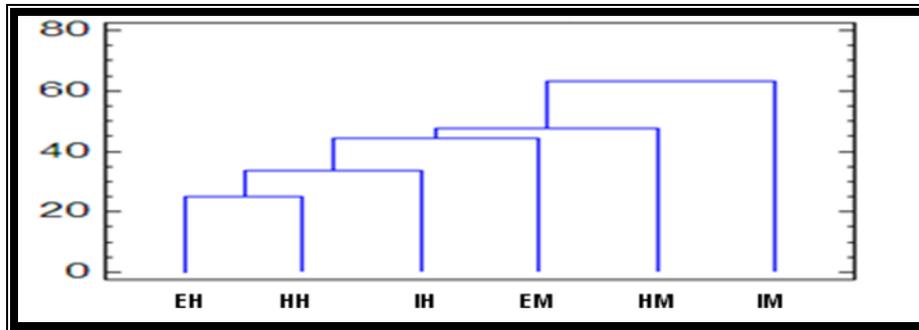


Figura 13. Método del vecino más cercano en camarones adultos con los cebadores de Eubacterias (338F y 518R). Dónde: **EH:** Estómago hembra; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **IH:** Intestino hembra; **EM:** Estómago macho; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IM:** Intestino macho.

6.3 *Vibrio*.

La PCR con estos cebadores dio como resultado un amplicón de 120 pb, tal como se esperaba y se aprecia en la figura 14, en donde todas las muestras amplificaron para este género de bacterias. Con los productos obtenidos de PCR se realizó la DGGE de juveniles alimentados y en ayuno, y de adultos hembras y machos de camarón (Figura 15 y 16).

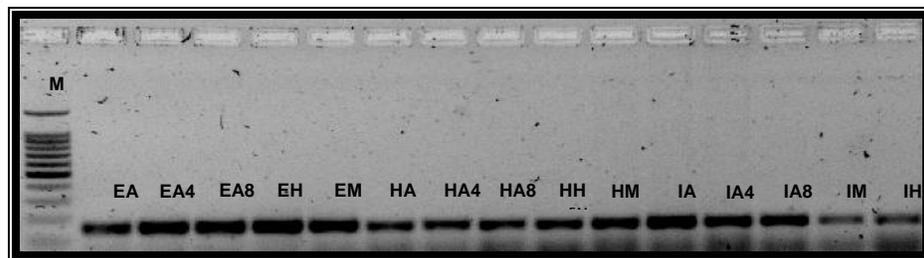


Figura 14. Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 120 pb obtenidos con los cebadores de *Vibrio*. Dónde: **M:** Marcador de 100 pb; **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

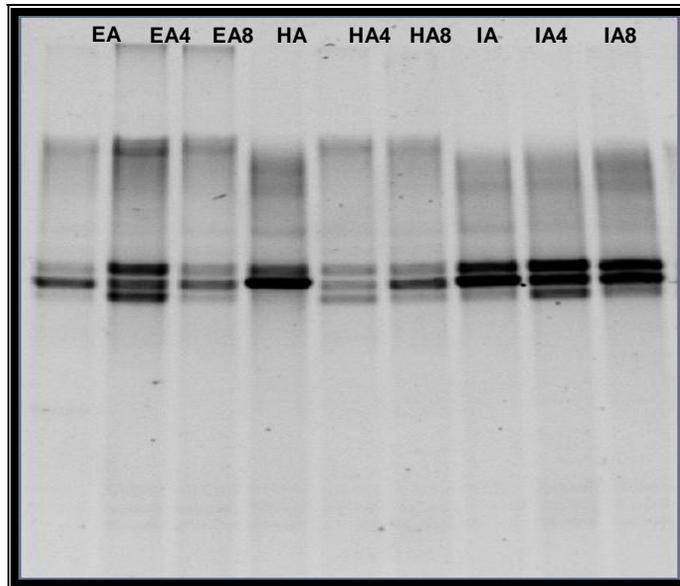


Figura 15. DGGE con los cebadores de *Vibrio* en camarones juveniles con un porcentaje de desnaturalización del 45 al 70%. Dónde: **EA:** estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8.

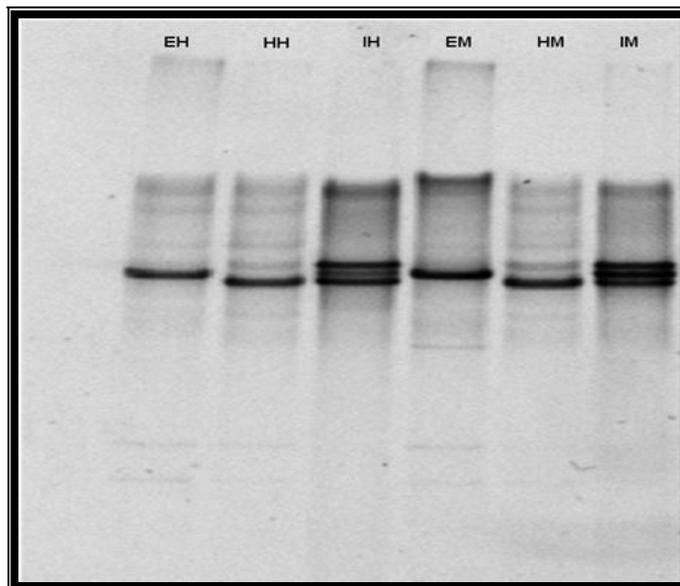


Figura 16. DGGE con los cebadores de *Vibrio* en camarones adultos con un porcentaje de desnaturalización del 45 al 70%. Dónde: **EH:** Estómago hembra; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **IH:** Intestino hembra; **EM:** Estómago macho; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IM:** Intestino macho.

En la DGGE de camarones juveniles alimentados y en ayuno se obtuvieron 18 OTU's diferentes donde el estómago en ayuno 4 y 8 días

presentaron mayor diversidad de *Vibrio* con 11. En la DGGE de adultos hembras y machos de camarón se obtuvieron 17 OTU's diferentes, el hepatopáncreas de la hembra y del macho presentaron la mayor diversidad de *Vibrios* con 9 OTU's. (Figura 17). Los camarones juveniles presentaron mayor diversidad que los camarones adultos, en el estómago de camarones juveniles se observó mayor diversidad de *Vibrio* cuando permanecieron en ayuno de la misma manera el hepatopáncreas al permanecer en ayuno 4 días presentó mayor diversidad, por su parte el intestino tuvo la misma diversidad al ser alimentado y al permanecer en ayuno.

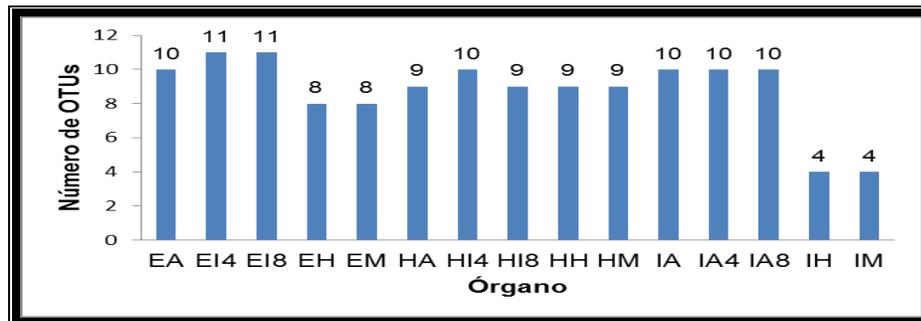


Figura 17. Riqueza de OTU's obtenidos con los cebadores de *Vibrio* en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

Los valores de los índices de diversidad se encuentran en las Figuras 18, 19 y 20, el valor más alto para el índice de Shannon Wiener en camarones juveniles fue el estómago en ayuno 8 días y en los camarones adultos el hepatopáncreas de los machos, para el índice de Simpson que es un índice de abundancia, en camarones juveniles el estómago en ayuno 8 días es el que presenta mayor probabilidad de que si dos organismos son tomados al azar pertenezcan al mismo OTU y en adultos el hepatopáncreas de camarones hembras y machos, el índice de Evenness nos indica que la muestra que presenta mayor uniformidad entre sus OTU's para juveniles es el estómago de camarones

en ayuno 4 y días, mientras que en adultos el hepatopáncreas de camarones machos y hembras.

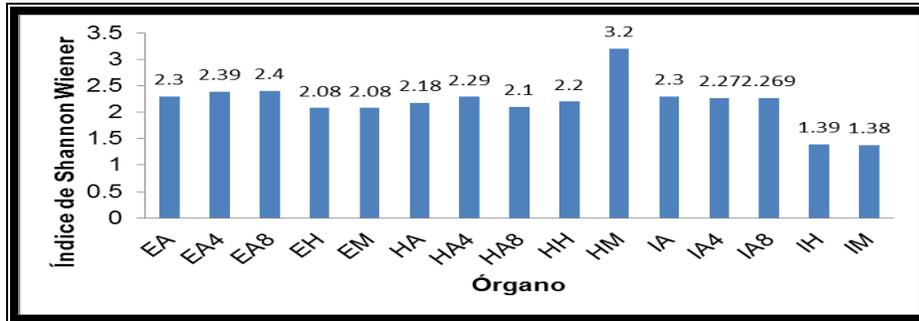


Figura 18. Índice de Shannon-Wiener obtenido con los cebadores de *Vibrio* en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

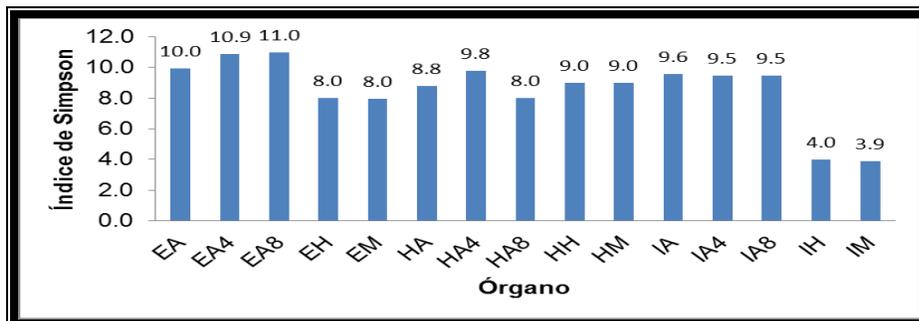


Figura 19. Índice de Simpson obtenido con los cebadores de *Vibrio* en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

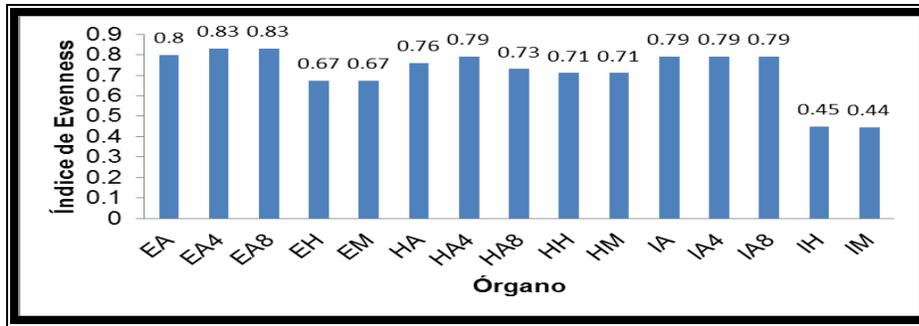


Figura 20. Índice de Evenness con los cebadores de *Vibrio* en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

En la figura 21 y 22 se aprecian los resultados del método del vecino más cercano, para la DGGE de juveniles, la microbiota del hepatopáncreas en ayuno 4 y 8 días son idénticas. En la DGGE de adultos la microbiota del hepatopáncreas e intestino del camarón blanco son idénticas; el estómago de hembras y machos presenta comunidades diferentes de *Vibrio*.

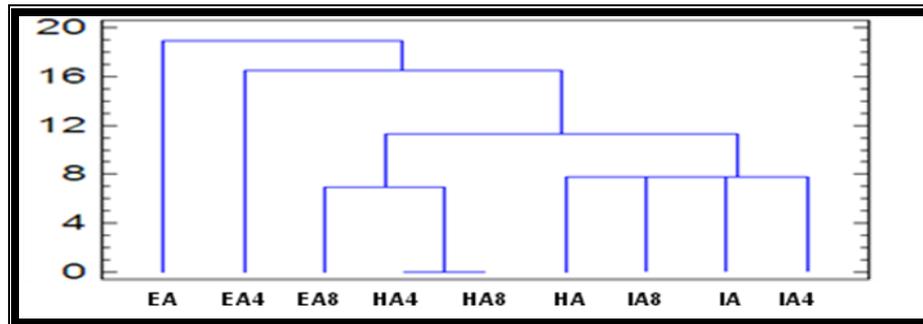


Figura 21. Método del vecino más cercano con los cebadores de *Vibrio* en camarones juveniles. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8 días.

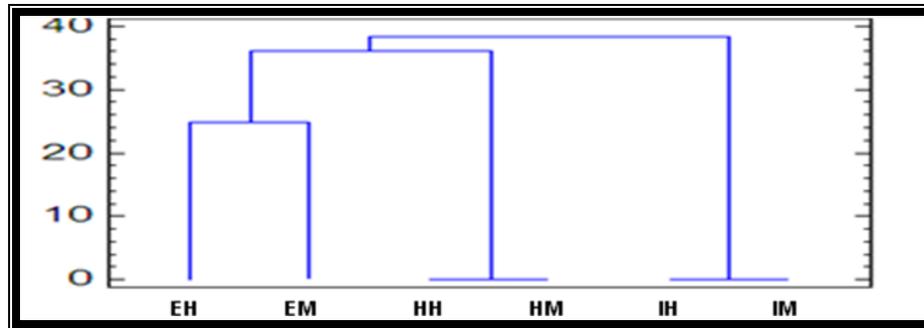


Figura 22. Método del vecino más cercano con los cebadores de *Vibrio* en camarones adultos. Dónde; **EH:** Estómago hembra; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **IH:** Intestino hembra; **EM:** Estómago macho; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IM:** Intestino macho.

En la tabla 2 se aprecia la diversidad de *Vibrios* identificados en este estudio. Los *Vibrios* son miembros de la microbiota natural del camarón *L. vannamei* (Vandenberghe *et al.*, 1999), Gómez-Gil *et al.*, (1998) reportó la presencia de *Vibrios* en el hepatopáncreas; Lightner (1996), por su parte menciona que las principales especies del género *Vibrio* que representan peligro para el cultivo de peneidos son; *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. parahameolyticus* y *V. harveyi*. Oxley *et al.*, (2002) en *Penaeus merguensis* en cultivo y silvestre encontraron que los miembros del género *Vibrio* fueron los dominantes del tracto digestivo de esta especie de camarones.

V. shilonii (conocida también como *V. mediterranei*) el cual se encontró en el hepatopáncreas e intestino de hembras y machos de camarones adultos, fue encontrado en el hepatopáncreas de *Panaeus monodon*, esta especie de bacterias se ha aislado de corales y es la causante del blanqueamiento de los corales (Ben-Haim y Rosenberg 2002), se ha encontrado también en gran parte de ambientes marinos y de algunos organismos, sin embargo no es considerado un agente patógeno. Se demostró que tiene propiedades probióticas en el pez *Scophthalmus maximus* (Thompson *et al.*, 2001). Se asume que la forma en la que esta bacteria llegó al hepatopáncreas e intestino de camarones machos y hembras es por el agua ya que los estanques de cultivo reciben agua del mar.

V. diazotrophicus es una de las cuatro especies de *Vibrio* que se han conocido por fijar moléculas de carbono (Urdaci *et al.*, 1988). En este trabajo se encontró esta especie de *Vibrio* en el estómago de camarones machos adultos. Baffone *et al.*, (2005), midieron la capacidad de adherencia, toxicidad y enterotoxigenicidad, de cepas de *Vibrio* aisladas de aguas de unidades de producción acuícola, peces, moluscos, y alimento, los resultados que obtuvieron fueron que estas cepas de *V. diazotrophicus*, solamente tiene capacidad de adherencia. Lo que nos hace suponer que esta especie de *Vibrio* se encuentra en el agua y en alimento siendo una bacteria de paso y por su capacidad de adherencia se encontró en el estómago de camarones machos.

Vibrio harveyi es el mayor patógeno de camarones *L. vannamei*, *Penaeus monodon*, *P. chinensis* (Austin *et al.*, 2003; Lavilla and de la Pena 1998; Leano *et al.*, 1998; Vandenberghe *et al.*, 1998), se han reportado pérdidas en la larvicultura de camarones en Australia (Pizzutto and Hirst, 1995), Sudamérica (Alvarez *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1998) y México (Vandenberghe *et al.*, 1999) relacionadas a infecciones causadas por esta bacteria. En el presente trabajo se encontró *V. harveyi* en el estómago, hepatopáncreas e intestino alimentados y en ayuno de camarones juveniles, en camarones adultos en el hepatopáncreas e intestino de hembras y machos, lo que corrobora lo publicado por Lavilla y colaboradores (1990 y 1992) en donde exponen que la principal fuente de *V. harveyi* es el intestino medio (hepatopáncreas y parte del intestino) y la vía de acceso es por heridas y durante la muda. El mismo autor señala que *V. harveyi* tiene preferencia por hembras reproductoras ya que se encuentran mudando durante el desove.

V. azureus, fue aislada e identificada por vez primera por Yoshizawa *et al.*, (2009) en agua de mar en la región de Kuroshio y Sagami Bay en Japón, pertenece al grupo de *Vibrios* luminiscentes. Los miembros de este grupo de *Vibrios*, son patógenos oportunistas y patógenos primarios en organismos sometidos a estanques de cultivo, son habitantes comunes en ambientes marinos, en aguas y sedimentos de estuarios, y en la microbiota de organismos marinos

(Lin, *et al.* 2010). En el presente estudio se identificó *V. azureus* en el tracto digestivo de camarones adultos, el cual tiene preferencia por el estómago e intestino de hembras y machos de camarón, lo que supone que esta especie de *Vibrio* llega al intestino y estómago por encontrarse cerca del medio exterior ya que esta bacteria es habitante del agua de mar. Mientras que en el hepatopáncreas en ambos sexos no se encontró esta especie de bacteria.

V. campbellii en el presente estudio se encontró en el estómago y hepatopáncreas de hembras y machos, es generalmente encontrada en la superficie del agua de ambientes marinos tropicales, tiene importante ecológica y comercial por que algunas cepas de esta especie de bacterias son patógenos de organismos acuáticos (Macey *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2008).

Las especies de *Vibrio* son parte de la microbiota natural en los camarones silvestres y de cultivo (Sinderman, 1990) y se convierten en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa natural están suprimidos (Brock and Lightner, 1990 and Lightner, 1993), por lo que la hipótesis de la naturaleza oportunista de *Vibrio* ha sido ampliamente aceptada (Hameed, 1993; Lightner, 1993; Ruangpan and Kitao, 1991).

En juveniles se observaron 18 OTU's distintos y en adultos 17, no existe una diferencia marcada que en algún estadio de desarrollo tengan preferencia por *Vibrio*. En los camarones juveniles el estómago es el órgano que presenta mayor diversidad de *Vibrio* lo que no concuerda con el trabajo realizado por Gómez-Gil *et al.*, (1998) quien describió mayor diversidad de *Vibrio* en el hepatopáncreas de camarones juveniles, suponemos que puede deberse a que en el ambiente (agua y alimento) existe una alta cantidad de *Vibrio* y como es un órgano que tiene contacto con el ambiente en el cual se desarrolla el camarón hay una vía de acceso rápida de este género de bacterias, de igual manera lo corrobora que en el intestino existe alta concentración de bacterias del género *Vibrio* el cual se encuentra en contacto con el ambiente del camarón, por otro lado existen cambios

ocasionados por el ayuno en el estómago y hepatopáncreas de camarones juveniles, siendo que a los 4 días de ayuno se observó mayor diversidad de OTU's, se puede deber a la gran capacidad de las distintas especies del género *Vibrio* a adherirse a los tejidos o mucosa intestinal como mencionan Balebona *et al.*, (2001 y 1995); Bordas *et al.*, (1996); Chen *et al.*, (2008); y Snoussi *et al.*, (2008), y al estar alimentado otros microorganismos o partículas no deseadas no permiten que se pueda observar mayor diversidad de OTU's.

