



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

EFECTO DE PROBIÓTICOS EN LA  
MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y  
RESPUESTA INMUNE DEL CAMARÓN BLANCO

*Litopenaeus vannamei*

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Acuicultura)

Presenta

**Irasema Elizabeth Luis Villaseñor**

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2012

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 27 del Mes de Noviembre del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**“Efecto de probióticos en la modulación de la microbiota intestinal y respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*”**

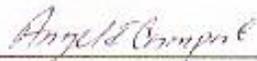
Presentada por el alumno:

**Irasema Elizabeth Luis Villaseñor**

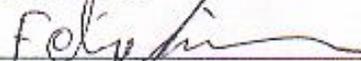
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISION REVISORA



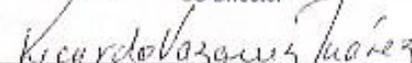
Dr. Ángel I. Campa Córdova  
CO-DIRECTOR



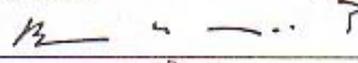
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
CO-DIRECTOR



Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
CO-TUTOR



Dr. Ricardo Vazquez Juárez  
CO-TUTOR



Dr. Bruno Gomez Gil  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

### **Comité Tutorial**

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova Co-Director (CIBNOR)

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle Co-Director (CIBNOR)

Dr. Ricardo Vázquez Juárez Co-Tutor (CIBNOR)

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes Co-Tutor (CIBNOR)

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Co-Tutor (CIAD)

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez

### **Miembros del Jurado de Examen:**

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez

### **Suplentes:**

Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Dr. Edilmar Cortés

## DEDICATORIA

*A mis padres Guillermo Rolando Luis Ruiz  
y Margarita Villaseñor García por su infinito  
amor y por darme las armas suficientes para salir  
adelante en la vida.*

*A ti amado esposo Francisco Antonio,  
que gracias a tu apoyo, consejo y amor me  
hicieron más dulce el andaren esta etapa de  
mi vida profesional.*

*Especialmente te dedico esta tesis a ti mi hermoso Nestorin  
quien eres la persona más importante en mi vida, que con una  
simple sonrisa tuya se me olvidan todos los problemas que con un  
simple "Te amo mamá" me colmas de alegría.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado con el registro No. 48351. Así mismo, agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por la oportunidad de poder realizar este trabajo de tesis así como por la extensión de beca otorgada.

A mis co-directores de tesis Dr. Ángel Campa Córdova y Felipe de Jesús Ascencio Valle por sus amables consejos y por la confianza que me brindaron para la culminación de este trabajo. Agradezco a los miembros de mi comité tutorial por su buena disposición y aportaciones que enriquecieron este trabajo.

Especialmente al Dr. Campa porque siempre creyó en mí, por ser mi amigo, por su apoyo incondicional en todas las situaciones favorables y no favorables durante este proyecto de tesis.

A la Dra. Thelma Castellanos por su excelente asesoramiento, por su ayuda incondicional; por ser una magnífica persona y tutora. Al técnico Ángel Carrillo por su ayuda y asesoramiento en una parte medular de esta tesis.

Al Dr. Bruno Gómez Gil por siempre asesorarme, por su chispa y buena disposición para trabajar. Así como, Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, unidad Mazatlán (CIAD), que me recibió durante una corta estancia de investigación. Mi sincero agradecimiento al Dr. Bruno Gómez Gil, Dra. Alejandra García Gasca, a los técnicos Rubí Hernández y Carmen Bolán por todo el apoyo académico brindado y hacerme sentir un miembro más de su laboratorio.

Mi más sincero agradecimiento al personal de la biblioteca (Esther Ojeda, Ana María Talamantes y Susana Luna) por su excelente trabajo y su buena disposición para el aporte del material bibliográfico que representó una parte esencial de este trabajo de tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio tanto de Patogénesis microbiana como de Biología molecular de Plantas por su ayuda y comentarios bien intencionados que me ayudaron a sacar adelante esta tesis.