Por su parte en los camarones adultos el hepatopáncreas es el que presenta mayor diversidad de OTU's corroborando lo descrito por Gómez-Gil *et al.*, (1998); Chen, (1992); Frelier *et al.*, (1992). La razón por la que se encontraron mayor diversidad de *Vibrio* en el hepatopáncreas tanto de hembras y machos es que no se encuentra revestido por un exoesqueleto y se ha visto que es el sitio de penetración de patógenos que se encuentran en el agua y alimento (Ruby *et al.*, 1980; Jayabalan *et al.*, 1982) mientras que el estómago e intestino se encuentra revestido por un exoesqueleto creando una barrera física contra patógenos que intentan penetrar la superficie externa de los crustáceos. Otra vía de acceso de las bacterias es por las heridas o grietas del exoesqueleto y son ingeridas con el alimento (Paynter 1989; Lavilla *et al.*, 1990).

De acuerdo a lo planteado de la vía de acceso de *Vibrio* al tracto digestivo del camarón blanco puede explicar la razón por la que en el hepatopáncreas e intestino de camarones hembras y machos no exista cambios en la composición de la microbiota pudiéndose adoptar lo descrito por Lavilla *et al.*, (1992) para *V. harveyi* en la que esta especie tiene preferencia por hembras reproductoras por que se encuentran mudando durante el desove, lo que se podría aplicar al género *Vibrio* que en adultos no exista diferencias en el hepatopáncreas e intestino, y que la diferencia en la composición de la microbiota de hembras y machos de camarón blanco esté presente en camarones reproductores. Chen, (1992); Frelier *et al.*, (1992) mencionan que el hepatopáncreas de camarones es el órgano en donde se encuentra un mayor número de bacterias patógenas.

De los 17 OTU's obtenidos en el DGGE de camarones adultos, y los 18 OTU's de la DGGE de juveniles, todos se secuenciaron y únicamente de 9 se obtuvieron hasta especie al ser comparadas en la base de datos del NCBI, posiblemente por que al trabajar con el gen 16s en *Vibrio*: los cebadores utilizados amplifican la región V1 del 16s ribosomal, Coenye y Vandamme (2003) mencionan que las regiones variables V1, V2, y V6 del 16s es en donde ocurre mayor heterogeneidad, otra razón es porque el género *Vibrio* contiene un amplio número de especies bacterianas estrechamente relacionadas con diferencias en la secuencia de nucleótidos del 16s que van del 1 al 6% (Dorsch *et al.*, 1992; Ruimy *et al.*, 1994), la presencia de varios operones del ARN ribosomal (*rnn*) que es común entre los miembros de este género (Yamaichi *et al.*, 1999).

Tabla 3. Diversidad de *Vibrios* en el tracto digestivo de *L. vannamei* juveniles y adultos.

Diversidad de especies	Órgano y condición														
	EA	EA4	EA8	EH	EM	HA	HA4	HA8	HH	HM	IA	IA4	IA8	IH	IM
<i>Vibrio azureus</i> (98%)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>V. sp.</i> (98%)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>V. campbelli</i> (98%)	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>V. diazotrophicus</i> (97%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. sp.</i> (97%)	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. harveyi</i> (97%)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. shilonii</i> (98%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>V. vulnificus</i> (91%)	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. sp.</i> (93%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-

EA: Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembras; **EM:** Estómago machos; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembras; **HM:** Hepatopáncreas machos; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8 días; **IH:** Intestino hembras; **IM:** Intestino machos; (+): Presencia; (-): Ausencia. Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de identidad de las secuencias al ser comparadas en la base de datos del NCBI.

6.4 Actinobacterias.

La PCR con estos cebadores dio como resultado un amplicon de 640 pb (figura 23). Con estos Amplicones se realizó una DGGE (figuras 24 y 25) con un gradiente de desnaturalización de 35 a 85%.

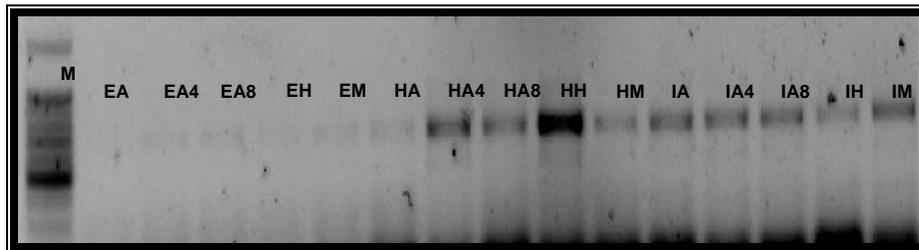


Figura 23. Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 640 pb obtenidos con los cebadores de Actinobacterias. Dónde: **M:** Marcador de 100 pb; **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

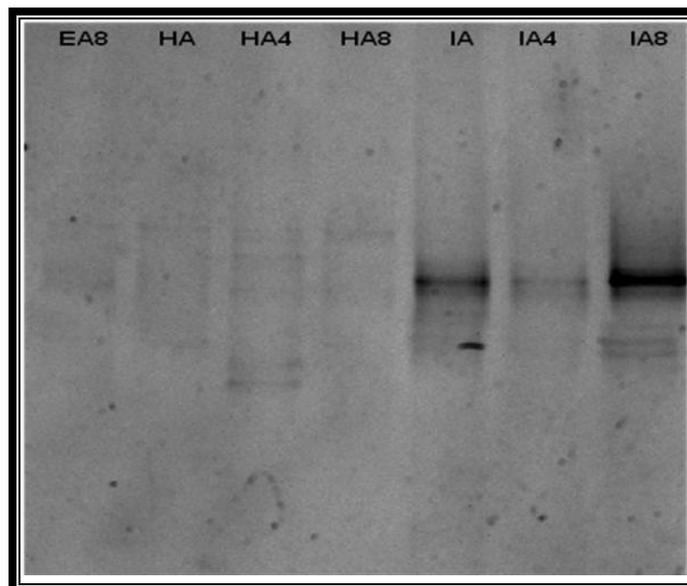


Figura 24. DGGE con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles con un porcentaje de desnaturalización del 35 al 85%. Dónde; **EA8:** Estómago ayuno 8 días; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas ayuno 8 días; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino ayuno 4 días; **IA8:** Intestino ayuno 8.

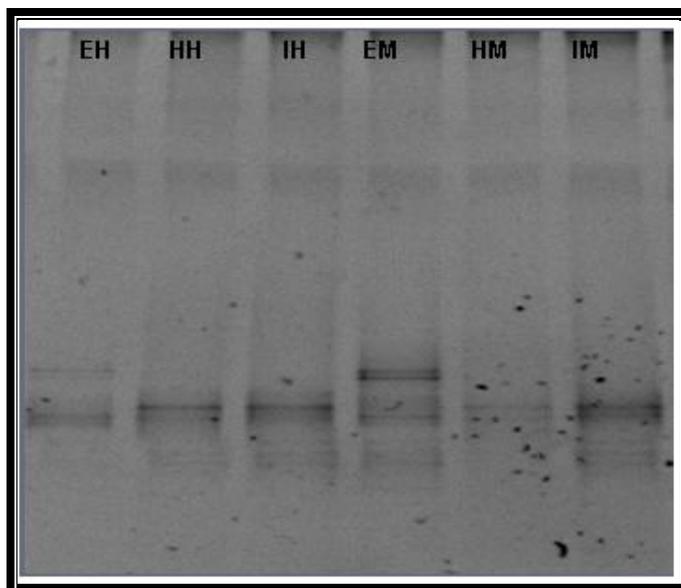


Figura 25. DGGE con los cebadores de Actinobacterias en camarones adultos, con un porcentaje de desnaturalización del 35 al 85%. Dónde: **EH:** Estómago hembra; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **IH:** Intestino hembra; **EM:** Estómago macho; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IM:** Intestino macho.

El DGGE de juveniles (figura 24) se obtuvieron 21 OTU's diferentes, para el estómago de camarones alimentado y en ayuno 4 días no se observaron OTU's. En el hepatopáncreas de camarones sometidos a 4 días de ayuno es cuando se aprecia mayor diversidad de OTU's con 8 en comparación con el de animales alimentados con 5 y a los 8 días de ayuno de igual manera con 5 OTU's, por otro lado en el caso del intestino de camarones juveniles alimentados y en ayuno, los intestinos alimentados presentaron mayor diversidad de OTU's con 6.

En la DGGE de organismos adultos se observaron 14 OTU's diferentes (figura 25), en este gel en todos los órganos y condiciones se observaron OTUs, En el estómago el de los machos presento mayor número de OTU's con 8, en el hepatopáncreas se obtuvieron 2 OTU's para machos y para hembras, en el caso del intestino se observó 5 OTU's para hembras y machos.

Las Actinobacterias son conocidas comúnmente como habitantes de suelos (Goodfellow and Williams, 1983; Rheims *et al.*, 1999), sin embargo en estudios recientes de comunidades microbiales acuáticas se han encontrado en

ambientes marinos y de agua dulce (Crump *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Methé *et al.*, 1998; Sekar *et al.*, 2003; Selje *et al.*, 2005). De todas las especies de Actinobacterias las que han sido reportadas comúnmente como habitantes del tracto gastrointestinal son las pertenecientes al género *Bifidobacterium* (Gatesoup, 2000; Ventura *et al.*, 2007), sin embargo en insectos los géneros de actinobacterias descritas asociadas al tracto gastrointestinal son *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Coriobacterium* y *Streptomyces* (Benyakir, 1987; Durvasula *et al.*, 2008; Kurtböke and French, 2007; Lefebvre *et al.*, 2009), muchos estudios indican que son esenciales para su desarrollo y reproducción (Benyakir, 1987; Durvasula *et al.*, 2008; Harrington, 1960; Baines, 1956).

Hace unos años se tenía la impresión de que la diversidad de Actinobacterias en el océano era pequeña, esta idea se ha venido desvaneciendo al ser utilizado el gen 16s ribosomal (Bull and Stach, 2007), entre los géneros de Actinobacterias marinas que se han descrito recientemente se encuentran *Salinispora* (*Micromonosporineae*) (Maldonado *et al.*, 2005), *Demequina* (*Micrococcinae*) (Yi *et al.*, 2007), y otros esperando una descripción taxonómica formal: *Marinispora* (Kwon *et al.*, 2006), *Solwaraspora* (Magarvey *et al.*, 2004) y *Lamerjespora* (Fortman *et al.*, 2005). Stevens y colaboradores (2007) obtuvieron buenos resultados al emplear los mismos cebadores con la DGGE en ecosistemas sedimentarios.

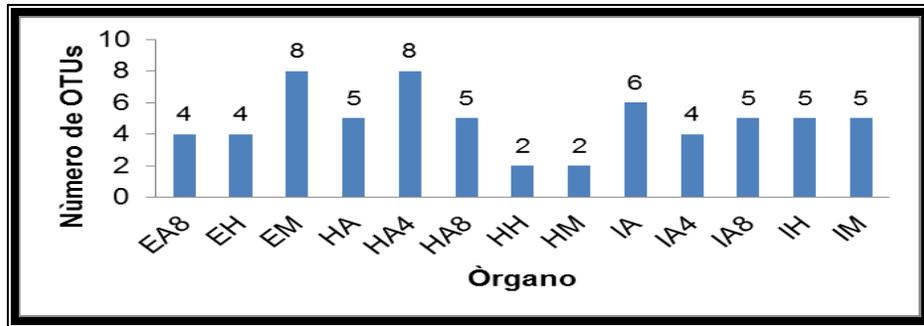


Figura 26. Riqueza de OTU's en la DGGE con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

Los cálculos de los índices de diversidad nos indican que en los juveniles el índice de Shannon Wiener el valor mas alto se encontró en 1.78 del hepatopáncreas en ayuno 4 días y el de menor valor fue del intestino en ayuno 4 días, en relación a la abundancia el índice de Simpson nos indica que el órgano que sus especies son mas abundantes es el hepatopáncreas en ayuno 4 días, mientras que el órgano que sus especies están distribuidas mas uniformemente fue el hepatopáncreas en ayuno 4 días.

En la DGGE de adultos los valores del índice de Shannon Wiener van de 2.07 (estómago de los machos) a 0.69 (hepatopáncreas de hembras y machos), el estómago de los machos fue el más abundante y el de menor abundancia fueron los hepatopáncreas en ambos sexos según el índice de Simpson, la equidad según el índice de Evenness nos indica que el estómago de los machos es el que tiene similar abundancia entre sus OTUs.

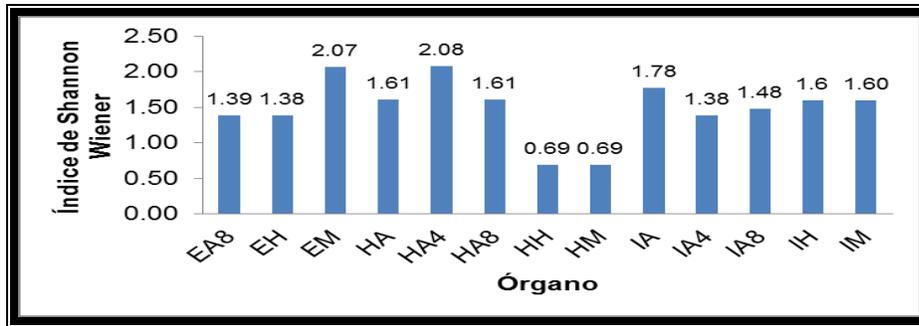


Figura 27. Índice de Shannon–Wiener con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

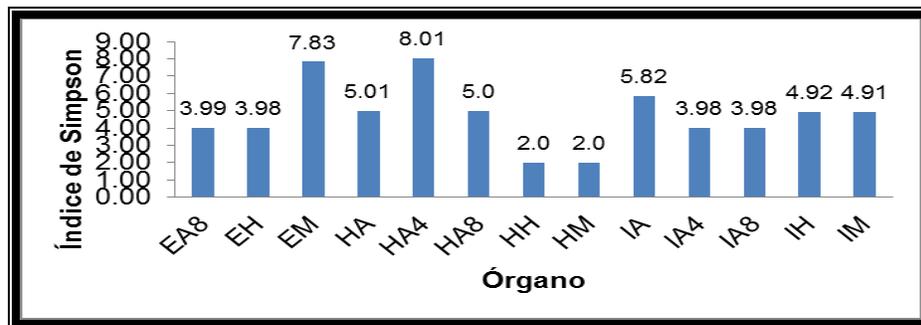


Figura 28. Índice de Simpson con los cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

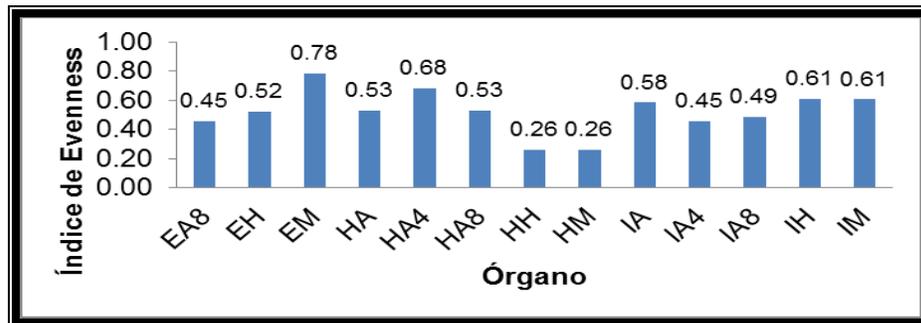


Figura 29. Índice de Evenness con cebadores de Actinobacterias en camarones adultos. Dónde: **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IM:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

El método del vecino más cercano aplicado al gel de juveniles Figura 30, nos permite observar que el intestino en ayuno 4 y 8 días son los que se encuentran mas relacionados, así mismo el hepatopáncreas alimentado y a los 8 días de ayuno se encuentran fuertemente relacionados.

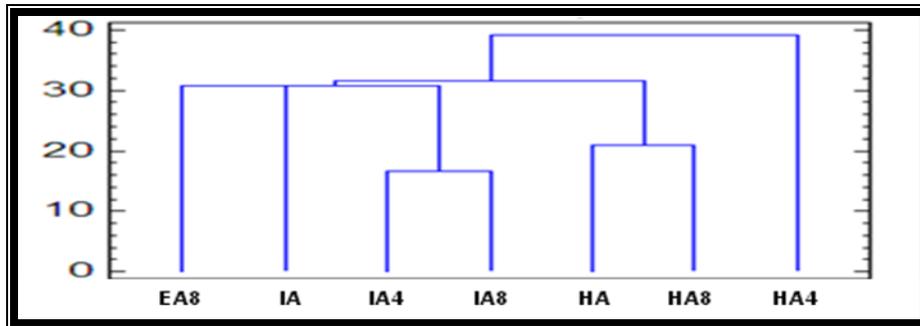


Figura 30. Método del vecino más cercano con cebadores de Actinobacterias en camarones juveniles. Dónde: **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas ayuno 8 días; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino ayuno 4 días; **IA8**: Intestino ayuno 8.

En la figura 31 el método del vecino más cercano nos permite observar que la microbiota de machos y hembras en el hepatopáncreas e intestino es idéntica, mientras que en el estómago la condición existen diferencias en la composición de la microbiota debidas al sexo.

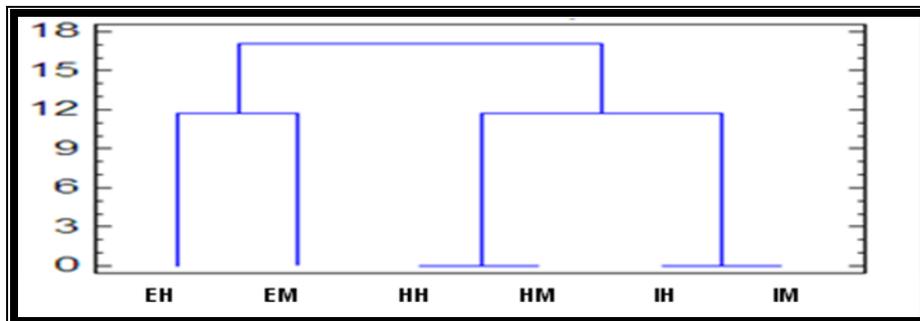


Figura 31. Método del vecino más cercano con cebadores de Actinobacterias en camarones adultos. Dónde: **EH**: estómago hembra; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **IH**: Intestino hembra; **EM**: Estómago macho; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IM**: Intestino macho.

De las bandas que se cortaron en la DGGE, solo se pudieron reamplificar siete bandas pertenecientes al intestino de camarones juveniles alimentados y en ayuno (4 y 8 días), se realizó la búsqueda en el software en línea Rapid Annotation using Subsystem Technology (MG-RAST). Los género encontrados fueron: *Demequina* (1), *Brevibacterium* (5), que se encontraron en camarones juveniles en el estomago, hepatopáncreas e intestino.

El género *Brevibacterium* fue propuesto por Breed (1953), sus especies se han aislado de productos lácteos, muestras clínicas, corrales, suelos, y de ambientes marinos como son algas y sedimentos de la playa (Ivanova *et al.*, 2004; Lee, 2006), alguna especies como son *B. linens*, *B. epidermis* (Onraedt *et al.*, 2005), *B. oceani* (Bhadra *et al.*, 2008), *B. marinum* (Lee, 2008) son tolerantes a la salinidad. Las especies *B. linens*, *B. casei*, *B. iodinum* y *B. epidermis*, no son patógenos, sin embargo las especies *B. avium*, *B. mcbrellneri*, *B. paucivorans* son consideradas como de alto riesgo por encontrarse asociadas en infecciones de animales (Pascual y Collins, 1999; Wauters *et al.*, 2001). En cuanto a las funciones que tiene este género se encuentran que las bacterias *B. linens* y *B. casei*, contribuyen a la formación del aroma y maduración de los quesos, así como también en la producción de sustancias antimicrobiales, y de carotenoides (Onraedt *et al.*, 2005). Las especies *B. flavum* y *B. lactofermentum* han sido reportados como productores de los aminoácidos lisina y ácido glutámico (Momose y Takagi, 1978; Das *et al.*, 1995; Shiratsuchi *et al.*, 1995). Asumiendo que los camarones en este estudio se encontraban sanos, las bacterias de este género podrían estar regulando la población de bacterias patógenas ya que producen compuestos antimicrobianos o ayudando en la digestión de los alimentos ya que producen aminoácidos.

Por su parte el género *Demequina* fue descrito por Yi *et al.*, (2007), al encontrarla en sedimentos de Korea. Las especies del género que se han descrito son *Demequina aestuarii* aislada de sedimentos (Yi *et al.*, 2007), *D. lutea*, aislada de suelo (Finster *et al.*, 2009), *D. globuliformis*, *D. oxidasica*, y *D. aurantiaca*,

aisladas de ambientes marinos (Ue *et al.*, 2010), *D. salsinemoris* aislada del suelo (Matsumoto *et al.*, 2010), hasta el momento no existe referencia alguna de la función que desempeñen en sus respectivos ecosistemas.

6.5 Bacterias ácido lácticas.

Se utilizaron los cebadores BaciF:348-BaciR:1203 (figura 32), estos cebadores amplifican para la clase Bacilli y el tamaño del amplicón fue de 900 pb, posteriormente se realizó el PCR semianidado.

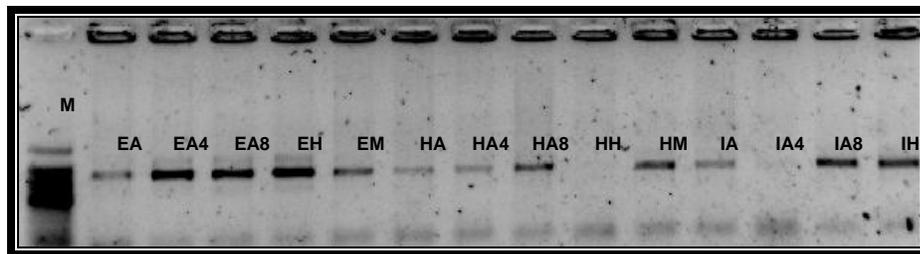


Figura 32. Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 900 pb obtenidos con los cebadores BaciF: 348-BaciR:1203. Dónde: **M:** Marcador de 100 pb; **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra.

Familia Lactobacillaceae (Lb/F:696 -GC BaciR:1203)

En la figura 33 se aprecian los amplicones con los cebadores Lb/F:696 -GC BaciR, los cuales amplifican para los miembros de la familia Lactobacillaceae y el amplicón fue de 548 pb, en la figura 32 y 33 se aprecian las DGGE para juveniles y adultos.



Figura 33. Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 548 pb obtenidos con los cebadores Lb/F:696-GCBaciR:1203. Dónde: **M**: Marcador de 100 pb; **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8 días; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

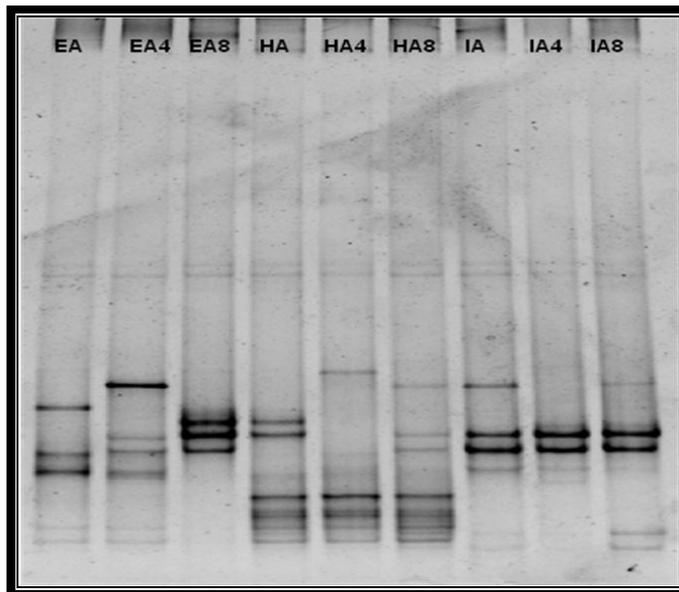


Figura 34. DGGE en camarones juveniles con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago ayuno 4 días; **EA8**: Estómago ayuno 8 días; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas ayuno 8 días; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino ayuno 4 días; **IA8**: Intestino ayuno 8 días.

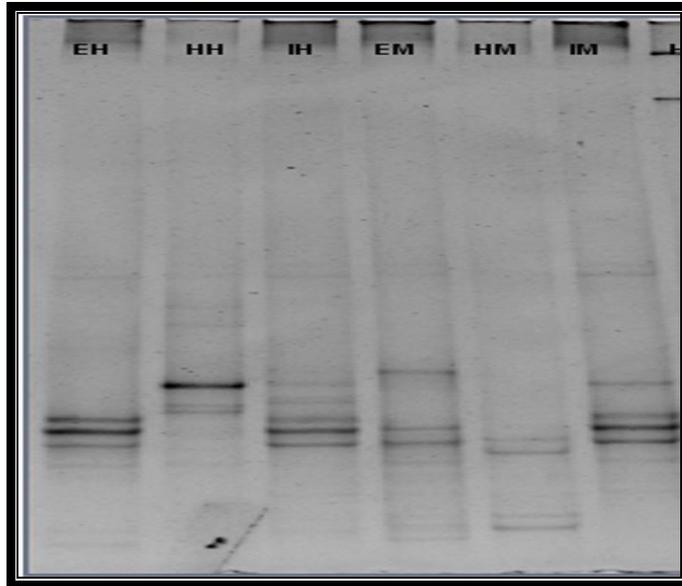


Figura 35. DGGE en camarones adultos con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%. Dónde: **EH:** Estómago hembra; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **IH:** Intestino hembra; **EM:** Estómago macho; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IM:** Intestino macho.

Del análisis del DGGE en camarones juveniles se obtuvieron 25 OTU's diferentes (Figura 34 y 36), el hepatopáncreas de camarones en ayuno 8 días presento mayor diversidad de OTU's con 15, el órgano de menor diversidad fue el estómago de organismos en ayuno 8 días, en el estómago de animales alimentados se observaron 9 OTU's el mismo número que en el estómago provenientes de ayuno 4 días sin ser los mismo y al permanecer 8 días en ayuno la microbiota del estómago disminuyo al observarse 8 OTU's; en el hepatopáncreas se produce cambios en el ayuno, en el alimentado se aprecian 14 OTU's al ser sometido en ayuno 4 días la microbiota del hepatopáncreas disminuye observándose 11 OTU's pero al ser sometido en ayuno 8 días la microbiota aumenta a 15 OTU's; por su parte en el intestino alimentado y en ayuno 4 días se observan 10 OTU's y al dejarlos un mayor tiempo en ayuno aumenta la microbiota, por lo que en el caso del hepatopáncreas y el intestino al ser sometidos al ayuno durante más tiempo (8 días) su microbiota aumenta.

En la DGGE de adultos (Figuras 35 y 36) se detectaron 30 OTU's diferentes los que presentaron mayor diversidad fueron el intestino de las hembras y el alimento con 14, el que presento menor diversidad de OTU's fue el hepatopáncreas de los machos con 8, en el estómago de hembras y machos la diversidad de OTU's es distinta y el de mayor diversidad fue el del macho, mientras que en el hepatopáncreas el de las hembras presento mayor diversidad de OTU's con 11, y por último en el intestino de las hembras se observa mayor diversidad.

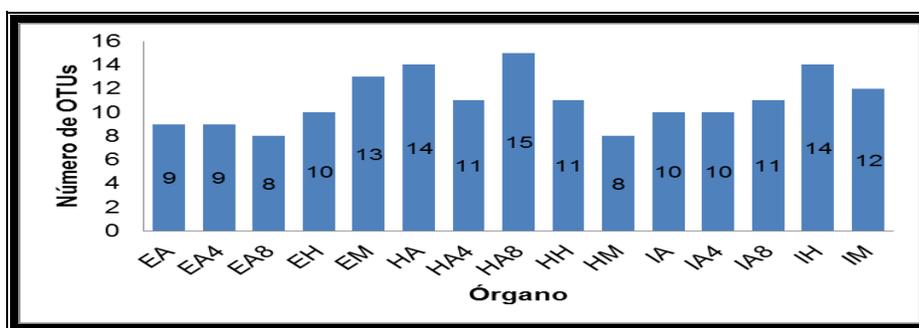


Figura 36. Riqueza de OTU's con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

En las figuras 37, 38 y 39 se presentan los índices de diversidad calculados para este juego de cebadores.

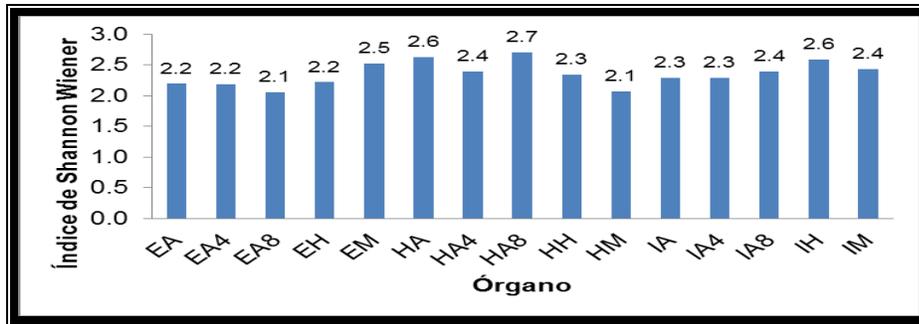


Figura 37. Índice de Shannon-Wiener con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

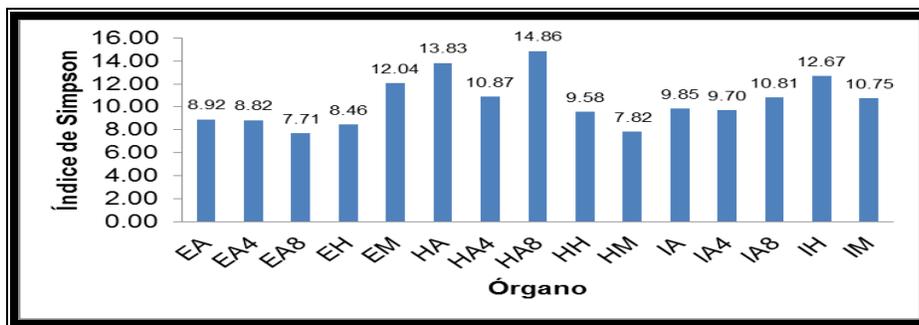


Figura 38. Índice de Simpson con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos. Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

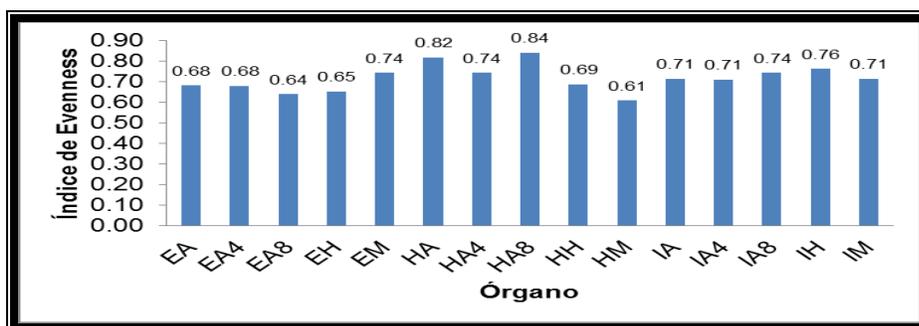


Figura 39. Índice de Evenness con los cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles y adultos. Dónde **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

El índice de Shannon-Wiener para los camarones juveniles tiene valores que van de 2.7 del hepatopáncreas en ayuno 8 días a 2.1 del estómago en ayuno 8 días, el órgano que presentó mayor abundancia según el índice de Simpson fue el hepatopáncreas en ayuno 8 días; para la distribución de los OTU's en cada órgano, el índice de Evenness nos indica que el hepatopáncreas en ayuno 8 días tiene distribuidas más equitativamente sus OTU's y el de menor es el estómago en ayuno 8 días. En el DGGE de adultos el intestino de la hembras fue el que presentó mayor diversidad según el índice de Shannon-Wiener, mayor abundancia de acuerdo al índice de Simpson y sus OTU's se encuentran distribuidos más uniformemente en comparación con los demás órganos.

El método del vecino más cercano aplicado a la DGGE de juveniles (Figura 40), nos indica que los tejidos que se encuentran relacionados en sus OTU's son el intestino en ayuno a los 4 y 8 días, en términos generales el intestino en sus tres condiciones se encuentran cercanos con el estómago en las dos condiciones de ayuno, pudiendo ser que estos órganos se encuentran cerca del exterior. El intestino y el hepatopáncreas se agrupan en sus diferentes tratamientos.

En la DGGE de adultos el método del vecino más cercano (Figura 41), nos indica que la microbiota presente en el intestino de camarones machos y hembras se encuentran cercanas, el estómago de los machos es más cercano al intestino, y el hepatopáncreas es el que se encuentra distante con respecto a los otros órganos.

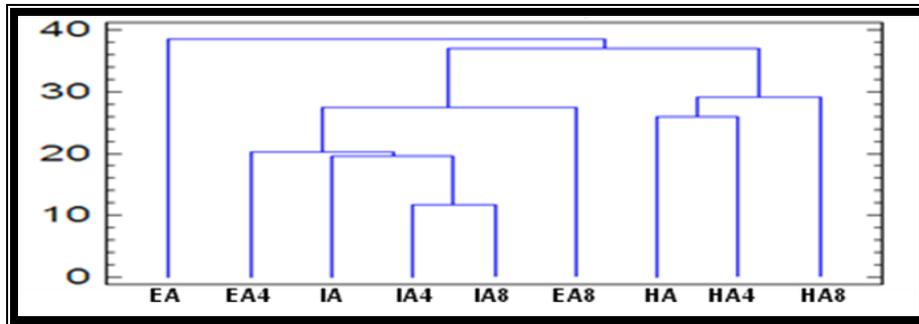


Figura 40. Método del vecino más cercano con cebadores Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8.

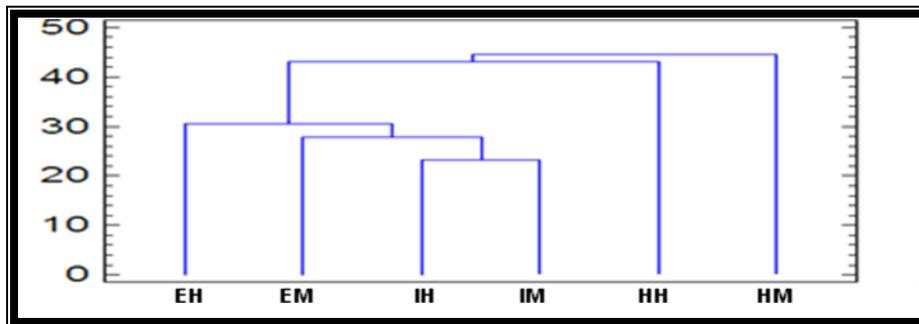


Figura 41. Método del vecino más cercano con cebadores de Lb/F:696-GCBaci/R:1203 en camarones adultos. Dónde: **EH**: Estómago hembra; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **IH**: Intestino hembra; **EM**: Estómago macho; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IM**: Intestino macho.

Familia Leuconostocaceae (Leu/F:403 - GCBaciR/1203).

En la figura 42 se observan los amplicones de 840pb obtenidos con estos cebadores, los cuales amplifican para los miembros de la familia Leuconostocaceae. En la figura 41 y 42 se observan las DGGE de juveniles y adultos.

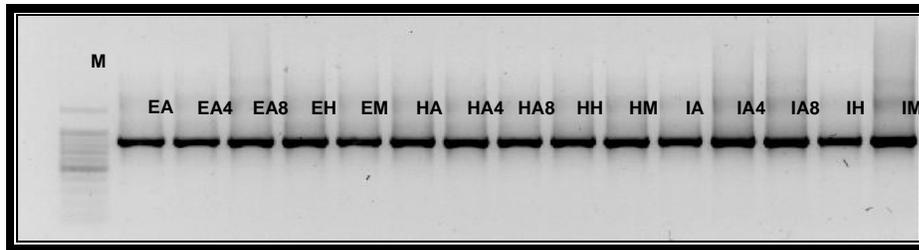


Figura 42. Gel de agarosa al 2% con los amplicones de 840 pb obtenidos con los cebadores Leu/F:403–GCBaciR/1203. Dónde: **M**: Marcador de 100 pb; **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

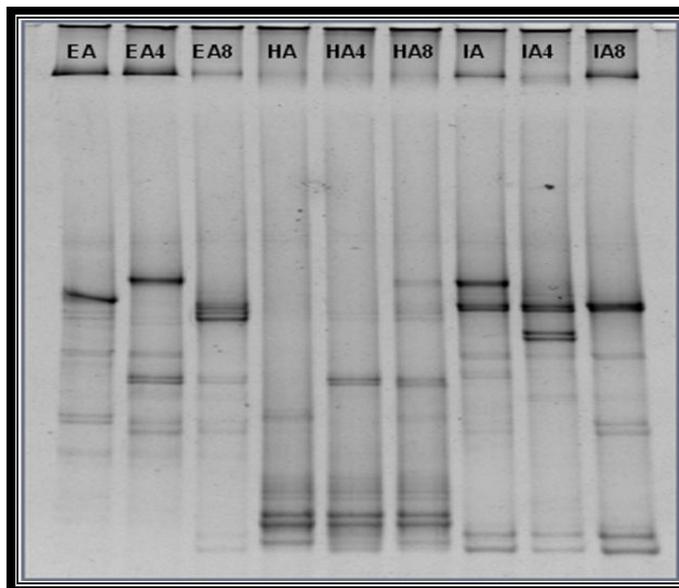


Figura 43. DGGE en juveniles con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8.

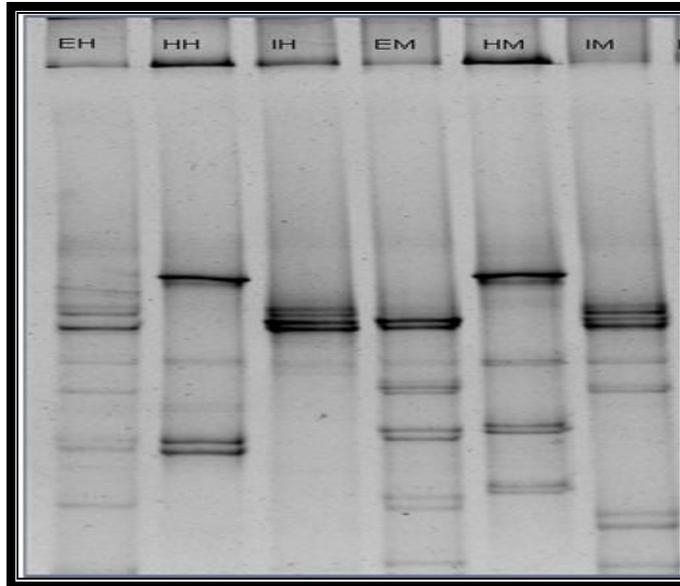


Figura 44. DGGE en adultos con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203, con un porcentaje de desnaturalización del 40 al 55%. Dónde: **EH:** Estómago hembra; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **IH:** Intestino hembra; **EM:** Estómago macho; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IM:** Intestino macho.

Para los camarones juveniles, de los amplicones desnaturalizados en DGGE se observaron 47 OTU's diferentes (Figura 43 y 45), el estómago en ayuno de 8 días y el intestino de animales alimentados presentaron mayor número de OTU's con 20 diferentes, el intestino en ayuno de 8 días presento menor diversidad, el ayuno es factor en los tres órganos ya que en el estómago y hepatopáncreas se observa mayor diversidad a los 8 días de ayuno mientras la microbiota en el intestino disminuye conforme aumenta el tiempo en ayuno. Las bacterias de la familia *Leuconostocaceae* en juveniles se presentan en más abundancia en el estómago.

En la DGGE de adultos el estómago de camarones hembras presentó mayor diversidad de OTU's con 17 (Figuras 44 y 45), el de menor diversidad fue el hepatopáncreas y el intestino de las hembras con 8 OTU's, en el estómago se observa que hay diferencia debida al sexo, y el estómago de las hembras presenta mayor número de OTU's, por su parte en el hepatopáncreas y en el intestino, en el de los machos se observa mayor diversidad. En adultos el órgano en donde se

observó mayor diversidad de OTU's de la familia *Leuconostocaceae* fue el estómago.

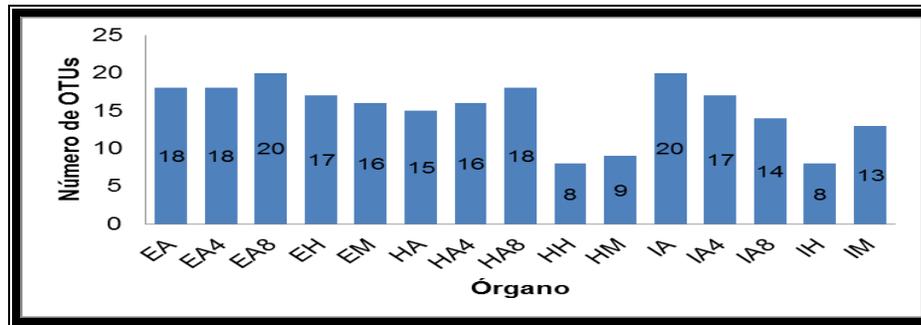


Figura 45. Riqueza de OTU's con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203. Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

En las figuras 46, 47, y 48 se aprecian los índices de diversidad aplicados a la DGGE con los cebadores Leu/F:403 - GCBaci/R:1203. Para los juveniles el índice de Shannon Wiener presenta valores de 2.80 para el hepatopáncreas en ayuno 8 días y el intestino alimentado, y de 2.4 para el intestino en ayuno 8 días; el órgano que tiene la mayor probabilidad de que si se toman dos organismos al azar pertenezcan al mismo OTU es el hepatopáncreas en ayuno 8 días; según el índice de Evenness el órgano que todos sus OTU's tienen similar abundancia de organismos es el hepatopáncreas en ayuno 8 días y el de menor equidad es el intestino en ayuno 8 días.