A mis queridísimas amigas “Ros” (Rosario Pacheco Marges) y Ñoñis (Diana Medina) por su amistad, consejos y apoyo. Por brindarme un hombro cuando lo necesitaba,

por las tardes de jugar cartas mientras salía un PCR, así como por compartir conmigo el Mangle del Comitán donde platicábamos y desahogábamos de porque no salían las cosas.

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de cuatro cepas de *Bacillus* aisladas de intestinos de camarones sanos en la supervivencia y desarrollo larvario de *L. vannamei*. Esto incluyó aislamiento y caracterización de cada una de las cepas: ensayos de actividad hemolítica, pruebas de antagonismo a vibrios patógenos, capacidad de adhesión y crecimiento en moco intestinal. Así mismo, se determinó el efecto en la modulación de la comunidad bacteriana intestinal en juveniles de *L. vannamei* y su resistencia a una infección por *V. parahaemolyticus*. Se realizó un bioensayo con juveniles de  $8 \pm 1$  g de *L. vannamei*, con la adición diaria de los probióticos (20 días) con toma de muestra de intestinos cada 5 días. PCR-SSCP fue realizado a partir de los ADN extraídos directamente de los intestinos. En una segunda etapa se realizó un reto contra el patógeno *V. parahaemolyticus* (168h después de la última aplicación de los probióticos) el cual fue inyectado en 20  $\mu$ L de un inóculo a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  de camarón, con toma de muestra de hemolinfa para cuantificar los niveles relativos de expresión de algunos genes específicos (toma de muestra a las 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48h), relacionados a proteínas envueltas en la defensa inmune en invertebrados dirigido a producción de melanina, adhesión celular, encapsulación y fagocitosis en hemocitos de camarón *Litopenaeus vannamei*, en exposición aguda a la bacteria patógena mediante qPCR y toma de muestra de intestinos para el análisis de la comunidad bacteriana durante el reto con la técnica SSCP. Los resultados mostraron actividad antagónica contra *Vibrio campbelli*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* así como un incremento en la supervivencia larval, el análisis de la microbiota intestinal de los juveniles de camarón demostró que ambos probióticos influyen en la modulación de la comunidad bacteriana y presentan la mayor diversidad de especies al menos durante los primeros 10 días de inoculación. Flavobacteria y  $\alpha$ -proteobacteria (*Wandonia haliotis haldis*, *Donghicola eburneus* y *Maribius salinus*) fueron las bacterias presentes en los tres tratamientos pudiendo ser consideradas como bacterias comensales del intestino del camarón. Resultados del análisis de la comunidad bacteriana durante el reto confirmó la presencia de *V. parahaemolyticus* en control positivo corroborando la infección bacteriana y la ausencia de especies de *Vibrio* en organismos tratados con *Bacillus mix* revalidando su protección. Así mismo, se observó una mejora en la supervivencia después del reto bacteriano (*Bacillus* 33%, Control + 9% de supervivencia), y un aumento en la concentración de hemocitos circundantes a las 48h pos infección. Niveles de expresión de siete genes relacionados con respuesta inmune fueron analizados, resultados sugieren un aumento en los niveles de expresión para los genes PAP (Proteína activadora de la fagocitosis), Lysozima y Penaeidina 2 durante las primeras 3 horas pos infección; a las 12 h pos inyección un aumento en los genes CP (proteína de coagulación) y proPO (Profenoloxidasa), teniéndose los niveles más altos de expresión a las 48h para Peroxinectina (PE). Los resultados de este estudio demostraron un efecto protector por parte de *Bacillus mix* al influir en la modulación de la microbiota al menos durante los primeros 10 días de inoculación presentando la mayor diversidad de especies e incrementar la respuesta inmune celular y humoral en los organismos tratados, confirmando su efectividad como probiótico.

## ABSTRACT

In this study was evaluated the effect of four strains of *Bacillus* isolated from gut of healthy shrimp in the survival and larval development of *L. vannamei*. This involved isolation and characterization of each of the strains: hemolytic activity assays, evidence of antagonism to vibrios pathogenic, adhesion and growth capacity in mucus. Also, the effect was determined in the modulation of intestinal bacterial community in juvenile *L. vannamei* and its resistance to infection by *V. parahaemolyticus*. Bioassay was conducted with juvenile  $8 \pm 1$  g, with daily addition of probiotics (20 days) with sampling every 5 days gut. PCR-SSCP was made from the DNA extracted directly from the guts. In a second stage, a challenge against pathogenic *V. parahaemolyticus* (168 h after the last application of probiotics) which was injected into 20  $\mu$ l of an inoculum at a concentration of  $2.5 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> shrimp with hemolymph sampling to quantify the relative levels of expression of genes (0, 1, 3, 6, 12, 24 and 48h), related to proteins involved in immune defense intended invertebrates melanin production, adhesion cell phagocytosis and encapsulation of haemocytes, in acute exposure to pathogenic bacteria by qPCR and intestines sampling for analysis of the bacterial community during the challenge with the SSCP technique. The results showed antagonistic activity against *Vibrio campbelli*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* and increased larval survival, analysis of the microbiota of juvenile shrimp showed that both probiotics influence modulating the bacterial community and have the greatest diversity of species at least during the first 10 days of inoculation. Flavobacteria and  $\alpha$ -proteobacteria (*Wandonia haliotis* Haldis, *Donghicola eburneus* and *Maribius salinus*) bacteria were present in the three treatments may be considered as commensal bacteria in the gut of the shrimp. Analysis of the bacterial community during the challenge confirmed the presence of *V. parahaemolyticus* in positive control corroborating bacterial infection and the absence of *Vibrio* species in organisms treated with *Bacillus* mix revalidating their protection. *Bacillus* mix was enhancement survival after bacterial challenge (33% *Bacillus*, Control + 9% survival), and increased the concentration of hemocytes at 48h post infection. Seven expression genes related to immune response were analyzed, the results suggest an increase in expression levels for genes PAP (phagocytosis activating protein) Penaeidin Lysozime and 2 during the first 3 hours after infection, at 12 h post injection increased CP genes (protein coagulación) and proPO (prophenoloxidase), taking the highest levels of expression at 48h for Peroxinectina (PE). The results of this study demonstrate a protective effect by *Bacillus* mix to influence the microbiota modulation at least during the first 10 days of inoculation presenting the greatest diversity of species and increase cellular and humoral immune response in the treated organisms, confirming its effectiveness as a probiotic.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	Vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi.
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Producción acuícola	1
1.2 Métodos profilácticos (PROBIÓTICOS)	3
1.3 Efecto de probióticos en la microbiota intestinal	5
1.4 Respuesta inmune en invertebrados	7
<b>2. Antecedentes</b>	<b>12</b>
2.1. Habilidad competitiva contra patógenos	12
2.2. Colonización bacteriana y su efecto en la microbiota intestinal	14
<b>3. Justificación</b>	<b>15</b>
<b>4. Hipotesis</b>	<b>15</b>
<b>5. Objetivo general</b>	<b>16</b>
5.1 Objetivos específicos	16
<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>17</b>
6.1. Aislamiento bacteriano	17
6.2. Cultivo bacteriano	17
6.3. Cultivo de bacterias patógenas	18
6.4. Actividad inhibidora <i>in vitro</i>	18
6.5. Actividad hemolítica	19
6.6 Ensayo de Dot-Blot para cepas bacterianas seleccionadas aisladas de intestino de camarón de <i>L. vannamei</i>	20
6.6. 1. Extracción de moco	20
6.6.2. Marcado Enzimático	20
6.6.3. Preparación del Cultivo	21
6.6.4. Preparación de la membrana	21
6.6.5. Inmovilización del cultivo y Ensayo de Dot-Blot	21
6.7 Crecimiento en moco evaluado mediante cuenta viable en Agar Marino	22
6.7.1. Preparación del moco	22
6.7.2. Preparación del cultivo	22
6.7.3. Tinción con Naranja de Acridina	22
6.8. Efecto de Bacterias candidatas a probióticos en la supervivencia larvaria de <i>L. vannamei</i>	23
6.9. Efecto de Bacterias candidatas a probióticos en el desarrollo larva	24
6.10. Identificación de las cepas bacterianas	24