Los índices de diversidad para los adultos indican que los valores del Índice de Shannon Wiener van de 2.7 del estómago de las hembras a 1.9 del hepatopáncreas e intestino de la hembra; el órgano que presento mayor abundancia según el índice de Simpson es el estómago de camarones hembras y el de menor abundancia el hepatopáncreas de camarones hembras; en el índice

de equidad de Evenness el estómago de camarones hembra presenta mayor homogeneidad en la abundancia de sus OTU's.

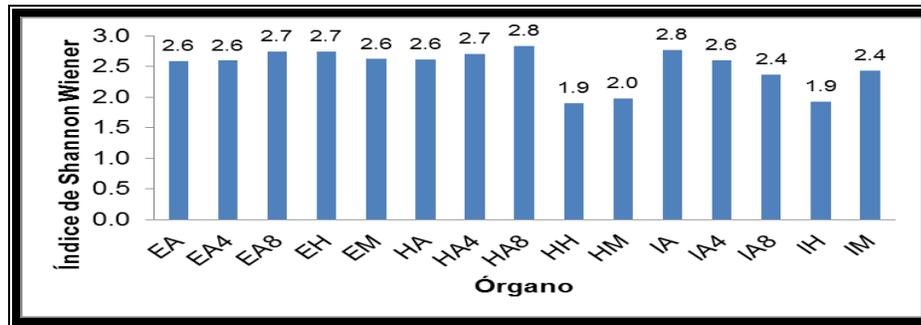


Figura 46. Índice de Shannon-Wiener aplicados a la DGGE con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

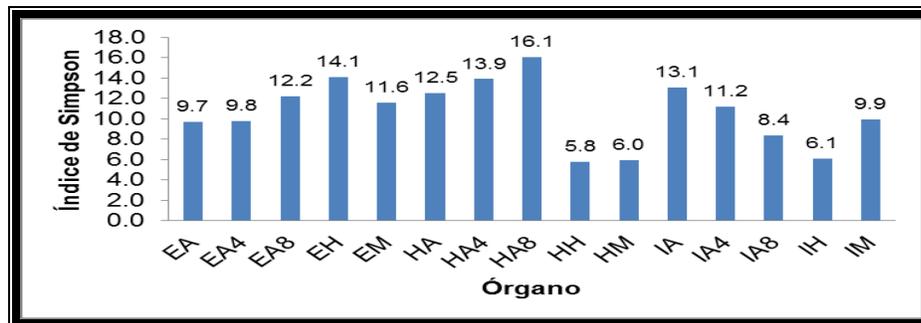


Figura 47. Índice de Simpson aplicados a la DGGE con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **EH**: Estómago hembra; **EM**: Estómago macho; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH**: Hepatopáncreas hembra; **HM**: Hepatopáncreas macho; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8; **IH**: Intestino hembra; **IM**: Intestino macho.

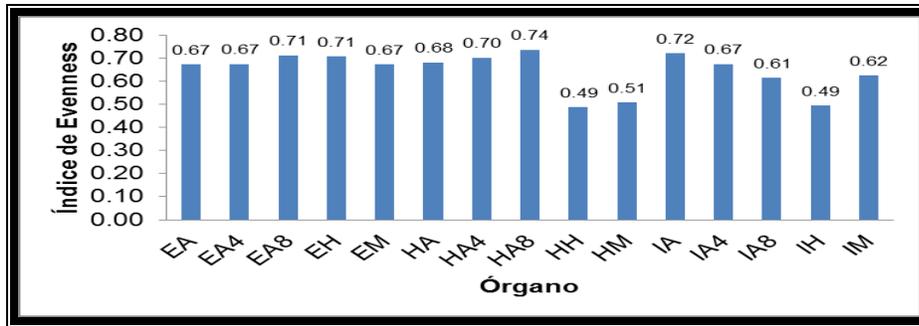


Figura 48. Índice de Evenness aplicados a la DGGE con los cebadores Leu/F:403-GCBaci/R:1203. Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **EH:** Estómago hembra; **EM:** Estómago macho; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8; **IH:** Intestino hembra; **IM:** Intestino macho.

En la figura 49 se presentan el método del vecino más cercano para los camarones juveniles, en donde la microbiota del hepatopáncreas en ayuno a los 4 y ocho días se encuentran más cercanos, en las circunstancias en los que se dejó a los camarones en ayuno 4 y 8 días para el estómago, hepatopáncreas e intestino se encuentran relacionadas. El hepatopáncreas en las 3 condiciones se encuentran agrupadas.

En la figura 50 se aplica el método del vecino mas cercano a la DGGE de los adultos, en donde se tiene que las microbiotas que se encuentran mas cercanas son el estómago y el intestino de los machos, el hepatopáncreas de hembras y machos se agrupan y se encuentran distantes del estómago e intestino en ambos sexos.

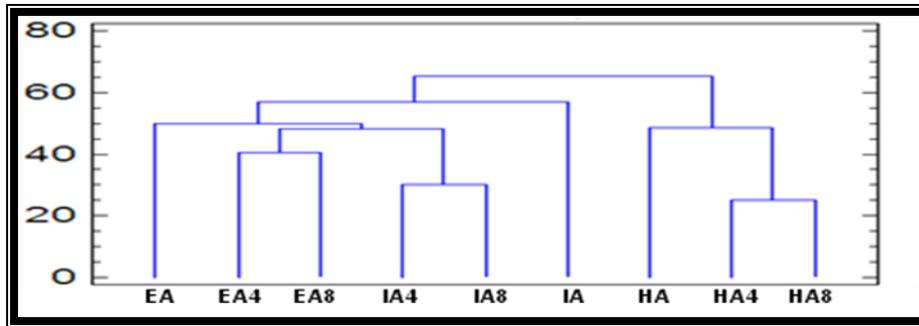


Figura 49. Método del vecino más cercano con cebadores de Leu/F:403-GCBaci/R:1203 en camarones juveniles. Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8.

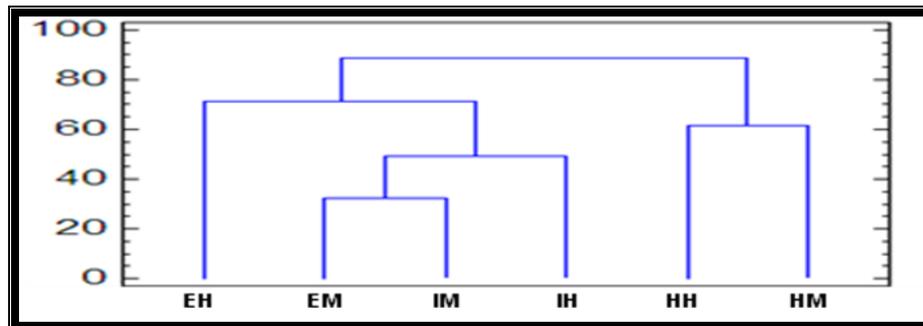


Figura 50. Método del vecino más cercano con cebadores de Leu/F:403-GCBaci/R:1203 en camarones adultos. Dónde: **EH:** Estómago hembra; **HH:** Hepatopáncreas hembra; **IH:** Intestino hembra; **EM:** Estómago macho; **HM:** Hepatopáncreas macho; **IM:** Intestino macho.

Los resultados de las secuencias que se obtuvieron en ambas DGGE de bacterias ácido lácticas se presentan en las siguientes imágenes, las muestras se mandaron a secuenciar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

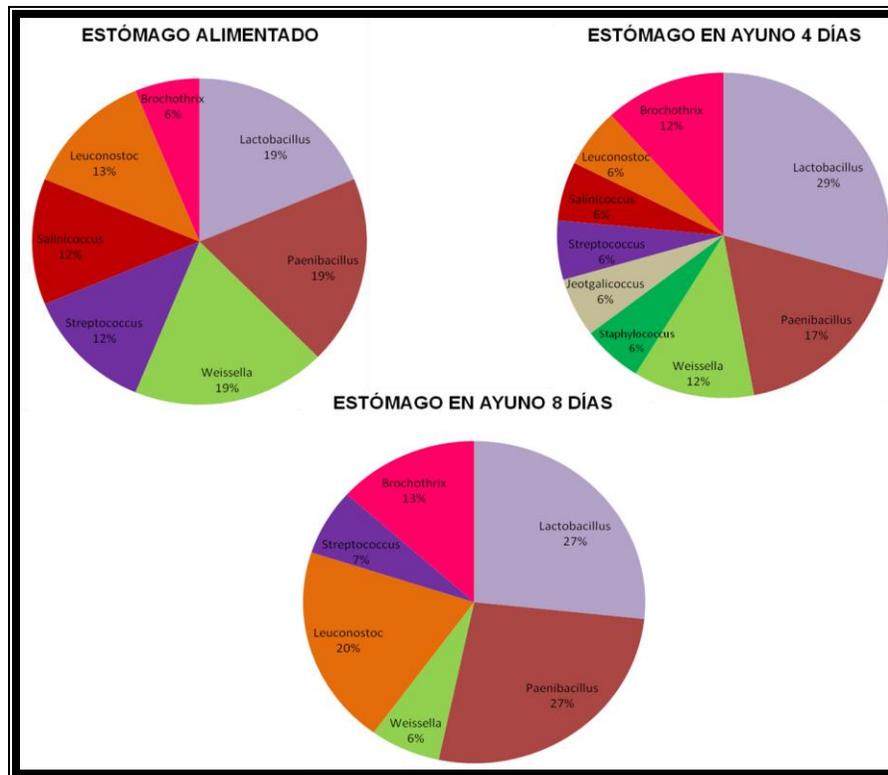


Figura 51. Géneros de BAL en el estómago de camarones juveniles *L. vannamei* alimentados y en ayuno en diferentes tiempos.

En la figura 51 se observa los géneros de bacterias presentes en el estómago de camarones alimentados, en ayuno a los 4 y 8 días. En el estómago alimentado los género de bacterias *Lactobacillus*, *Paenibacillus* y *Weissella* comparten la misma proporción y son los más abundantes en esta condición y órgano, el género de menor proporción fue *Brochothrix*, en el estómago en ayuno 4 días el género *Lactobacillus* fue el más abundante, y por su parte en el estómago en ayuno 8 días los géneros más abundantes fueron *Lactobacillus* y *Paenibacillus*. Los géneros *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, y *Brochothrix* se encuentran en los tres tratamientos en distintas proporciones. El estómago en ayuno a los 4 días presento mayor diversidad de géneros con respecto a los otros dos tratamientos, los géneros *Staphylococcus* y *Jeotgalicoccus* se encuentran únicamente en los estómagos sometidos al ayuno por 4 días.

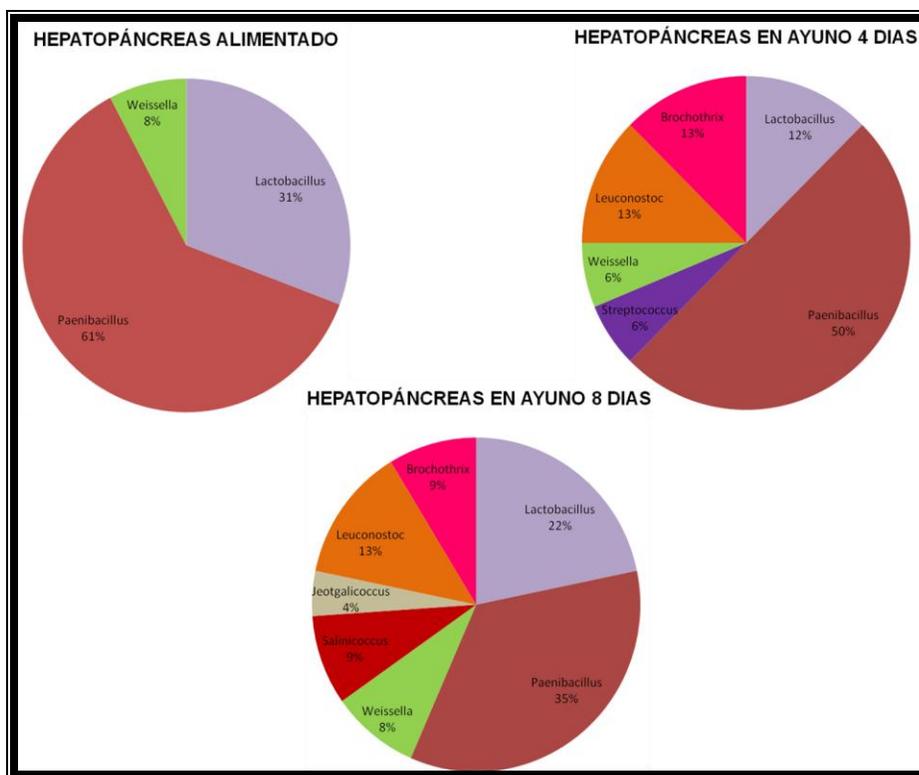


Figura 52. Géneros de BAL en el hepatopáncreas de camarones juveniles *L. vannamei* alimentados y en ayuno en diferentes tiempos.

En la figura 52 se observa los géneros de bacterias ácido lácticas presentes en el hepatopancreas de camarones juveniles en diferentes condiciones. El género *Paenibacillus* fue el más abundante en el hepatopáncreas en las 3 condiciones, los géneros *Lactobacillus*, *Paenibacillus* y *Weissella* se encuentran en las 3 condiciones, y los géneros *Brochothrix* y *Leuconostoc* se encontraron en los organismos que permanecieron en ayuno, por otro lado el hepatopáncreas en ayuno 8 días presentó mayor diversidad de géneros y el de menor diversidad de géneros fue el hepatopáncreas alimentado, los géneros *Salinicoccus* y *Jeotgalicoccus* se observan únicamente en el hepatopáncreas en ayuno 8 días, mientras que el género *Streptococcus* solo se presentó en el hepatopáncreas en ayuno 4 días.

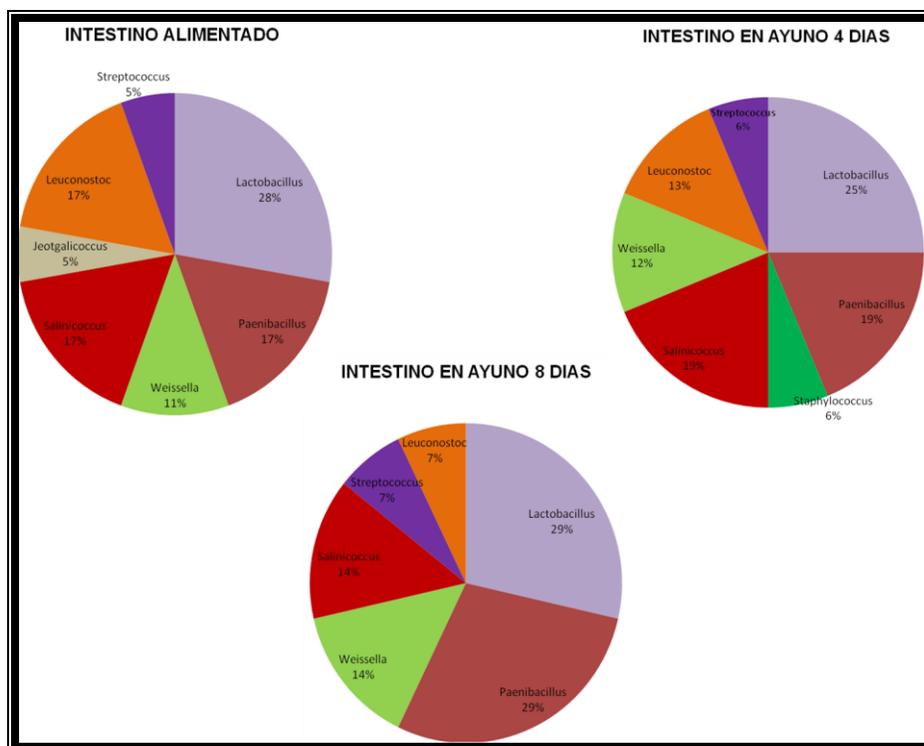


Figura 53. Géneros de BAL en el intestino de camarones juveniles *L. vannamei* alimentados y en ayuno en diferentes tiempos.

En la figura 53 se aprecia la diversidad de géneros de bacterias ácido lácticas presentes en el intestino de camarones alimentados y en ayuno en diferentes tiempos. Los géneros *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Salinicoccus* y *Leuconostoc* se encontraron en las tres condiciones, el intestino alimentado y en ayuno 4 días presentan el mismo número de géneros pero son diferentes en cada condición, el género *Lactobacillus* fue el más abundante en el intestino en las 3 condiciones en las que se sometieron a los camarones, el género *Jeotgalicoccus* se encontró únicamente en el intestino alimentado, y el género *Staphylococcus* solo se encontró en el intestino en ayuno 4 días.

Está documentado que las bacterias ácido lácticas constituyen una fracción importante de la microbiota nativa de los animales acuáticos (Ringo,

2004). Los géneros *Lactobacillus*, *Paenibacillus* y *Weissella* se encontraron en los 3 órganos y en las 3 condiciones.

El género *Lactobacillus* se encontró en todos los órganos y condiciones de camarones juveniles y adultos *L. vannamei*. Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran que el género *Lactobacillus* se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal tal como lo describen Walter (2008), Hammes and Vogel (1995), Tannock (1995), Ringo (2004), Hovda *et al.*, (2007), este género se caracteriza por un amplio espectro de fermentación, así mismo especies de este género se han propuesto como microorganismos probióticos para acuicultura (Holzapfel *et al.*, 1998). En este sentido Ajitha *et al.*, (2004) probó *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, contra *Vibrio alginolyticus* en *Penaeus* (Fenneropenaeus) *Indicus* (H. Milne Edwards) obteniendo resistencia a la enfermedad causada por esta bacteria. Chiu *et al.*, (2007) adiciona *Lactobacillus plantarum* al cultivo de *L. vannamei* obteniendo un incremento en la respuesta inmune celular y humoral.

Por su parte las especies del género *Weissella* se encontraron en todos los órganos y condiciones de camarones juveniles y adultos *L. vannamei*. El género *Weissella* se ha encontrado en vegetales frescos (*Weissella paramesenteroidetes*) (Dellaglio and Torriani, 1986; Dellaglio *et al.*, 1984), en carne y productos cárnicos (*Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica* and *Weissella viridescens*) (Niven *et al.*, 1957; Milbourne, 1983; Collins *et al.*, 1993), en caña de azúcar, jugo de zanahoria, ocasionalmente en leche cruda y aguas negras (*Weissella confusa*) (Hammes and Vogel, 1995), productos fermentados de pescado (*Weissella thailandensis*) (Tanasupawat *et al.*, 2000), del suelo (Chen *et al.*, 2005), infecciones en humanos y animales (Bjorkroth *et al.*, 2002), en sedimentos de lagunas (Zamudio *et al.*, 2008) y en tracto digestivo del salmón (Hovda *et al.*, in press). Hasta el momento no existe referencia de que alguna especie del género *Weissella* sean parte de la microbiota del tracto digestivo del camarón mucho menos de la actividad que pueda ejercer en el tracto digestivo, sin embargo existe

un estudio realizado por Srionnual *et al.*, (2007) y Papathanasopoulos *et al.*, (1997) en el que logran aislar bacteriocinas producidas por especies del género *Weissella* e inhiben algunas bacterias gram positivas, Matamoros *et al.*, (2009) señala que las bacterias del género *Weissella* producen compuestos antimicrobianos como peróxido de hidrogeno, diacetilo y bacteriosinas. Serna *et al.*, (2010) probó *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* el resultado que obtuvo fue inhibición del crecimiento de esas bacterias. En el camarón blanco podría estar actuando en contra de las bacterias Gram positivas que son patógenas, teniendo una actividad positiva para el camarón.