6.11. Efecto de probióticos en la microbiota del tracto digestivo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	25
6.11.1. Bioensayo	25
6.11.2. Prueba reto	25
6.11.3. Extracción de Hemolinfa	26
6.11.3.1. Cuantificación de hemocitos	27
6.11.4. Análisis estadísticos	27
6.12. Análisis de comunidad bacteriana con el uso de la técnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	27
6.12.1. Amplificación por PCR	27
6.12.2. Preparación de cadena sencilla de DNA	29
6.12.3. Tinción de geles de SSCP con Nitrato de Plata	30
6.12.4. Elusión y re-amplificación de bandas seleccionadas	31
6.12.5. Análisis estadísticos de curvas densitométricas de los geles de SSCP	31
6.13. Análisis de la expresión de genes de respuesta inmune por qPCR en tiempo real	32
6.13.1. Primers	32
6.13.2. Caracterización cualitativa por PCR punto final, estandarización de la reacción por PCR cuantitativo y análisis de los genes de referencia.	34
6.13.2.1. Extracción de RNA	34
6.13.2.2. Síntesis cDNA con Go Script Reverse	35
6.13.2.3. PCR cuantitativo (qPCR)	36
6.13.2.4. Análisis de expresión	37
7. Resultados.	38
7. 1. Aislamiento bacteriano	38
7. 2. Selección de cepas bacterianas	39
7.2.1. Pruebas de antagonismo	39
7. 3. Ensayo de adhesión a moco y mucina por el método Dot-Blot	41
7.4. Crecimiento en moco de bacterias seleccionadas	42
7. 5. Efecto de las cepas bacterianas en la supervivencia e índice de desarrollo larval	46
7.6. Identificación de las bacterias candidatas a probióticos	50
7.7 Efecto de probióticos en la modulación de la microbiota intestinal de juveniles de <i>L. vannamei</i>	53
7.8 Análisis de la composición de la microbiota intestinal durante la inoculación de los probióticos	56
7.9 Análisis componentes principales de geles de SSCP antes del reto	61
7.10 Prueba reto ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CAIM 170)	62
7.11 Efecto de <i>V. parahamolyticus</i> en la modulación de la microbiota intestinal	64
7.12 Análisis de la composición de la microbiota intestinal durante la infección con la bacteria patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	66

<b>7.13</b>	<b>Análisis componentes principales de geles de SSCP después del reto</b>	<b>70</b>
<b>7.14</b>	<b>Efecto de probióticos en la respuesta inmune del camarón blanco expuesto a <i>V. parahaemolyticus</i></b>	<b>71</b>
7.14.1	Peroxinectina (PE)	71
7.14.2	Penaeidina 2 (PEN 2)	72
7.14.3	Proteína activadora de la fagocitosis (PAP)	73
7.14.4	Clotting protein (CP)	74
7.14.5	Profenoloxidasa (proPO)	75
7.14.6	Lysozima (Lyso)	76
7.14.7	LGBP (LPS-and $\beta$ -glucan binding protein)	77
<b>8.</b>	<b>Discusión</b>	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>88</b>
<b>10.</b>	<b>Literatura citada</b>	<b>89</b>
<b>11.</b>	<b>Producción científica</b>	<b>105</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Serie histórica de producción de camarón 2002-2011 en México (Conapesca, 2011)	1
2	Clasificación tentativa de tratamientos microbianos usados en acuicultura	4
3	Esquema donde se ilustra los mecanismos potenciales por los cuales bacterias probióticas pueden impactar en la microbiota. Estos mecanismos incluyen (1) competición por ingredientes de la dieta con sustrato de crecimiento, (2) bioconversión de productos fermentados, por ejemplo, azúcares con propiedades inhibitorias, (3) producción de sustrato de crecimiento, por ejemplo Exopolisacáridos o vitaminas, para el uso de otras bacterias, (4) antagonismo directo por bacteriocinas, (5) exclusión competitiva por sitios de adhesión, (6) incremento de la función de barrera, (7) reducción de inflamación, (8) estimulación de la respuesta inmune innata (O'Toole y Cooney, 2008)	6
4	Activación del sistema profenoloxidasa (Barracco et al., 2008)	8
5	<b>a)</b> Mecanismos degradativos y microbicidas asociados a los hemocitos de crustáceos durante el proceso de fagocitosis. ROI: especies reactivas de oxígeno; RNI: especies reactivas de nitrógeno; AMP: péptidos antimicrobianos. <b>b)</b> Producción de especies reactivas de oxígeno (ROIs) y nitrógeno (RNIs) por los hemocitos (Barracco et al., 2008)	11
6	Cultivo de <i>L. vannamei</i> para toma de muestra de intestino	25
7	Prueba Reto contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
8	Electroforesis y tinción de plata de geles de SSCP	30
9	Halos de inhibición utilizando la técnica de difusión	39
10	Ensayo de adhesión a moco de camarón y mucina por el método de Dot-Blot	42