El género *Paenibacillus* este género fue propuesto en 1993 por Ash y colaboradores, es un género cercano al género *Bacillus*, este género se observó en el presente estudio en el estómago, hepatopáncreas e intestino de camarones juveniles *L. vannamei* alimentados y en ayuno; y en camarones adultos no estuvo presente. Las especies pertenecientes al género *Paenibacillus* se han identificado en sistemas agrícolas, suelos, agua, larvas de insectos y alimentos (Daane *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2009), rizosfera (Rivas *et al.*, 2005), heces de vacas (Velázquez *et al.*, 2004), y composta (Vaz-Moreira *et al.*, 2007), de las cepas encontradas se han comercializado como fungicidas biológicos, insecticidas, nematocidas y promotores del crecimiento (Mcspadden, 2004; Paulitz y Belanger, 2001; Siddiqui y Mahmood, 1991), algunas especies de *Paenibacillus* son capaces de producir polisacáridos, aminoácidos, metabolitos secundarios o enzimas extracelulares como xilanasas, celulasas y amilasas (Choi *et al.*, 2008), y unas cepas fijan nitrógeno atmosférico (Poly *et al.*, 2001). Este género de bacterias al ser común de los sistemas agrícolas una de las vías de acceso al camarón sería que a pocos kilómetros de la población se encuentran cultivos agrícolas, pudiendo filtrarse al manto freático y de allí al mar, hasta llegar a los estanques de cultivo de camarón o por la rizosfera del mangle que se encuentra en la ciénega.

El género *Leuconostoc* en camarones juveniles se encuentra en el estómago e intestino alimentado y en ayuno a los 4 y 8 días, en el hepatopáncreas

se encuentra a los 4 y 8 días de ayuno, por su parte en camarones adultos se encuentra en el estómago e intestino de machos y hembras. Este género de bacterias se caracteriza por metabolizar el citrato, por esta característica son de interés en las queserías (Menéndez y Rodríguez, 2000), la especie *Leuconostoc mesenteroides* se ha utilizado como probiótico en acuicultura específicamente en peces, dando buenos resultados ya que son capaces de persistir en el intestino de los organismos y aumentan significativamente la actividad de la lisozima (Balcazar *et al.*, 2007a, 2007b, 2007c).

El género *Salinicoccus* se encontró en camarones juveniles *L. vannamei* en el estómago alimentado y en ayuno 4 días, y en el intestino en las 3 condiciones, mientras que en los camarones adultos se encontró en el estómago e intestino de los machos, lo que nos hace suponer que es una bacteria transitoria debido a que todos los reportes de la presencia de especies de este género hacen referencia a salineras o en aguas de mar (Franca *et al.*, 2006), y como el estómago y el intestino se encuentran en mayor contacto con el exterior por esta razón podríamos observar con mayor frecuencia este género de bacterias sin embargo en el 2007 Aslam y colaboradores describieron una nueva especie de *Salinicoccus* aislada de un alimento tradicional de Korea a base de mariscos (Jeotgal) siendo la especie *Salinicoccus jeotgali*.

El género *Brochothrix* se encuentra cercano al género *Listeria*, fue obtenido en el estómago en las tres condiciones, en el hepatopáncreas en ayuno 4 y 8 días en camarones juveniles, únicamente dos especies se han descrito para este género: *Brochothrix thermosphacta* y *Brochothrix campestris*, estas especies no son patógenas los miembros de este género se han aislado de carne, suelo y grasa, se ha documentado que producen una bacteriocina nombrada Brochocin-C la cual inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas (Siragusa y Nettles, 1993).

En el estómago e intestino se da relación de que al dejarlos en ayuno 8 días se encuentra menor diversidad de géneros de bacterias ácido lácticas, esto se puede deber a que las bacterias les sirven como un recurso de alimento (Harris, 1993; Langdon y Newell 1990; Carman *et al.*, 1989; Carman y Thistie 1985) ya que se encuentran en ayuno o también la razón por la que se observa mayor o menor número de géneros en el tracto digestivo del camarón blanco se pudiera deber a lo que mencionan Ringo y Gatesoupe (1998) y Villamil *et al.*, (2003), que las bacterias aisladas de organismos en cultivo o de su entorno tienen mayor capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal y a los tejidos, que las de otras bacterias foráneas que suelen ser transitorias, y es lo que podemos observar que al dejar a los camarones en ayuno, las bacterias propias del camarón están permaneciendo adheridas a los tejidos y las demás son transitorias. Por su parte Rinkinen *et al.*, (2003) señala que las bacterias ácido lácticas tienen una gran capacidad de adherencia al mucus intestinal y que no tienen un hospedero específico para adherirse, este es uno de los motivos por los que las BAL son utilizadas como probióticos.

En el hepatopáncreas que se encuentra mayor diversidad de géneros en ayuno a los 8 días como ocurre en el camarón hidrotermal *Rimicaris exoculata* en donde se observó la microbiota en diferentes tiempos de ayuno siendo 8, 22 y 72 horas y un control que fueron alimentados, en ese experimento las BAL (Firmicutes) presentaron mayor diversidad a las 72 horas en comparación con los otros tratamientos (Durand *et al.*, 2010).

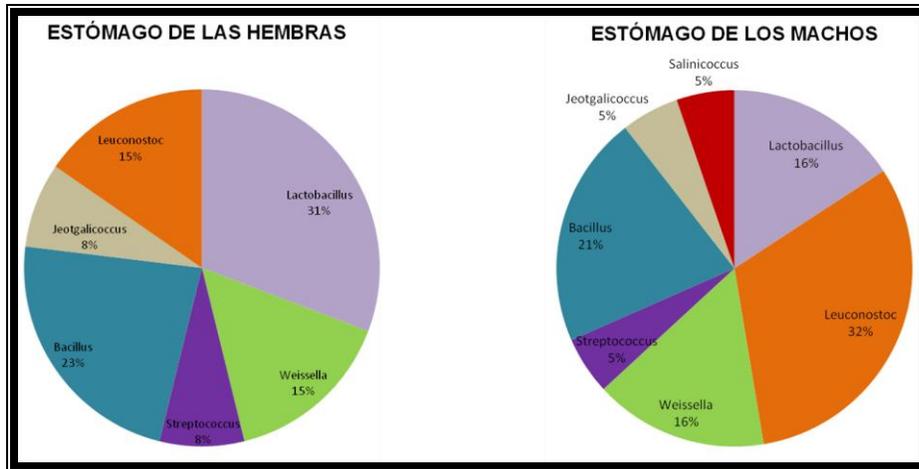


Figura 54. Géneros de BAL en el estómago de camarones hembras y machos *L. vannamei* adultos.

En la figura 54 se observa la diversidad de géneros presentes en el estómago de machos y hembras de camarones adultos, se encontró que en el estómago de los machos existe mayor diversidad de géneros que en el de las hembras, en el estómago de las hembras el género *Lactobacillus* fue el más abundante y en el estómago de los machos *Leuconostoc* fue el género abundante, el género *Salinicoccus* se encuentran en el estómago de los machos y no en el de las hembras. En camarones adultos el género *Jeotgalicoccus* se encuentra únicamente en el estómago de hembras y machos.

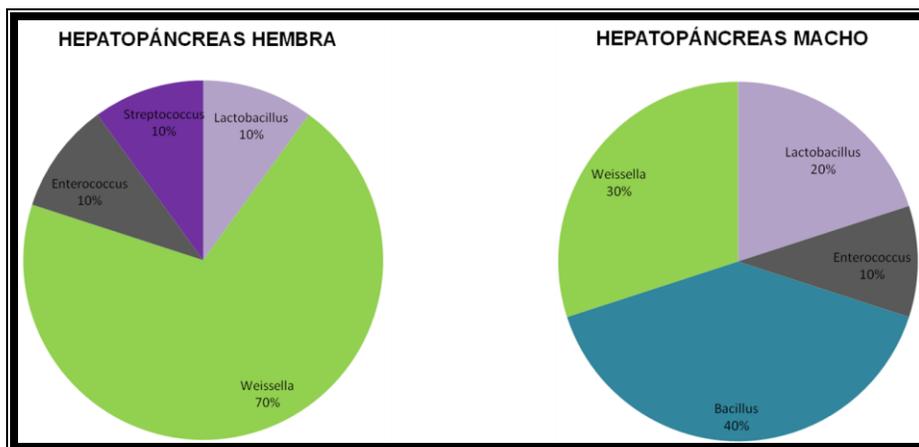


Figura 55. Géneros de BAL en el hepatopáncreas de camarones hembras y machos *L. vannamei* adultos.

En la figura 55 se enlistan la diversidad de géneros presentes en el hepatopáncreas de camarones adultos hembras y machos, ambos sexos presentan el mismo número de géneros aunque diferentes entre sí, el género *Weissella* es el más abundante en el hepatopáncreas de hembras, y *Bacillus* es el mas abundante en el hepatopáncreas de los machos, *Streptococcus* solo se encontró en el hepatopáncreas de los machos. En camarones adultos el género *Enterococcus* se encuentra únicamente en el hepatopáncreas de hembras y machos.

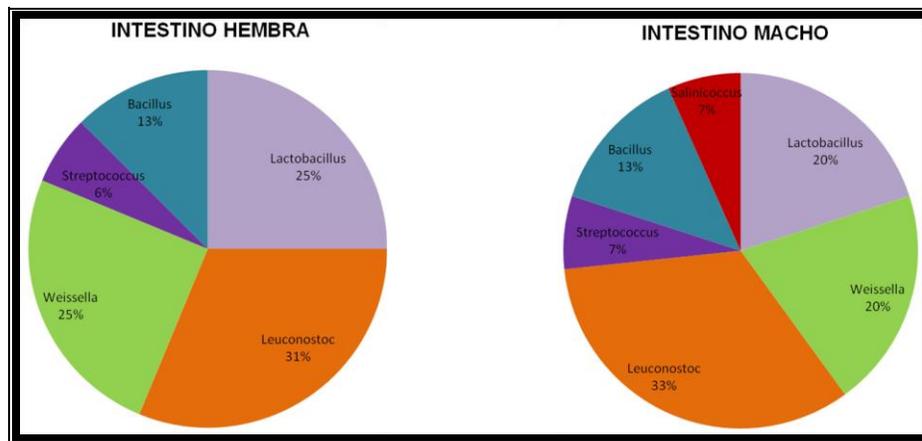


Figura 56. Géneros de BAL en el intestino de camarones hembras y machos *L. vannamei* adultos.

En la figura 56 se presentan los géneros de bacterias ácido lácticas del intestino de hembras y machos de camarón, el intestino de los machos presentó mayor diversidad de géneros en comparación con el intestino de las hembras, el género *Leuconostoc* es el mas abundante en el intestino de hembras y machos, *Salinicoccus* se encuentra únicamente en los machos. Los género *Lactobacillus* y *Weissella* tiene la misma proporción en hembras y en machos.

La microbiota pertenecientes a las bacterias ácido lácticas de hembras y machos de camarones adultos es distinta en el estómago, hepatopáncreas, e intestino. El género *Bacillus* se encuentra presente en los camarones adultos y en

los camarones juveniles no se encuentra, esto se puede deber a que los camarones adultos (hembras y machos) permanecieron en el estanque de cultivo, como mencionan Wang *et al.*, (2004) que arriba del 50% bacterias presentes en los sedimentos de los estanques de cultivo de camarón pertenecen al género *Bacillus* e indica que este género es importante en el microambiente de la acuicultura, al encontrarse en el agua y en el sedimento de los estanques de cultivo de camarón permiten que se entren al tracto digestivo, cosa que no sucede en los camarones juveniles ya que se encontraban en acuarios de agua clara y que fueron limpiados impidiendo que se formen sedimentos.

Diferentes especies pertenecientes a este género se han utilizado en acuicultura como probióticos, entre las especies se encuentran: *Bacillus licheniformis* inhiben a *Vibrio* por exclusión competitiva e incrementan la inmunidad en *L. vannamei* (Li *et al.*, 2007); Balcazar y Rojas (2007) adiciono *Bacillus subtilis* a la dieta y sus los resultados que obtuvo fueron que produce actividad antimicrobiana contra *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* en juveniles de *L. vannamei*, son importantes en el crecimiento (Ziaei *et al.*, 2006; Wang, 2007). Moriarty (1998 y 1997) menciona que al adicionar *Bacillus* a camarones peneidos secretan muchas exoenzimas, incrementan la actividad específica de las enzimas: lipasas, amilasas y proteasas (Saeed *et al.*, 2006), aumenta el crecimiento, supervivencia y la inmunidad (Rengpipat *et al.*, 1998, 2000).

En camarones juveniles se encuentra el género *Paenibacillus* en todas las condiciones, el cual secreta antibióticos, compuestos antifúngicos pudiendo estar regulando las poblaciones de organismos patógenos, en el caso de camarones adultos el género *Bacillus* se encuentra en camarones hembras y machos en todos los órganos, este género produce compuestos antimicrobianos y aumentan la inmunidad, por lo que estos géneros son específicos para los respectivos estadios de desarrollo mencionados. *Lactobacillus* y *Weissella* se encontraron en todas las condiciones y en todos los órganos de camarones juveniles y adultos lo

que nos hace suponer que estos géneros no tienen preferencia por los estadios de desarrollo del camarón blanco.

La presencia de una amplia diversidad de BAL en el tracto digestivo de camarones adultos hembras y machos puede ser un indicador de la salud de los organismos ya que como se ha mencionado actúan contra patógenos ya sea por exclusión competitiva, competencia por nutrientes, producción de bacteriocinas, antibióticos, y actúan regulando la población de bacterias patógenas específicamente las del género *Vibrio*.

Los cebadores empleados en el presente estudio han sido utilizados con éxito por Rojas *et al.*, (2008) en sedimentos, Escalante (2010) en sedimentos y efluentes de sistemas de explotación ganadera, la técnica utilizada fue la DGGE.

Como resultado de esta investigación se obtuvo una alta diversidad de bacterias del género *Vibrio* en el tracto digestivo de camarones juveniles y adultos pero la población de bacterias ácido lácticas supera con creces a la de *Vibrios* en juveniles y adultos de camarón blanco en todos los órganos y condiciones. *Vibrio* es parte de la microbiota natural en los camarones y se convierten en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa natural están suprimidos o se encuentran en estrés fisiológico por lo que la hipótesis de la naturaleza oportunista de *Vibrio* ha sido ampliamente aceptada (Brock y Lightner, 1990; Hameed, 1993; Lightner, 1993; Ruangpan y Kitao, 1991; Sinderman, 1990). Cuando existe una patogenicidad ocasionada por *Vibrio* se recurre a antibióticos sin embargo un uso indiscriminado de estos ha ocasionado la resistencia de *Vibrio* (Cabello, 2006), entre las propuestas para el control de *Vibrios* en los estanques de cultivo se encuentran el uso de probióticos, bacterias ácido lácticas generalmente (Ringo y Gatesoupe, 1998; Hagi *et al.*, 2004) o la interrupción del “quórum sensing” es el medio por el cual las bacterias se comunican célula-célula por pequeñas moléculas señal (Defoirdt *et al.*, 2004).

El quorum sensing es un mecanismo de regulación de genes por medio del cual la bacteria coordina la expresión de ciertos genes en respuesta a la presencia o ausencia de pequeñas moléculas señal (Defoirdt *et al.*, 2004 y 2008), La virulencia de las especies de *Vibrio* es activada por el quorum sensing (Milton, 2006; Defoirdt *et al.*, 2008). Entre los numerosos modos de acción de los probióticos se encuentran: i) producción de componentes inhibidores, ii) competición por nutrientes y por sitios de adherencia incremento de la respuesta inmune, iii) producción de nutrientes esenciales como vitaminas y ácidos grasos además de la contribución enzimática en la digestión; tomando en consideración las ventajas de los probióticos específicamente las BAL otro modo de acción de estas bacterias sería inhibición específica de la expresión de los genes de virulencia en la comunicación célula – célula, esto se ha demostrado con la bacteria *Lactobacillus acidophilus* empleada como probiótico la cual puede afectar la expresión de genes relacionados a la virulencia en *Escherichia coli* ya que secreta una molécula que actúa como inhibidor del quórum sensing (Medellin *et al.*, 2007). Con todo lo planteado la alta diversidad de BAL observada en este estudio estaría inhibiendo la expresión de los genes de virulencia de *Vibrio* secretando sustancias que impiden la comunicación vía quórum sensing, lo que quedaría sentado para futuros trabajos de investigación.

Muchas interacciones positivas entre microorganismo e invertebrados acuáticos han sido reportadas, entre estas interacciones se encuentra la de depredador-presa, donde los invertebrados utilizan la microbiota directamente como un recurso alimenticio (Carman *et al.*, 1989; Carman y Thistle, 1985; Harris, 1993; Langdon y Newell, 1990), es lo que estaría originando el ayuno prolongado de 8 días en el hepatopáncreas (*Vibrio*) e intestino (BAL), figura 57. Otra de las razones que explicaría la presencia de una mayor cantidad de OTU's en el ayuno es que al estar alimentados una gran cantidad de microorganismos y alimento entran al tracto digestivo del camarón, un porcentaje de las bacterias que entran son lisadas y aportan enzimas al organismo para poder digerir el alimento, y otra parte de estas bacterias son transitorias no son lisadas, siguen el mismo recorrido

de los alimentos y son expulsadas al exterior por las heces fecales (Harris, 1993), motivo por el cual es imposible observar las bacterias autóctonas del camarón, de igual manera explicaría que en el intestino de camarones se observa más OTU's al ser alimentado que cuando permanecen en ayuno, siendo el intestino un órgano de paso.

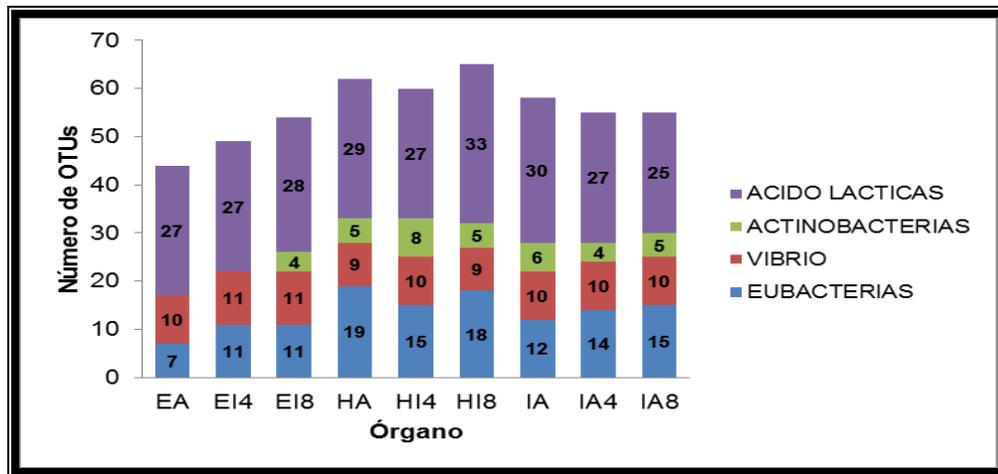


Figura 57. Riqueza de OTU's en el tracto digestivo de camarones juveniles *L. vannamei* alimentados y en ayuno. Dónde: **EA:** Estómago alimentado; **EA4:** Estómago en ayuno 4 días; **EA8:** Estómago en ayuno 8 días; **HA:** Hepatopáncreas alimentado; **HA4:** Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8:** Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA:** Intestino alimentado; **IA4:** Intestino en ayuno 4 días; **IA8:** Intestino en ayuno 8.

En las BAL y *Vibrio* se han realizado diversos trabajos en los que se evalúan la capacidad de adherencia al mucus intestinal del hospedero (Ringo y Gatesoupe, 1998; Villamil *et al.*, 2003; Rinkinen *et al.*, 2003), los resultados obtenidos son que las bacterias pertenecientes a estos grupos de bacterias tienen mucha capacidad de adherencia sin importar el hospedero, los resultados en el presente trabajo nos indican que la microbiota del tracto digestivo del camarón al permanecer en ayuno observamos las bacterias autóctonas o residentes del camarón por su gran capacidad de adherencia, y al ser alimentados no se observan una gran diversidad de OTU's.

En el estómago y hepatopáncreas de camarones juveniles a los 8 días se observó un mayor número de OTU's comparándolos con los alimentados y en ayuno 4 días, en el intestino de camarones alimentados se obtuvo un mayor número de OTU's en comparación con el ayuno.

En los camarones adultos, el hepatopáncreas e intestino de hembras y machos presenta idéntica composición de su microbiota por *Vibrio* y Actinobacterias, mientras que en Eubacterias y BAL existen cambios debidos al sexo. En el estómago e intestino de camarones machos existe mayor diversidad de OTU's en comparación con el de las hembras para todos los grupos estudiados (figura 58), en el hepatopáncreas el de las hembras presenta mayor diversidad de OTU's. No existe ninguna referencia en la que se estudie la diferencia de la microbiota del tracto digestivo entre machos y hembras, el presente estudio pone en evidencia que las microbiotas de camarones adultos machos y hembras son distintas.