11	Cepas bacterianas creciendo en moco intestinal de camarón a las 24 y 48 h de cultivo, teñidas con naranja de acridina. Crecimiento observado por microscopia de fluorescencia a una magnificación de 100X	44
12	Cepas bacterianas creciendo en moco intestinal de camarón a las 24 y 48 h de cultivo, teñidas con naranja de acridina. Crecimiento observado por microscopia de fluorescencia a una magnificación de 100X	45
13	Supervivencia larvaria de <i>L. vannamei</i> inoculadas con las cepas candidatas a probióticos	46
14	Porcentajes de supervivencia larvaria de <i>L. vannamei</i> inoculadas con las cepas candidatas a probióticos: Mix-2(●, Cepas C2-2, YC5-2 y YC3-b, 1:1:1) a una concentración de $1 \times 10^5$ UFC/mL, Alibio (○) a una concentración de $1 \times 10^6$ UFC/mL, y control (▼)	49
15	Árbol filogenético de cepas probióticas basado en las secuencias parciales del gen 16S rRNA construidos con el método neighbor-joining del programa MEGA. Los números en los nodos representan el porcentaje de frecuencia con el cual una rama dada aparece en un análisis de “bootstrap” con 1000 replicas. <i>Vibrio cholerae</i> fue usado como “outgroup”. No se considero a las frecuencias cuyos valores estuvieron por abajo del 50%. La barra de escala corresponde a 0.1 substituciones por nucleótido	52
16	Dendograma obtenido al analizar los perfiles generados mediante SSCP de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de intestino del experimento 2 a los 5 días de inoculación. La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice. Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de intestino de camarón tratados con los probióticos. Mezcla de <i>Bacillus</i> sp.: carriles 3-7, probiótico comercial Alibio: carriles 9-13, control: carriles 14-18. Bacterias de referencia <i>B. licheniformis</i> , <i>R. trifoli</i> , <i>F. johnsoniae</i> , <i>R. radiobacter</i> : carriles 1, 18 y 21. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave	53
17	Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de	54

- intestino de camarón a los 10 días de inoculación con los probióticos y su análisis de agrupación. Mezcla de *Bacillus* sp.: carriles 2-6, probiótico comercial Alibio: carriles 7-11, muestras de intestino de camarón sin tratamiento (control): carriles 12-16. Bacterias de referencia *Bacillus endophyticus* (YC3-B), *Bacillus endophyticus* (C2-2), *Bacillus tequilensis* (YC5-2) carriles 1 y 17. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades de bacterias en intestino de camarones tratados con los diferentes probióticos. La escala del dendograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice
- 18 Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de intestino de camarón a los 15 días de inoculación con los probióticos y su análisis de agrupación. Mezcla de *Bacillus* sp.: carriles 3-7, probiótico comercial Alibio: carriles 10-14, muestras de intestino de camarón sin tratamiento (control): carriles 15-19. Bacterias de referencia *B. licheniformis*, *R. trifoli*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter*: carriles 1, 2 8, 9, 20 y 21. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades de bacterias en intestino de camarones tratados con los diferentes probióticos. La escala del dendograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice 55
- 19 Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de intestino de camarón a los 20 días de inoculación con los probióticos y su análisis de agrupación. Mezcla de *Bacillus* sp.: carriles 2-6, probiótico comercial Alibio: carriles 9-13, muestras de intestino de camarón sin tratamiento (control): carriles 14-18. Bacterias de referencia *B. licheniformis*, *R. trifoli*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter*: carriles 1, 7 8, 19 y 20. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades de bacterias en intestino de camarones tratados con los diferentes probióticos. La escala del dendograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice 56
- 20 Análisis de componentes principales (PCA) usando Correlación de Pearson de los perfiles de bandeo generados a partir de los geles de SSCP asociados con las muestra de intestino del 61

- camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los tratamientos en cada uno de los tiempo día 5 (+), día 10 (□), día 15 (×), y día 20 (\*). Cada punto representa un perfil de SSCP de un solo camarón
- 21 Supervivencia de juveniles de *L. vannamei* retados con *Vibrio parahaemolyticus* a las 48h de la infección: *Bacillus mix* (MEZCLA), Probiotico comercial (ALIBIO), Camarones no tratados e infectados con *V. parahaemolyticus* (CONTROL +), Camarones no tratados e inyectados con sol. Salina 0.9% (CONTROL -) 62
- 22 Conteo de hemocitos circulantes de juveniles de *L. vannamei* retados con *Vibrio parahaemolyticus*. *Bacillus mix* (MEZCLA), Probiotico comercial (ALIBIO), Camarones no tratados e infectados con *V. parahaemolyticus* (CONTROL +), Camarones no tratados e inyectados con sol. Salina 0.9% (CONTROL -) 63
- 23 Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades bacterianas en el intestino de juveniles de *L. vannamei* a las 12 horas de ser retados contra *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170 (tiempo 12). La escala del dendograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice 65
- 24 Análisis de componentes principales (PCA) usando coeficiente Dice de los perfiles de bandeo generados a partir de los geles de SSCP asociados con las muestra de intestino del camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los tratamientos y retados contra *V. parahaemolyticus* en cada uno de los tiempo: Tiempo 0 (●), 12 h (○), 48 h (*Bacillus mix*:(●), Alibio (○), control + (●) y control negativo (●)). Cada punto representa un perfil de SSCP de un solo camarón 70
- 25 Niveles de expresión del gen Peroxinectina (PE). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-). \*Diferencia significativa 72
- 26 Niveles de expresión del gen PEN 2 (Penaeidina 2). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-).\*Diferencia significativa 73
- 27 Niveles de expresión del gen PAP (Proteína activadora de la fagocitosis). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo 74

	control (-). * Diferencia significativa	
28	Niveles de expresión del gen CP (Clotting protein). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-).* Diferencia significativa	75
29	Niveles de expresión del gen proPO (Profenoloxidasa). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-)	76
30	Niveles de expresión del gen Lyso (Lysozima). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-).*Diferencia significativa	77
31	Niveles de expresión del gen LGBP (LPS-and $\beta$ -glucan binding protein). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-).*Diferencia significativa	78

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	Patrón de hemolisis bacteriana	19
II	Programa de PCR para la amplificación del gen 16S	28
III	Programa de PCR para la amplificación de las regiones variables del gen 16S	29
IV	Preparación del gel de acrilamida al 0.625%	30
V	Secuencia de primers utilizados para cuantificación de genes de respuesta inmune por qPCR	33
VI	Tratamiento con DNAsa I (Promega): Preparar mezcla maestra	35
VII	Mezcla de reacción para síntesis de cDNA	36
VIII	Preparación de mezcla maestra	37
IX	Condiciones de PCR	37
X	Morfología colonial de cepas bacterianas aisladas del intestino de camarones adultos de <i>L. vannamei</i>	38
XI	Efecto antagónico de bacterias probióticos contra cepas de vibrio patógenas	40
XII	Capacidad de adhesión de bacterias a moco intestinal de camarón blanco <i>L. vannamei</i> y a mucina gástrica de cerdo	41
XIII	Crecimiento en moco evaluado mediante cuenta viable en Agar Marino para cepas seleccionadas	43
XIV	Índice de desarrollo larvario de <i>L. vannamei</i> tratados con bacterias candidatas a probióticos (C2-2, YC3-b, YC5-2 y YC2-a) y probióticos comerciales (Alibio y Epicin)	48
XV	Índice de desarrollo de larvas de <i>L. vannamei</i> inoculadas con bacterias	50
XVI	Identificación de bacterias seleccionadas con la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA	51