En las figuras 57 se aprecian la composición de OTU's con todos los cebadores utilizados en el presente trabajo en cada órgano y condición, en camarones juveniles *L. vannamei* se observa mayor diversidad de OTU's en el hepatopáncreas alimentado y en ayuno a los 4 y 8 días en comparación con los otros órganos, y en el estómago fue en donde se observó menor diversidad de OTU's en las 3 condiciones, en el hepatopáncreas del camarón se lleva a cabo la síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de nutrientes, almacenamiento de minerales y otras sustancias orgánicas como lípidos y carbohidratos así como también la distribución de las reservas durante la fase de intermuda (Dall *et al.*, 1990; Ceccaldi, 1998), en este caso de estudios el haber encontrado un mayor número de OTU's en el hepatopáncreas nos podría indicar que están aportando enzimas para la digestión y absorción de nutrientes como señala Harris (1993), el intestino es el lugar de compactación y transporte de las heces (Dall y Moriarty, 1983; Dall *et al.*, 1990) por lo existe un gran número de bacterias, el estómago cumple dos funciones, reducir el alimento digerido a una masa o pasta y seleccionar las partículas más pequeñas para facilitar su ingreso a

la glándula digestiva, tanto el estómago como el intestino son órganos de paso, motivo por el cual se encontrarían menor número de OTU's.

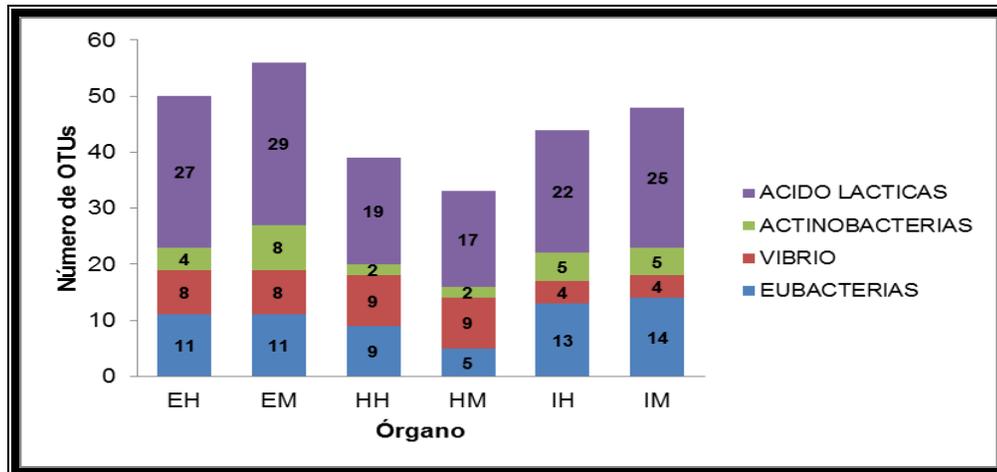


Figura 58. Riqueza de OTU's en el tracto digestivo de camarones machos y hembras *L. vannamei* adultos. Dónde: **EA**: Estómago alimentado; **EA4**: Estómago en ayuno 4 días; **EA8**: Estómago en ayuno 8 días; **HA**: Hepatopáncreas alimentado; **HA4**: Hepatopáncreas en ayuno 4 días; **HA8**: Hepatopáncreas en ayuno 8 días; **IA**: Intestino alimentado; **IA4**: Intestino en ayuno 4 días; **IA8**: Intestino en ayuno 8.

En la figura 58 se aprecia la riqueza de OTU's de camarones *L. vannamei* adultos machos y hembras, los cuales fueron tomados directamente del estanque, se encontró que existen diferencias debidas al sexo, y el estómago tanto de machos como de hembras es el que presenta mayor diversidad de OTU's, la menor diversidad de OTU's se encontró en el hepatopáncreas en ambos sexos, esto se podría deberse a que fueron alimentados y no se les sometió al ayuno, o que conforme con la edad adquieren otros hábitos alimenticios y la actividad enzimática del hepatopáncreas disminuye motivo por el cual no existe un amplio número de bacterias en este órgano en camarones adultos.

Las perspectiva con los resultados del presente trabajo es que para los que se dedican a realizar trabajos de actividad enzimática en el hepatopáncreas de camarón tengan que considerar el posible aporte que brinda la microbiota a la

actividad de este órgano. Así mismo con este trabajo se sientan las bases para futuros trabajos que tengan el objetivo de conocer la microbiota autóctona del tracto digestivo de diferentes organismos, en los que el ayuno sería una prioridad para poder evaluarla.

VII. CONCLUSIONES.

El uso de la técnica de DGGE para el estudio de comunidades microbianas en órganos del sistema digestivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* ha sido sensible y exitosa aportando información original.

Con una técnica independiente del cultivo se pudo evaluar la riqueza y diversidad de bacterias en el tracto digestivo del camarón blanco *L. vannamei*.

Existen cambios en la composición de la microbiota del tracto digestivo de camarones *L. vannamei* juveniles cuando son sometidos al ayuno, en el estómago y hepatopáncreas de camarones en ayuno 8 días se observa un mayor número de OTU's, en el intestino al ser alimentado se observan más diversidad de OTU's.

La microbiota del tracto digestivo de camarones *L. vannamei* adultos hembras y machos en BAL y Eubacterias es distinta en los tres órganos, en el hepatopáncreas e intestino de hembras y machos para *Vibrio* y Actinobacterias se observa el mismo número de OTU's y en la misma posición.

V. azureus, es aislada por vez primera del tracto digestivo de organismos acuáticos.

El género *Paenibacillus* se encuentra en camarones juveniles y no en adultos. El género *Bacillus* se encontró en los camarones adultos y en juveniles no. Los géneros *Weissella* y *Lactobacillus* se encontraron en juveniles (alimentados y en ayuno) y adultos (hembras y machos) de *L. vannamei* en el estómago, hepatopáncreas e intestino.

VIII. REFERENCIAS.

- Ajitha, S., Sridhar, M., Sridhar, N., Singh, I.S.B., and Varghese, V. 2004. Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus* (Fenneropenaeus) *Indicus* (H.Milne Edwards). *Asian Fisheries Science*, 17: 71-80.
- Alfonso, E., Beltrame, E., Andreatta, E. R., Lemos, A., Quaresma, J. 1996. Uso de Bacterias Beneficiosas en la Larvicultura del Camarón *Penaeus schmitti*. *Investigaciones Marinas*, 17 (2-3): 209-214.
- Al-Harbi, A, and Uddin, N. 2005. Bacterial Diversity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250: 566-572.
- Álvarez, J.D., Austin, B., Álvarez, A.M., and Reyes, H. 1998. *Vibrio harveyi*: a Pathogen of Penaeid Shrimps and Fish in Venezuela. *J. Fish Dis*, 21: 313–316.
- Ash, C., Priest, F.G., and Collins, D. 1993. Molecular Identification of rRNA Group 3 Bacilli (Ash, Farrow, Walbanks and Collins) Using a PCR Probe Test. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 46: 270-279.
- Aslam, Z., Lim, J.H., Im, W.T., Yasir, M., Chung, Y.R., and Lee, S.T. 2007. *Salinicoccus jeotgali* sp. Nov., Isolated from Jeotgal, a Traditional Korean Fermented Seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 633-638.
- Atlas, R.M., y Bartha, R. 2001. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ª Edición, Pearson Addison Wesley. Madrid, España, 677 pp.
- Austin, B., and Austin, D.A. 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, 3rd ed. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, 575 pp.
- Austin, B., Pride, A.C., and Rhodie, G.A. 2003. Association of a Bacteriophage with Virulence in *Vibrio harveyi*. *J. Fish Dis*, 26:55–58.
- Axellsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Phisiology. In: Salmine, S., and Von Wright, A. (ed.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y. 617 pp.
- Baev, P.V. and Penev, L.D. 1995. BIODIV: Program for Calculating Biological Diversity Parameters, Similarity, Niche Overlap, and Cluster Analysis. Versión 5.1. Pensoft, Sofia-Moscow, 57 pp.

- Baffone, W., Vittoria, E., Campana, R., Citterio, B., Casaroli, A., and Pierfelici, L. 2005. Occurrence and Expression of Virulence-Related Properties by Environmental Halophilic *Vibrio* spp. in *in vitro* and *in vivo* Systems. *Food Control*, 451–45.
- Baines, S. 1956. The Role of the Symbiotic Bacteria in the Nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol*, 33: 533–541.
- Balcázar, J.L., and Rojas, L. 2007. Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol.*, 55 (5): 409-12.
- Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A., Girones, O., and Muzquiz, J.L. 2007a. Changes in Intestinal Microbiota and Humoral Immune Response Following Probiotic Administration in Brown Trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97: 522-527.
- Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O., and Muzquiz, J.L. 2007b. Enhancement of the Immune Response and Protection Induced by Probiotic LAB Against Furunculosis in Rainbow Trout. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 51: 85-193.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., and Cunningham, D.P. 2007c. Effect of the Addition of Four Potential Probiotic Strains on the Survival of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Following Immersion Challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Invertebr. Pathol*, 96(2): 147-50.
- Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., and Borrego, J.J. 2001. Hydrophobicity and Adhesion to Fish Cells and Mucus of *Vibrio* Strains Isolated from Infected Fish. *Int. Microbiol*, 4: 21-26.
- Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Faris, A., Krovaceck, K., Mansson, I., and Borrego, J.J. 1995. Influence of Salinity and pH on the Adhesion of Pathogenic *Vibrio* Strains to *Sparus aurata* Skin Mucus. *Aquaculture*, 132: 113-120.
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M, Kuhn, I., Mollby, R., Bruscolini, F., and Donelli, G. 1999. Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters Along the Italian Adriatic Coast. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 2748–2753.
- Befring, M., Tore, B., Fontanillas, R., and Rosnes, J. 2007. Molecular Characterisation of the Intestinal Microbiota of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272: 581-588.

- Ben-Haim, Y., and Rosenberg, E. 2002. A novel *Vibrio* sp. Pathogen of Coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Biol*, 141: 47-55.
- Benson, D.R., and Silvester, W.B. 1993. Biology of *Frankia* Strains, Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. *Microbiol Rev*, 57: 293–319.
- Benyakir, D. 1987. Growth Retardation of *Rhodnius prolixus* Symbionts by Immunizing Host Against *Nocardia (Rhodococcus) rhodnii*. *J. Insect Physiol*, 33: 379–383.
- Bhadra, B., Raghukumar, C., Pindi, P.K., and Shivaji, S. 2008. *Brevibacterium oceani* sp. nov., Isolated from Deep-Sea Sediment of the Chagos Trench, Indian Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 57-60.
- Bjorkroth, K., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W., Korkeala, H., and Vandamme, P. 2002. Taxonomic Study of *Weissella confusa* and Description of *Weissella cibaria* sp. nov., Detected in Food and Clinical Samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 141–148.
- Bonand-Reantaso, M., Subasinghe, R., Arthur, J., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, T., and Sharif, M. 2005. Disease and Health Management in Asian Aquaculture Veterinary Parasitology, 132: 249-272.
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Zorrilla, I., Borrego, J.J., and Moriñigo, M.A. 1996. Kinetics of Adhesion of Selected Fish-Pathogenic *Vibrio* Strains to Skin Mucus of Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10): 3650-3654.
- Breed, R.S. 1953. The Families Developed from Bacteriaceae Cohn with a Description of the Family Brevibacteriaceae. *Riass Commun VI Congr Int Microbiol Roma*, 1: 10–15.
- Brock, J.A. and Lightner, D.V. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea. In: O. Kinne (ed.) *Diseases of Marine Animals*, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 3: 245-424.
- Buford, M., Thompson, P., McIntosh, R., Barman R., and Pearson, D. 2003. Nutrient and Microbial Dynamics in High-Intensity, Zero-Exchange Shrimp Ponds in Belize. *Aquaculture*, 219: 393-411.
- Bull, A.T., and Stach, J.E.M. 2007. Marine Actinobacteria: New Opportunities for Natural Product Search and Discovery. *Trends in Microbiology*, 15(11): 491-499.
- Cabello, F.C. 2006. Heavy Use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture: a Growing Problem for Human and Animal Health and for the Environment. *Environ. Microbiol*, 8: 1137–1144.

- Cahill, M.M. 1990. Bacterial Flora of Fishes: A Review. *Microbial Ecology*, 19: 21-41.
- Cárdenas, L.P., Sastoque, A.M., and Peña, M.R. 2003. Métodos Moleculares en Muestras Ambientales: una Alternativa para Establecer la Relación entre la Estructura de la Comunidad Microbiana y la Operación del Sistema. Memorias del Congreso Internacional Agua, Seminario sobre Métodos Naturales para el Tratamiento de Aguas Residuales.
- Carman, K.R., and Thistle, D. 1985. Microbial Food Partitioning by Three Species of Benthic Copepods. *Mar Biol*, 88:143-148.
- Carman, K.R., Dobbs, F.C., and Guckert, J.B. 1989. Comparison of Three Techniques for Administering Radiolabeled Substrates to Sediments for Trophic Studies: Uptake of Label by Harpacticoid Copepods. *Mar Biol*, 102:119-125.
- Ceccaldi, H.J. 1998. A Synopsis of Morphology and Physiology of Digestive System of Some Crustacean Species Studied in France. *Reviews in Fisheries Science*, 6: 13-39.
- Cedeño, R. 2005a. Caracterización de Comunidades Bacterianas en Sistemas de Engorde de Camarón Mediante Electroforesis en geles de Gradiente Desnaturante (DGGE). CENAIM: Boletín informativo No. 133.
- Cedeño, R. 2005b. El Uso del DGGE como Herramienta Molecular Para el Estudio y Caracterización Bacteriana. CENAIM: Boletín Informativo No. 128.
- Chen, Q., Yan, Q., Wang, K., Zhuang, Z., and Wang, X. 2008. Portal of Entry for Pathogenic *Vibrio alginolyticus* Into Large Yellow Croaker *Pseudosciaena crocea*, and Characteristics of Bacterial Adhesion to Mucus Diseases of Aquatic Organisms, 80: 181-188.
- Chen, S.N., Huang, S.L., and Kou, G.H., 1992. Studies on the Epizootics and Pathogenicity of Bacterial Infections in Cultured Giant Tiger prawns, *Penaeus monodon* in Taiwan. In: Fulks, W., Main, K.L. _Eds., Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, HI, pp. 195–205.
- Chen, Y., Yanagida, F., and Shinohara, T. 2005. Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria from Soil Using an Enrichment Procedure. *Lett App Microbiol*, 40: 195–200.
- Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M. and Cheng, W. 2007. Immune Responses and Gene Expression in White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish. Shellfish. Immunol*, 23(2): 364-77.

- Choi, J.H., Im, W.T., Yoo, J.S., Lee, S.M., Moon, D.S., Kim, H.J., Rhee, S.K., and Roh, D.H. 2008. *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a Xylan-Degrading and Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from East Sea Sediment. *J. Microbiol. Biotechnol*, 18: 189-193.
- Cintas, L.M., Casaus, P. y Hernández, P.E. 2000 Bacterias Lácticas de Origen Alimentario: Consideraciones Taxonómicas y Filogenéticos, *Alimentaria*, 38: 61-70.
- Coenye, T., and Vandamme, P. 2003. Intragenomic Heterogeneity Between Multiple 16S Ribosomal RNA Operons in Sequenced Bacterial Genomes. *FEMS Microbiol. Lett*, 228:45–49.
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., and Wallbanks, S. 1993. Taxonomic Studies on Some *Leuconostoc*-Like Organisms from Fermented Sausages: Description of a New Genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* Group of Species. *J Appl Bacteriol*, 75: 595-603.
- Crump, B.C., Armbrust, E.V., and Baross, J.A. 1999. Phylogenetic Analysis of Particle-Attached and Free-Living Bacterial Communities in the Columbia River, its Estuary, and the Adjacent Coastal Ocean. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 3192–3204.
- Daane, L.L., Harjono, I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleroni, N.J., and Haggblom, M.M. 2002. PAH-Degradation by *Paenibacillus* spp. And Description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a Naphthalene Degrading Bacterium from the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52: 131-139.
- Dall, W., and Moriarty, D.J. 1983. Functional Aspects of Nutrition and Digestion In: *The Biology of Crustacea, Internal Anatomy and Physiological Regulation*, Mantel, L.H (Eds). Academic Press, New York, 5: 215-261.
- Dall, W., Hill, P., Rothlisberg, C., and Staples, D. 1990. The Biology of the Penaeidae In: Blaxter, J., Southward, A (Eds). *Advances in Marine Biology*. Academic Press, London, 25: 489 pp.
- Das, K., Anis, M., Azemi, B.M.N., and Ismail, N. 1995. Fermentation and Recovery of Glutamic Acid from Palm Waste Hydrolysate by Ion-Exchange Resin Column. *Biotechnol. Bioeng*, 48: 551-555.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., and Verstraete, W. 2004. Disruption of Bacterial Quorum Sensing: an Unexplored Strategy to Fight Infections in Aquaculture. *Aquaculture*, 240: 69–88.

- Defoirdt, T., Verstraete, W., and Bossier, P. 2008. Luminescence, Virulence, and Quorum Sensing Signal Production by Pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* Isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1480-1487.
- Dellaglio, F., and Torriani, S. 1986. DNA-DNA Homology, Physiological Characteristics and Distribution of Lactic Acid Bacteria from Maize Silage. *J Appl Bacteriol*, 60: 83-93.
- Dellaglio, F., Vescovo, M., Morelli, L., and Torriani, S. 1984. Lactic Acid Bacteria in Ensiled High-Moisture Corn Grain: Physiological and Genetic Characterization. *Syst Appl Microbiol*, 5: 534-544.
- Denner, E., Vybiral, D., Fischer, U., Velimirov, B., and Busse, H. 2002. *Vibrio calviensis* sp. nov., a Halophilic, Facultatively Oligotrophic 0.2 Micron-Filterable Marine Bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52:549–553.
- Dieter, A., Hamm, A., Fiedler, H.P., Goodfellow, M., Müller, W.E.G., Brun, R., *et al.* 2003. Pyrocoll, an Antibiotic, Antiparasitic and Antitumor Compound Produced by a Novel Alkalophilic *Streptomyces* Strain. *J Antibiotics*, 56(7): 639-646.
- Dorsch, M., Lane, D., and Stackebrandt, E. 1992. Toward a Phylogeny of the Genus *Vibrio* Based on 16S rRNA Sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 42: 58–63.
- Durand, L., Zbinden, M., Cueff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M.A. 2010. Microbial Diversity Associated with the Hydrothermal Shrimp *Rimicaris exoculata* Gut and Occurrence of a Resident Microbial Community. *FEMS Microbiology Ecology*, 71: 291 – 303.
- Durvasula, R.V., Sundaram, R.K., Kirsch, P., Hurwitz, I., Crawford, C.V., Dotson, E., and Beard, C.B. 2008. Genetic Transformation of a Corynebacterial Symbiont from the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol*, 119: 94–98.
- Eiler, A., and Bertilsson, S. 2006. Detection and Quantification of *Vibrio* Populations Using Denaturant Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 339-348.
- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., and Top, E. M. 1999. Effect of Phenylurea Herbicides on Soil Microbial Communities Estimated by Analysis of 16S rRNA Gene Fingerprints and Community-Level Physiological Profiles. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 982-988.
- Escalante, K.S. 2010. Diversidad Genética de Bacterias Ácido Lácticas en Sedimentos y Efluentes de Sistemas de Explotación Ganadera. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, 90 pp.

- Escobar, L., Olvera, M.A., and Puerto, C. 2006. Avances Sobre la Ecología Microbiana del Tracto Digestivo de la Tilapia y Sus Potenciales Implicaciones En: Editores: Elizabeth Cruz Suarez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G Nieto López, David Villareal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 de Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- FAO. 2008. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (FAO) Roma, Italia, 196 pp.
- Ferrer, M. 2004. Metagenoma: Acceso a los Recursos Potencialmente Ilimitados de Microorganismos no Cultivables. Actualidad SEM, 38: 11-17.
- Finster, K.W., Herbert, R.A., Kjeldsen, K.U., Schumann, P., and Lomstein, B.A. 2009. *Demequina lutea* sp. nov., Isolated from High Artic Permafrost Soil. Int J Syst Evol Microbiol, 59: 649-653.
- Fortman, J.L., Magarvey, N.A., and Sherman, D.H. 2005. Something Old, Something New: Ongoing Studies of Marine Actinomycetes. Speaker. Society for Industrial Microbiology Annual Meeting. Chicago, IL.
- Franca, L., Rainey, F.A., Nobre, M.F., and da Costa, M.S. 2006. *Salinicoccus salsiraiæ* sp. Nov.: A New Moderately Halophilic Gram-Positive Bacterium Isolated from Salted Skate. Extremophiles, 10: 531-536.
- Fredrickson, A.G., and Stephanopoulos, G. 1981. Microbial Competition. Science, 213: 365-378.
- Frelief, P.F., Sis, R.F., Bell, T.A., and Lewis, D.H. 1992. Microscopic and Ultrastructural Studies of Necrotizing Hepatopancreatitis in Texas Cultured Shrimp (*Penaeus vannamei*). Vet. Pathol, 29: 269-277.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in Man and Animal. J. Appl. Bacteriol, 66: 365-378.
- Gatesoupe, F.J. 2000. Uso de probióticos en Acuicultura. pp 463-472 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D., y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Global Outlook for Aquaculture Advocate Leadership (GOAL). 2008. Qingdao, China.

- Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., and Amann, R. 2000. Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of *Actinobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:5053–5065.
- Gomez B., Tron, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V., and Guerra, A. 1998. Species of *Vibrio* Isolated from Hepatopancreas, Haemolymph and Digestive Tract of a Population of Healthy Juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 163: 1-9.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., and Turnbull, J.F. 2000. The Use and Selection of Probiotic Bacteria for Use in the Culture of Larval Aquatic Organisms. *Aquaculture*, 191: 259– 270.
- Goodfellow, M., and Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37:189–216.
- Gunzl, H. 1991. The Ultrastructure of the Posterior Gut and Caecum in *Alona affinis* (Crustacea, Cladocera). *Zoomorphology*, 110: 139-144.
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., Hoshino, T., 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 234: 335–346.
- Hameed, A.S.S. 1993. A Study of the Aerobic Heterotrophic Bacterial Flora of Hatchery-Reared Eggs, Larvae and Postlarvae of *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 117:195-204.
- Hammes, W.P., and Vogel, R.F. 1995. The Genus *Lactobacillus*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (ed.), *The Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom. pp. 19–54.
- Handelsman, J., Liles M., Mann D., Riesenfeld C., and Goodman R.M. 2002. Cloning the Metagenome: Culture Independent Access to the Diversity and Functions of the Uncultivable Microbial World. In: *Methods in Microbiology*, vol. 33. *Functional Genomics*. Wren, B. and N. Dorrel, (eds). Academic Press. Amsterdam, The Netherlands. pp: 241-255.
- Harington, J.S. 1960. Synthesis of Thiamine and Folic Acid by *Nocardia rhodnii*, the Micro-Symbiont of *Rhodnius prolixus*. *Nature*, 188: 1027–1028.
- Harris, J.M. 1993. The Presence, Nature, and Role of Gut Microflora in Aquatic Invertebrates: A Synthesis. *Microb Ecol.*, 25: 195-231.

- Heidelberg, J.F., Heidelberg, K. B., and Colwell, R. R. 2002. Seasonality of Chesapeake Bay Bacterioplankton Species. *Appl. Environ. Microbiol*, 68:5488–5497.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food and Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365S–373S.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol*, 41(2): 85-101.
- Hovda, M.B., Fontanillas, R., McGurk, C., Obach, A., and Rosnes, J.T. Seasonal Variations in the Intestinal Microbiota of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res. In press*.
- Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Fontanillas, R., and Rosnes, J.T. 2007. Molecular Characterisation of the Intestinal Microbiota of Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272: 581-588.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., and Salminen, S. 2001. Probiotics: Effects on Immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (suppl) 444S-450S.
- Ivanova, E.P., Christen, R., Alexeeva, Y.V., Zhukova, N.V., Gorshkova, N.M., Lysenko, A.M., Mikhailov, V.V., and Nicolau, D.V. 2004. *Brevibacterium celere* sp. nov., Isolated from Degraded Thallus of a Brown Alga. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 2107–2111.
- Jayabalan, N., Chandran, R., Sivakumar, V., and Ramamoorthi, K. 1982. Occurrence of Luminescent Bacteria in Sediment. *Curr Sci*, 51: 710–711.
- Keller, M., and Zengler, K. 2004. Tapping into Microbial Diversity. *Nature Reviews*, 2: 141-150.
- Klaenhammer, T.R and Kullen, M.J. 1999. Selection and Design of Probiotic. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 45 – 47.
- Kurtböke D.I., and French J.R. 2007. Use of Phage Battery to Investigate the Actinoflora Layers of Termite Gut Microflora. *J. Appl. Microbiol*, 103: 722–734.
- Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2006. Marinomycins A-D, Antitumor-Antibiotics of a New Structure Class from a Marine Actinomycete of the Recently Discovered Genus “*Marinospora*”. *J. Am. Chem. Soc*, 128: 1622–1632.
- Lande, R. 1996. Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity Among Multiple Communities. *Oikos*, 76: 5-13.

- Langdon, C.L., Newell, R.I.E. 1990. Utilization of Detritus and Bacteria as Food Sources by Two Bivalve Suspension-Feeders, the Oyster *Crassostrea virginica* and the Mussel *Geukensia demissa*. *Mar Ecol Prog Ser*, 58:299-310.
- Lavilla, C.R., Albright, L.J., Paner, M.G., and Sunaz, N.A. 1992. Studies on the Sources of Luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., and Authur, J.R. (eds.) *Diseases in Asian Aquaculture 1*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 157-164.
- Lavilla, C.R., and de la Pena, L.D. 1998. Mortalities of Pond Cultured Juvenile Shrimp, *Penaeus monodon*, Associated with Dominance of Luminescent *Vibrios* in the Rearing Environment. *Aquaculture*, 164: 337–349.
- Lavilla, C.R., Baticados, C.L., Cruz-Lacierda, E.R., and de la Pena, L. 1990. Occurrence of Luminous Bacteria Disease of *Penaeus monodon* Larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1-13.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., and Marinelli, F. 2000. Rare Potential Producers of New Antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78: 399-405.
- Lea Mayer, B.R., Walsh, M.A., Brock, J.A., and Fujioka, R.S. 1997. Cold stress-induced changes in the aerobic Heterotrophic Gastrointestinal Tract Bacteria Flora of Red Hybrid Tilapia. *Journal of Fish Biology*, 50(4): 770-780.
- Leano, E.M., Lavilla, C.R., and Paner, M.G. 1998. Bacterial Flora in the Hepatopancreas of Pond-Reared *Penaeus monodon* Juveniles with Luminous Vibriosis. *Aquaculture*, 164: 367–374.
- Lee, S.D. 2006. *Brevibacterium samyangense* sp. nov., An Actinomycete Isolated from a Beach Sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 1889–1892.
- Lee, S.D. 2008. *Brevibacterium marinum* sp. nov., Isolated from Seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 500-504.
- Lefebvre, T., Miambi, E., Pando, A., Diouf, M., and Lefevre, C. 2009. Gut-Specific Actinobacterial Community Structure and Diversity Associated with the Wood-Feeding Termite Species, *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) Described by Nested PCR-DGGE Analysis. *Insectes Sociaux*, 56: 269-276.
- Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., and Hong, H. 2007. Beneficial Effects of *Bacillus licheniformis* on the Intestinal Microflora and Immunity of the White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei*. *Biotechnol Lett*, 29: 525–530.
- Lightner, D.V. 1993. Disease of Culture Penaeid Shrimp. In: *Handbook of Mariculture Crustacean Aquaculture*, CRC Press, Boca Raton.

- Lightner, D.V. Diseases of Penaeid Shrimp. 1996. in McVey, J. P. (ed.), Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture, CRC Press, Boca Raton, pp: 393-486.
- Lin, B., Wang, Z., Malanoski, A.P., O'Grady, E.A., Wimpee, C.F., Vuddhakul, V., Alves, N., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B. and Vora, G.J. 2010. Comparative Genomic Analyses Identify the *Vibrio harveyi* Genome Sequenced Strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. Environmental Microbiology Reports, 2(1): 81–89.
- Lindgren, S.E., and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonist Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feet Fermentations. FEMS Microbiology Reviews, 87:149-164.
- Locci, R. 1994. Actinomycetes as Plant Pathogens. Eur J Plant Pathol, 100: 179–200.
- Macey, B.M., Achilihu, I.O., Burnett, K.G., and Burnett, L.E. 2008. Effects of Hypercapnic Hypoxia on Inactivation and Elimination of *Vibrio campbellii* in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. Applied and Environmental Microbiology, 74(19): 6077-6084.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M., and Sherman, D.H. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. Appl. Environ. Microbiol, 70: 7520–7529.
- Magurran, A.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp.
- Maldonado, L.A. Stach, J.E., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull A.T., and Goodfellow, M. 2005. The Diversity of Cultivable Actinobacterias in Geographically Widespread Marine Sediments. Antonie Van Leeuwenhoek, 87: 11–18.
- Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H., and Leroi, F. 2009. Selection and Evaluation of Seafood-Borne Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria as Inhibitors of Pathogenic and Spoilage Bacteria. Food Microbiol, 26: 638-644.
- Matsumoto, A., Nakai, K., Morisaki, K., Omura, S., and Takahashi, Y. 2010. *Demequina salsinemoris* sp. nov., Isolated on Agar Media Supplemented with Ascorbic Acid or Rutin. Int J Syst Evol Microbiol, 60: 1206-1209.
- McDougald, D., Rice, S., Weichart D., and Kjelleberg, S. 1998. Nonculturability: Adaptation or Debilitation. FEMS Microbiology Ecology. Ecol, 25: 1-9.

- McNeill, M.M., and Brown, J.M. 1994. The Medically Important Aerobic Actinomycetes Epidemiology and Microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 7: 357–417.
- McSpadden, B.B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In *Agricultural Systems. Phytopathology*, 94: 1252-1258.
- Medellin, J.M., Haifeng, W., Johnson, R., Anand, S., Griffiths, M.W. 2007. Probiotics Affect Virulence-Related Gene Expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13): 4259-4267.
- Menéndez, S., and Rodríguez, J.L. 2000. *Leuconostocs* en Queserías. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 19(6): 67-72.
- Methé, B.A., Hiorns, W.D., and Zehr, J.P. 1998. Contrasts Between Marine and Freshwater Bacterial Community Composition-Analyses of Communities in Lake George and Six Other Adirondack Lakes. *Limnol. Oceanogr*, 43: 368–374.
- Milbourne, K. 1983. Thermal Tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. *Meat Sci*, 9: 113-119.
- Milton, D.L. 2006. Quorum Sensing in *Vibrios*: Complexity for Diversification. *Int J Med Microbiol*, 296: 61–71.
- Momose, H., and Takagi, T. 1978. Glutamic Acid Production in Biotin-Rich Media by Temperature-Sensitive Mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a Novel Fermentation Process. *Agric. Biol. Chem*, 42: 1911-1917.
- Moreno, C.E. 2001. Métodos para Medir la Biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84 pp.
- Moriarty, D. 1997. The Role of Microorganisms in Aquaculture Ponds. *Aquaculture*, 151: 333-349.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of Luminous *Vibrio* Species in Penaeid Aquaculture Ponds. *Aquaculture*, 164: 351–358.
- Moss, S., Divakaran, S., and Kim, G. 2001. Stimulating Effects of Pond Water on Digestive Enzyme Activity in the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 32: 125-131.
- Muyzer G, and Smalla, K. 1998. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. Mini review. *Antonie Van Leeuwenhoek Int JG*, 73:127–41.

- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., and Wawer, C. 1997. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology, p 1-27 In: Akkermans, A. D., van Elsas, J. D., and de Bruijn, F. J (Eds) Molecular Microbial Ecology Manual, vol. 3.4.4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Muyzer, G., de Waal E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction Amplified Genes Encoding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol, 59: 695–700.
- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S., and Maniatis, T. 1985. Nearly All Single Base Substitutions in DNA Fragments Joined to a GC Clamp Can be Detected by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Nucleic Acids Res, 13: 3131-3145.
- Nam, Y., Chang, H., Kim, K., Roh, S., Kim, M., Jung, M., Lee, S., Kim, J., Yoon, J., and Bae, J. 2008. Bacterial, Archaeal, and Eukaryal Diversity in the Intestines of Korean People. The Journal of Microbiology, 46: 491-501.
- Nikolausz, M., Sipos, R., Revesz, S., Szekely, A., and Marialigeti, K. 2005. Observation of Bias Associated with Re-Amplification of DNA Isolated from Denaturing Gradient Gels. FEMS Microbiol. Lett, 244: 385-390.
- Niven, C.F., and Evans, J.B. 1957. *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a Heterofermentative Species that Produces a Green Discolouration of Cured Meat Pigments. J Bacteriol, 73: 758-759.
- Nomoto, K. 2005. Prevention of Infections by Probiotics. Journal of Bioscience and Bioengineering, 100: 583-592.
- Oldfield, C., Wood, N.T., Gilbert, S.C., Murray, F.D., and Faure, F.R. 1998. Desulphurisation of Benzothiophene and Dibenzothiophene by Actinomycete Organisms Belonging to the Genus *Rhodococcus*, and Related Taxa. Antonie van Leeuwenhoek, 74: 119–132.
- Onraedt, A., Soetaert, W., and Vandamme, E. 2005. Industrial Importance of The Genus *Brevibacterium*. Biotechnology Letters, 27: 527-533.
- Ortigosa, M., Esteve, C., and Pujalte, M.J. 1989. *Vibrio* Species in Seawater and Mussels: Abundance and Numerical Taxonomy. Syst. Appl. Microbiol, 12:316–325.
- Ortigosa, M., Garay, E., and Pujalte, M. J. 1994. Numerical Taxonomy of *Vibrionaceae* Isolated from Oysters and Seawater Along an Annual Cycle. Syst. Appl. Microbiol, 17:216–225.

- Oxley, A.P.A., Shipton, W., Owens, L., and McKay, D. 2002. Bacterial Flora from the Gut of the Wild and Cultured Banana Prawn, *Panaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 214-223.
- Pal, D., and Gupta, C.D. 1992. Microbial Pollution in Water and its Effect on Fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4: 32-39.
- Palmer, L.M. and Colwell, R.R. 1991. Detection of Luciferase Gene Sequence in Nonluminescent *Vibrio cholerae* by Colony Hybridization and Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol*, 57: 1286–1293.
- Papathanasopoulos, M.A., Krier, F., Junelles, A.M.R., Lefebvre, G., Caer, J.P., Holy, A., and Hastings, J.W. 1997. Multiple Bacteriocin Production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and Other *Leuconostoc/Weissella* Strains. *Current Microbiology*, 35: 331-335.
- Park, D.S., Jeong, W.J., Lee, K.H., Oh, H.W., Kim, B.C., Bae, K.S., and Park, H.Y. 2009. *Paenibacillus Pectinilyticus* sp. Nov., Isolated from the Gut of *Diastromma apicalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59: 1342-1347.
- Pascual, C., Collins, M.D. 1999. *Brevibacterium avium* sp. nov., isolated from poultry. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 49: 1527-1530.
- Paulitz, T.C., and Belanger, R.R. 2001. Biological Control in Greenhouse Systems. *Annu. Rev. Phytopathol*, 39: 103-133.
- Paynter, J.L. 1989. Invertebrates in Aquaculture. Refresher Course for Veterinarians, Proceedings 117. The University of Queensland.
- Peczynska-Czoch, W., and Mordarski, M. 1988. Actinomycete enzymes. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordarski, M. (eds). London: Academic Press, pp: 219–283.
- Peet, R.K. 1974. The Measurement of Species Diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5: 285-307.
- Pizzutto, M., and Hirst, R.G. 1995. Classification of Isolates of *Vibrio harveyi* Virulent to *Penaeus monodon* Larvae by Protein Profile Analysis and M13 DNA Fingerprinting. *Dis. Aquat. Org*, 21: 61–68.
- Poly, F., Jocteur, L., and Bally, R. 2001. Improvement in the RFLP Procedure for Studying the Diversity of Nif Genes in Communities of Nitrogen Fixers in Soil. *Res. Microbiol*, 152: 196-103.
- Rehnstam, A.S., Backman, S., Smith, D., Azam, F., and Hagstrom, A. 1993. Blooms of Sequence-Specific Culturable Bacteria in the Sea. *FEMS Microbiol. Ecol*, 102:161–166.

- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1998. Effects of a Probiotic Bacterium on Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Survival and Growth. *Aquaculture*, 167: 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasaveta, P. 2000. Immunity Enhancement in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) by a Probiotic Bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191: 271-288.
- Rheims, H., Felske A., Seufert, S., and Stackebrandt, E. 1999. Molecular Monitoring of an Uncultured Group of the Class *Actinobacteria* in Two Terrestrial Environments. *J. Microbiol. Methods*, 36: 65–75.
- Rheinheimer, G. 1992. *Aquatic Microbiology*. Wiley, London, UK, 363 pp. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., and Matilla-Sandholm, T. 2000. Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197–215.
- Ringo, E. 2004. Lactic Acid Bacteria in Fish and Fish Farming. p. 581-610. *In* Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects 3rd ed. Revised and Expanded by Salminen, S., von Wright, A., and Ouwehand, A. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Ringo, E., and Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic Acid Bacteria in Fish: A Review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
- Ringo, E., and Storm, E. 1994. Microflora of Arctic Charr, *Salvelinus alpinus* (1):Gastrointestinal Microflora of Free Living Fish and Effect of Diet and Salinity on Intestinal Microflora. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 623-629.
- Ringo, E., Bendisken, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A., and Olsen, R.E. 1998. The Effect of Dietary Fatty Acids on Lactic Acid Bacteria Associated with the Epithelial Mucosa and from Faecalia of Atlantic Charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Appl. Microbiol*, 85: 855-864.
- Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., and Ouwehand, A.C. 2003. Absence of Host Specificity for in vitro Adhesion of Probiotic Lactic Acid Bacteria to Intestinal Mucus. *Veterinary Microbiology*, 97: 55-61.
- Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez, E., and Velázquez, E. 2005. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a Xylanolytic Bacterium Isolated from the Phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 55: 743-746.
- Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M., and Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* Infections in *Penaeus vannamei* Larvae. *Dis. Aquat. Org*, 32: 151–155.

- Rojas, R.A., Narváez, J., Zamudio, M., and Mena, M. 2008. A Simple Silica based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Molecular Biotechnology*, 40: 13-17.
- Rondon, M., Goodman, M., and Handelsman, J. 1999. The Earth's Bounty: Assessing and Accessing the Soil Microbial Diversity. *Trends in Biotechnology*, 17: 403-409.
- Rosenberg, E., and Ben, Y. 2002. Microbial Diseases of Corals and Global Warming. *Environ. Microbiol*, 4: 318–326.
- Ruangpan, L., and Kitao, T. 1991. *Vibrio* Bacteria Isolated from Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *J Fish Dis*, 14: 383–388.
- Ruby, E.G., Greenberg, E.P., and Hastings, J.W. 1980. Planktonic Marine Luminous Bacteria: Species Distribution in the Water Column. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 302-306.
- Ruimy, R., Breitmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Bouseemart, O., Gauthier, M., and Christen, R. 1994. Phylogenetic Analysis and Assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* Deduced From Small-Subunit rRNA Sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 44: 416-426.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., and Matilla-Sandholm, T. 2000. Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197–215.
- Saeed Z.N., Mehran H.R. and Ghobad A.T. 2006. The Effect of *Bacillus* spp. Bacteria Used as Probiotics on Digestive Enzyme Activity, Survival and Growth in the Indian White Shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252: 516-524.
- Sagova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhacova, K., Forstova, J., and Kopecky, J. 2008. Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9): 2902-2907.
- Sanz, J.L and Köchling, T. 2007. Molecular Biology Techniques Used in Wastewater Treatment: an Overview. *Process Biochemistry*, 42: 119-133.
- Schäfer, H., and Muyzer, G. 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology. In: Paul, J. (Ed). *Methods in Microbiology*. Academic Press London, 30: 425-468.

- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., and Amann, R. 2003. An Improved Protocol for the Quantification of Freshwater *Actinobacteria* by Fluorescence in situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2928–2935.
- Selje, N., Brinkhoff, T., and Simon, M. 2005. Detection of Abundant Bacteria in the Weser Estuary Using Culture-Dependent and Culture-Independent Approaches. *Aquat. Microb. Ecol.*, 39: 17–34.
- Serna, L., Valencia, L.J., and Campos, R.G. 2010. Kinetic of Fermentation and Antimicrobial Activity of *Weissella confusa* Against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, 55: 55-65.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., and Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40bp G+C Rich Sequence (GC clamp) to Genomic DNA Fragments by Polymerase Chain Reaction Results in Improved Detection of Single Base Changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 232–236.
- Shiratsuchi, M., Kuronuma, H., Kawahara, Y., Yoshihara, Y., Miwa, H., and Nakamori, S. 1995. Simultaneous and High Fermentative Production of L-lysine and L-glutamic Acid Using a Strain of *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59: 83-86.
- Siddiqui, Z.A., and Mahmood, I. 1999. Role of Bacteria in the Management of Plant Parasitic Nematodes: Review. *Bioresource Tech.*, 69: 167-179.
- Simoes, N., Jones, D., Soto – Rodríguez, S., Roque, A., and Gómez – Gil, B. 2002. Las Bacterias en el Inicio de la Alimentación Exógena en Larvas de Camarones Peneidos: Efectos de la Calidad del Agua, Tasas de Ingestión y Rutas de Colonización del Tracto Digestivo. In: Cruz – Suarez., L., Ricque – Marie, D., Tapia – Salazar, M., Gaxiola – Cortés, M., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* Cancún, Quintana Roo, México.
- Simpson, J., Kocherginskaya, S., Aminov, R., Skerlos, T., Bradley, T., Mackie, R and White, B. 2002. Comparative Microbial Diversity in the Gastrointestinal Tracts of Food Animal Species. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 327-331.
- Sindermann, C.J. 1990. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*, Vol. 2, 2nd edition. Academic Press, New York.
- Siragusa, G.R., and Nettles, C. 1993. Brochocin-C, a New Bacteriocin Produced by *Brochothrix campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7): 2326-2328.

- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Snoussi, M., Noumi, E., Cheriaa, J., Usai, D., Sechi, L.A., Zanetti, S., and Bakhrouf, A. 2008. Adhesive Properties of Environmental *Vibrio alginolyticus* Strains to Biotic and Abiotic Surfaces. *New Microbiology*, 31: 489-500.
- Sotomayor, M.A and Balcàzar, J.L. 2003. Inhibición de *Vibrios* Patógenos de Camarones por Mezclas de Cepas Probióticas. *AQUATIC*, 19: 1578-4541.
- Sriornual, S., Yanagida, F., Lin, L.H., Hsiao, K.N., and Chen, Y.S. 2007. Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin From *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7): 2247-2250.
- Stach, J.E., Maldonado, L.A., Ward, A., Goodfellow, M., and Bull, A.T. 2003. New Primers for the Class Actinobacteria: Application to Marine and Terrestrial Environments. *Environmental Microbiology*, 5(10): 828-841.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward, N.L. 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* Classis nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47: 479–491.
- Stevens, H., Brinkhoff, T., Rink, B., Vollmers, J., and Simon, M. 2007. Diversity and Abundance of Gram Positive Bacteria in a Tidal Flat Ecosystem. *Environmental Microbiology*, 9(7): 1810-1822.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by Lactic Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Straub, D.V. and Dixon B.A. 1993. Bacteriological Flora of the Brine Shrimp (*Anemia franciscana*) from a Hypersaline Pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture*, 118: 309-313.
- Strohl, W.B. 2003. Antimicrobials. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Bull, A.T. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, Chapter 31.
- Strom, E., and Olfasen, J. A. 1990. The Indigenous Flora of Wild-Captured Juvenile Cod in Net-Pen Rearing. 181-185. En: Lésel, R. (Ed.). *Microbiology in poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam. 282 p.
- Sung, Y.Y., Pineda, C., MacRae, T.H., Sorgeloos, P., and Bossier, P. 2008. Exposure of Gnotobiotic *Artemia franciscana* Larvae to Abiotic Stress Promotes Heat Shock Protein 70 Synthesis and Enhances Resistance to Pathogenic *Vibrio campbellii*. *Cell Stress & Chaperones*, 13(1): 59-66.

- Suzuki, K., Kodama, Y., and Mitsuoka, T., 1989. Stress and Intestinal Flora: a Review. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 8: 23-28.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., and Komagata, K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., Isolated from Fermented Fish in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50: 1479-1485.
- Tannock, G.W. 1995. Microecology of the Gastrointestinal Tract in Relation to Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy J*, 5: 1059–1070.
- Thompson, F.L., Hoste, B., Thompson, C.C., Huys, G., and Swings, J. 2001. The Coral Bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro *et al.* 2001 is a Later Synonym of *Vibrio mediterranei* Pujalte and Garay 1986. *System. Appl. Microbiol*, 24(4): 516–519.
- Thompson, J., Randa, M., Marcelino, L., Tomita, A., Lim, E., and Polz, M. 2004. Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4103-4110.
- Tiedje, J.M., and Stein, J.L. 1999. Microbial Diversity: Strategies for its Recovery. *In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain A. L. and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 682-692.
- Torsvik, V., and Ovreás L. 2002. Microbial Diversity and Function in Soil: from Genes to Ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240-245.
- Torsvik, V., Ovreás L., Thingstad T.F. 2002. Prokaryotic Diversity- Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science*, 296: 1064-1066.
- Trujillo, M.E., and Goodfellow, M. 2003. Numerical Phonetic Classification of Clinically Significant Sporoactinomycetes and Related Organisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 39–68.
- Ue, S., Matsuo, Y., Kasai, H., and Yokota, A. 2010. *Demequina globuliformis* sp. nov., *Demequina oxidasica* sp. nov., and *Demequina aurantiaca* sp. nov., Actinobacteria Isolated from Marine Environments and Proposal of Demequinaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, Julio 23.
- Umezawa, H. 1988. Low Molecular Weight Enzyme Inhibitors and Immunomodifiers. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordarski, M. (eds). London: Academic Press, pp. 285–325.
- Urakawa, H., Yoshida, T., Nishimura, M., and Ohwada, K. 2000. Characterization of Depth- Related Population Variation in Microbial Communities of a Coastal Marine Sediment Using 16S rDNA-based Approaches and Quinine Profiling. *Environ. Microbiol*, 2: 542–554.

- Urdaci, M.C., Stal, L.J., and Marchand, M. 1988. Occurrence of Nitrogen Fixation Among *Vibrio* spp. Archives of Microbiology, 150(3): 224-229.
- Vandenbergh, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H.S., and Swings, J. 1998. *Vibrios* Associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) Larvae in Chinese Shrimp Hatcheries. Aquaculture, 169: 121– 132.
- Vandenbergh, J., Thompson, F., Gomez, B., and Swings, J. 2003. Phenotypic Diversity Amongst *Vibrio* Isolates from Marine Aquaculture Systems. Aquaculture, 219: 9–20.
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J. 1999. *Vibrios* Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock and Hatchery Probiotics. Appl. Environ. Microbiol, 65: 2592–2597.
- Vaughan, E.E., Heilig, H.G.H., Ben-Amor, K., and de Vos, W.M. 2005. Diversity, Vitality and Activities of Intestinal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Assessed by Molecular Approaches. FEMS Microbiol. Rev, 29: 477–490.
- Vaz-Moreira, I., Faria, C., Nobre, M.F., Schumann, P., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. 2007. *Paenibacillus humicus* sp. nov., Isolated from Poultry Litter Compost. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 57: 2267-2271.
- Velázquez, E., de Miguel, T., Poza, M., Rivas, R., Rosselló-Mora, R., and Villa, T.G. 2004. *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a Xylanolytic Bacterium Isolated from Cow Faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 54: 59-64.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., Gupta, R.S., and van Sinderen. 2007. Genomics as a Means to Understand Bacterial Phylogeny and Ecological Adaptation: the Case of Bifidobacteria. Antonie Leeuwenhoek, 91: 351–372.
- Verdonck, L., Grisez, L., Sweetman, E., Minkoff, G., Sorgeloos, P., Ollevier, F., and Swings, J. 1997. *Vibrios* Associated with Routine Productions of *Brachionus plicatilis*. Aquaculture, 149: 203–214.
- Verdonck, L., Swings, J., Kersters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P., and Leger, P. 1994. Variability of the Microbial Environment of Rotifer *Brachionis plicatilis* and *Artemia* Production Systems. J. World. Aquaculture. Soc, 25: 55–59.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiology and molecular Biology Review, 64: 655-671.

- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., and Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* Cultura by Treatment with Bacterial Probiotics. *Aquaculture*, 219: 43-56.
- Walter, J. 2008. Minireview. Ecological Role of *Lactobacillus* in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 4985-4996.
- Wang, Y. 2007. Effect of Probiotics on Growth Performance and Digestive Enzyme Activity of the Shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269: 259-264.
- Wang, Y., Li, J., and Lin, J. 2008. Probiotics in Aquaculture; Challenges and Outlook. *Aquaculture*, 281(1-4): 1-4.
- Wang, Y.B., Xu, Z.R., and Xia, M.S., 2005. The Effectiveness of Commercial Probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) Ponds. *Fisheries Science*, 71: 1034–1039.
- Wang, Y.N., Wang, B.J., Dai, X., Jiao, N.Z., Peng, Z.Y., and Liu, S.J. 2004. Ecological Characterization of Bacilli in Sediment from a Near-Shore Marine Horticultural region. *Chinese Journal Applied and Environmental Biology*, 10: 484–488.
- Watts, J.E., Huddleston, A.S., and Wellington, E.M. 1999. Bioprospecting. *In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A. L., and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 631- 641.
- Wauters, G., Charlier, J., Janssens, M., and Delmee, M. 2001. Description of *Brevibacterium paucivorans* sp. nov. Isolated from Human Clinical Specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51:1703-1707.
- Weese, J.S., Weese, H.E., Yuricek, L. and Rousseau, J. 2004. Oxalate Degradation by Intestinal Lactic Acid Bacteria in Dogs and Cats. *Vet. Microbiol*, 101(3): 161-166.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-7.
- Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K.S., Yamamoto, K. and Honda, T. 1999. Physical and Genetic Map of the Genome of *Vibrio parahaemolyticus*: Presence of Two Chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol*, 31: 1513-1521.
- Yasuda, K. and Kitao, T. 1980. Bacterial Flora in the Digestive Tract of Prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 19: 229-234.

- Yi, H., Schumann, P., and Chun, J. 2007. *Demequina aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Novel Actinomycete of the Suborder Micrococccineae, and Reclassification of *Cellulomonas fermentans* Bagnara et al. 1985 as *Actinotalea fermentans* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 57: 151–156.
- Yoshizawa, S., Wada, M., Kita-Tsukamoto, K., Ikemoto, E., Yokota, A., and Kogure, K. 2009. *Vibrio azureus* sp. nov., a Luminous Marine Bacterium Isolated from Seawater, Int J Syst Evol Microbiol, 59: 1645-1649.
- Yumoto, I., Iwata, H., Sawabe, T., Ueno, K., Ichise, N., Matsuyama, H., Okuyama, H., and Kawasaki, K., 1999. Characterization of a Facultatively Psychrophilic Bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that Exhibits High Catalase Activity. Appl. Environ. Microbiol, 60: 67–72.
- Zamudio, M., Narvaez, J., and Rojas, R. 2008. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Sediments of a Coastal Marsh Using a Differential Selective Medium. Letters in Applied Microbiology, 46: 402-407.
- Zengler, K., Toledo G., Rappé M., Elkins J., Mathur E.J., Short J.M., and Séller, M. 2002. Cultivating the uncultured. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99: 15681-15686.
- Zheng, Z.H., Zeng, W., Huang, Y.J., Yang, Z.Y., Li, J., Cai, H.R., and Su, W.J. 2000. Detection of Antitumor and Antimicrobial Activities in Marine Organism Associated Actinomycetes Isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiol Lett, 188: 87–91.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., and Shakouri, M. 2006. The Effect of *Bacillus spp.* Bacteria Used as Probiotics on Digestive Enzyme Activity, Survival and Growth in the Indian White Shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252: 516–524.

IX. ANEXOS.

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN, Rojas *et al.*, (2008).

Extracción y purificación del ADN

1. Añadir 1 ml de buffer TEN a la muestra y agitar en vortex hasta deshacer el tejido.
2. Incubar en baño de hielo/alcohol por 15 minutos, después encubar 5 minutos en un baño a 65 °C. Repetir 3 veces este ciclo.
3. Añadir 100 µl de SDS 20% y agitar en vortex por 1 minuto.
4. Incubar 30 minutos a 30 °C.
5. Centrifugar 10 minutos a 10000xg a temperatura ambiente.
6. Pasar el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo y añadir 500 µl de acetato de potasio 5M.
7. Incubar 5 minutos a 65 °C y 20 minutos en baño de hielo.
8. Centrifugar 30 minutos a 20000xg a 4 °C.
9. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga y añadir 200 µl de la suspensión de SiO₂.
10. Agitar por inversión durante 3 minutos.
11. Centrifugar 2 minutos a 16000xg a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante.
12. Lavar la pastilla 2 veces con 1 ml de etanol al 70% (no agitar) centrifugando cada vez dos minutos a 16 000 xg a temperatura ambiente.
13. Dejar evaporar el alcohol manteniendo los tubos abiertos por 2 minutos sobre la mesa.
14. Resuspender la pastilla en 50 µl de agua destilada estéril.
15. Incubar 5 minutos a 55 °C con agitación ocasional.
16. Centrifugar 5 minutos a 16 000 xg a temperatura ambiente.

17. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo cuidando de no tomar sílice.
18. Guardar los tubos en congelación y bien etiquetados para análisis posteriores.

Composición de las soluciones

Buffer TEN (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM pH 8.0).

Buffer TE (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0).

Preparación de la suspensión de SiO₂ al 4%

1. Resuspender 2 g de SiO₂ en 15 ml de agua destilada y agitar en vortex por 1 minuto.
2. Centrifugar 2 minutos a 1 000 xg a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante. Repetir 2 veces este procedimiento.
3. Resuspender la sílice lavada en 50 ml de agua destilada estéril. Guardar a temperatura ambiente. Agitar en vortex previo a cada uso.

Anexo 2. Buffer TAE.

TAE 50X

Tabla 4. Reactivos para preparar TAE 50X.

Reactivos	Cantidad	Concentración final
Tris base	242 g	2 M
Ácido acético glacial	57.1 ml	1 M
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml	50 Mm
Agua	Aforar a 1000 ml	

TAE 1X

$$(V1) (C1) = (V2) (C2)$$

$$(X) (50X) = (1000 \text{ ml}) (1X)$$

= 20 ml de TAE 50X + 1980 H₂O destilada.

Anexo 3. Condiciones de PCR para cada juego de cebadores.

Cada reacción de PCR con los cebadores de Eubacterias 338F y 518R, tuvo el siguiente requerimiento; el buffer fue utilizado a 1X (5 µl) Anexo 4, 5mM de MgCl₂ (5 µl), los cebadores por su parte se manejaron a 20 picomol/ul (1µl de cada cebador), los DNTPs (desoxinucleotidos trifosfato) a 0.2 mM (0.5µl), fue necesaria una unidad de la Taq polimerasa (0.2 µl), 50 ng de ADN (1 µl), para un volumen final en cada reacción de 25 µl. Las condiciones de la PCR fueron, 1 minuto de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de un “touchdown”, el cual consistió en desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineación a 65 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min; durante 10 ciclos en los cuales la temperatura de alineación fue decreciendo 1 °C por ciclo; seguido de 20 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min; con una extensión final de 72 °C por 10 min (Muyzer *et al.*, 1993).

Los reacción de PCR para los cebadores de *Vibrio* presentó el siguiente requerimiento, buffer a 1X (5 µl), 5mM de MgCl₂ (5 µl), los cebadores se manejaron a 25 picomol/ul (1µl de cada cebador), los DNTPs a 0.2 Mm (0.5 µl), se utilizó una unidad de la Taq polimerasa (0.2µl), 50 ng de ADN (1µl), en un volumen final en cada reacción de 25 µl. Las condiciones de la PCR fueron modificadas de Thompson *et al.*, (2004) y Eiler y Bertilsson (2006), siendo, una desnaturalización inicial de 95 °C por 8 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 64 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 8 min.

Para las reacciones de PCR con los cebadores de Actinobacterias se utilizó lo siguiente; buffer a 1X (5 μ l), 2mM de $MgCl_2$ (estómago y hepatopáncreas en todas las condiciones) o 5mM de $MgCl_2$ (intestino en todas las condiciones, agua y alimento) los cebadores se manejaron a 10 picomol/ μ l (1 μ l de cada cebador), los DNTPs a 0.2 mM (0.5 μ l), fue necesaria una unidad de la Taq polimerasa (0.2 μ l), 50 ng de ADN (1.5 μ l), en un volumen final en cada reacción de 25 μ l. Las condiciones de la amplificación fue siguiendo la metodología de Stach *et al.*, (2003) con las modificaciones hechas por Stevens *et al.*, (2007).

Para la amplificación de bacterias ácido lácticas se realizó un PCR-semianidado, la primera amplificación se realizó con los iniciadores BaciF:348-BaciR: 1203, las condiciones de la amplificación fueron; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 63 °C por 1.30 min, 72 °C por 1 min, con un ciclo inicial de desnaturalización de 94 °C por 5 min y de extensión final de 72 °C por 5 min. Utilizando como molde los productos obtenidos en la primera amplificación, se corrió un segundo PCR utilizando el iniciador gcBaciR:1203 como antisentido, en combinación con los iniciadores Lb/F: 696 y Leu/F:478 (Escalante, 2010). Las condiciones de la amplificación en el semianidado fueron las mismas que se utilizaron con los cebadores BaciF:348-BaciR, cambiando la temperatura de alineamiento, para Lb/F: 696 permaneció igual. Y Leu/F:478 cambio a 62 °C.

La reacción de PCR para los iniciadores BaciF:348-BaciR:1203, tuvo un contenido en el que el buffer fue utilizado a 1X (5 μ l), 7mM de $MgCl_2$ (7 μ l), los iniciadores por su parte se manejaron a 5 mM (1 μ l de cada iniciador), los DNTPs a 0.2 mM (0.5 μ l), fue necesaria una unidad de la Taq polimerasa (0.2 μ l), 50 ng de ADN (1 μ l), para un volumen final en cada reacción de 25 μ l. La PCR semianidada tuvo un contenido en el que el buffer fue utilizado a 1X (5 μ l), 2.5mM de $MgCl_2$ (2.5 μ l), los iniciadores por su parte se manejaron a 5 mM (1 μ l de cada iniciador), los desoxinucleotidos trifosfato (DNTPs) a 0.2 mM (0.5 μ l), fue necesaria una unidad de la Taq polimerasa (0.2 μ l), 50 ng de ADN (1 μ l), para un volumen final en cada reacción de 25 μ l.

Anexo 4. Buffer para PCR.

Buffer 1x para PCR

tris-HCl 75 mM, pH 9,0, KCl 50 mM.

Anexo 5. Soluciones desnaturalizantes.

Tabla 5. Soluciones desnaturalizantes para DGGE con los cebadores 338F y 518R, con un porcentaje de poliacrilamida del 8%.

Reactivos	40%	60%
40% Acrilamida/Bis	20 ml	20 ml
Buffer TAE 50x	2 ml	2 ml
Formamide (desionizada)	16 ml	24 ml
Urea	16.8 g	25.2g
dH ₂ O	Aforar a 100 ml	Aforar a 100ml

Tabla 6. Soluciones desanturalizantes para DGGE con los cebadores de *Vibrio*, con un porcentaje de poliacrilamida del 8%.

Reactivos	45%	70%
40% Acrilamide/Bis	20 ml	20 ml
Buffer TAE 50x	2 ml	2 ml
Formamide (desionizada)	18 ml	28 ml
Urea	18.9 g	29.2g
dH ₂ O	Aforar a 100 ml	Aforar a 100ml

Tabla 7. Soluciones desanturalizantes para DGGE con los cebadores de Actinobacterias, con un porcentaje de poliacrilamida del 6%.

Reactivos	35%	85%
40% Acrilamida/Bis	15 ml	15 ml
Buffer TAE 50x	2 ml	2 ml
Formamide (desionizada)	14 ml	34 ml
Urea	14.7 g	35.7g
dH ₂ O	Aforar a 100 ml	Aforar a 100ml

Tabla 8. Soluciones desanturalizantes para DGGE con los cebadores para BAL, con un porcentaje de poliacrilamida del 6%.

Reactivos	40%	55%
40% Acrilamida/Bis	15 ml	15 ml
Buffer TAE 50x	2 ml	2 ml
Formamide (desionizada)	16 ml	22 ml
Urea	16.8 g	23.1 g
dH ₂ O	Aforar a 100 ml	Aforar a 100ml