- XVII Identificación parcial de secuencias individuales de los perfiles de SSCP de muestras de intestino de camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los probióticos (Mezcla y Alibio), M1-M5 (Mezcla de *Bacillus* sp.). A1-A5 (probiótico comercial Alibio), C1-C4 (camarones no tratados como control). a,b,c,d: posición de la banda en el carril 58
- XVIII Identificación parcial de secuencias individuales de los perfiles de SSCP de muestras de intestino de camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los probióticos y retados contra *V. parahaemolyticus*, M1-M3 (Mezcla de *Bacillus* sp.). A1-A4 (probiótico comercial Alibio), C1(-)-C3(-): camarones no tratados e inyectados con solución salina como control negativo; C1(+)-C3(+): camarones no tratados y retados. a,b,c,d: posición de la banda en el carril 67

## 1. Introducción

### 1.1 Producción acuícola

La acuicultura ha sido uno de los sistemas de producción de alimento de más rápido crecimiento en las últimas tres décadas. Esta actividad no solamente se ha extendido sino también se ha diversificado, intensificado y avanzado tecnológicamente, de tal forma que su contribución a la producción de alimento, generación de divisas, seguridad alimentaria e inocuidad alimentaria, se ha incrementado de manera altamente significativa (Chavez-Sanchez e Higuera-Ciapara, 2003).

El principal abastecimiento en la producción pesquera ha sido representado en la última década por la industria acuícola, asociada en gran parte al fortalecimiento de las medidas de control sanitario para la prevención de enfermedades y epizootias en la acuicultura, la incorporación de nuevas áreas de cultivo, y al manejo más eficiente en los sistemas de cultivo implementados. Cifras de producción para el año 2011 alcanzó un volumen total de 184, 124 toneladas en peso vivo, presentando una tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años del 6.24% lo cual se debe al crecimiento de dicha actividad (Figura 1).



**Figura 1.** Serie histórica de producción de camarón 2002-2011 en México (Conapesca, 2011).

De esa cifra, la producción proveniente de la actividad acuícola representó el 59.64% del volumen total con 109,816 toneladas; la producción de camarón de aguas marinas

representó el 17.03% con 31,359 toneladas y la producción de esteros y bahías participó con el 23.33% con 42,950 toneladas (Conapesca, 2011).

Sin embargo esta actividad está expuesta a una amplia diversidad de elementos que pueden afectar su producción. Entre los factores que intervienen más frecuentemente son: agua y suelo de mala calidad, introducción de patógenos, obligando al uso de agentes químicos y/o tratamientos terapéuticos y contaminantes, así como, toxinas provenientes del medio ambiente (Chavez-Sanchez e Higuera-Ciapara, 2003).

La aparición y diseminación de organismos patógenos causantes de enfermedades que afectan a los organismos en cultivo han ocasionado serias pérdidas en este sector. Dentro de los patógenos de origen viral reportados para camarón se encuentran el virus de la mancha blanca (WSSV), el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHNV) y el virus del síndrome del Taura (TSV) (Aguirre-Guzmán y Ascencio-Valle, 2001). Las bacterias principalmente las del género *Vibrio*, son consideradas como patógenos oportunistas, localizadas principalmente en el tracto digestivo, branquias y cutícula de camarones penaeidos y ocasionalmente en hemolinfa, en presencia de factores estresantes, pueden desencadenar el desarrollo de infecciones en los organismos tales como Vibriosis, hepatopáncreas edematoso y necrótico con un alto grado de vacuolización en las células B tanto en larvas como en juveniles de camarón.

Vibriosis es una de las enfermedades que afectan los cultivos de camarón en México y es causante de pérdidas económicas considerables (CESASIN, 2004) representadas principalmente por las especies *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* (Brock y Lightner, 1990; Ishimaru et al., 1995). 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 y Lightner, 1990). Ellos están usualmente asociados con múltiples agentes etiológicos. Sin embargo, algunas especies de *Vibrio* han sido identificadas como patógenos primarios (Owens y Hall-Mendelin, 1989; Owens et al., 1992; Lavilla-Pitogo et al., 1990; de la Peña et al., 1995). Las cepas patogénicas de *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* han causado epidemias masivas en Tailandia (Nash et al., 1992) y Filipinas (Lavilla-Pitogo et al., 1990). *V. harveyi* luminiscente parece

liberar exotoxinas (Liu et al., 1996) y puede causar del 80-100% de mortalidad en los laboratorios de producción larval de *P. monodon* (Harris, 1995).

## **1.2 Métodos profilácticos (probióticos)**

Hoy en día, varios métodos preventivos inocuos para el medio ambiente se están desarrollando para controlar este tipo de enfermedades y mantener un ambiente microbiano sano en los sistemas acuaculturales, tales tratamientos son los probióticos, inmunoestimulantes, péptidos antimicrobianos, análisis quórum sensing, etc. (Vadstein, 1997; Verschuere et al., 2000a; Bachère, 2003; Defoirdt et al., 2005).

El uso de estas bacterias antagonicas como una medida precautoria en contra de los microorganismos patógenos que ocasionan estas enfermedades ha recibido últimamente atención.

Actualmente, el término probiótico usualmente se refiere a un suplemento bacteriano de un cultivo o la mezcla de cultivos de bacterias seleccionadas. De acuerdo con Gatesoupe (1999) propone una clasificación tentativa del uso de bacterias o preparaciones microbianas en acuicultura, en donde el término "Probióticos" es reservado a cepas transitorias o residentes en el tracto digestivo (Tannock, 1997), "biocontrol" implica solamente que la cepa es antagonica a patógenos (Maeda et al., 1997) y "bioremediación" se refiere a la eliminación de residuos contaminantes por los microorganismos (Figura 2).



**Figura 2.** Clasificación tentativa de tratamientos microbianos usados en acuicultura.

Fuller, (1989) definió a los probióticos como “Microorganismos vivos que al ser consumidos afectan benéficamente al consumidor al mantener un balance adecuado de la microbiota intestinal”.

Estas bacterias son adicionadas a los sistemas de producción acuícola para modificar o manipular las comunidades microbianas en el agua y sedimento, para reducir o eliminar a las especies patógenas seleccionadas, y para mejorar el crecimiento y supervivencia de las especies acuáticas en cultivo (Jory, 1998).

Entonces, los tratamientos con probióticos pueden ser considerados como métodos de control biológicos y por ello se les ha llamado organismos de biocontrol, los cuales limitan o eliminan plagas por la introducción de organismos adversos, parásitos libres o patógenos específicos.

Muchos mecanismos tuvieron que ser postulados por los cuales los probióticos incrementan la salud del organismo huésped. Estos mecanismos incluyen la creación de un ambiente hostil para patógenos por la producción de compuestos inhibitorios (bacteriocinas, lisosinas, proteasas y peróxido de hidrógeno), competición por nutrientes

esenciales y sitios de adhesión, suministro de nutrientes y enzimas; resultando en el incremento nutricional de animales cultivados, absorción directa de materia orgánica disuelta por bacterias y la modulación de las interacciones con el medio ambiente así como el desarrollo de la respuesta inmune. (Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil et al., 2000; Irianto y Austin, 2002; Balcázar et al., 2006a).

En este sentido, los probióticos se presentan como una alternativa potencial y efectiva, tanto como promotores de crecimiento así como sustancias que previenen la proliferación de enfermedades en los sistemas de cultivo, ya sea provocando modificaciones en la microbiota intestinal, lo cual influye positivamente en numerosos procesos incluyendo la digestión, la inmunidad y la resistencia a enfermedades, de tal manera que funcionan adecuadamente como promotores de crecimiento (Vaughan et al., 2002).

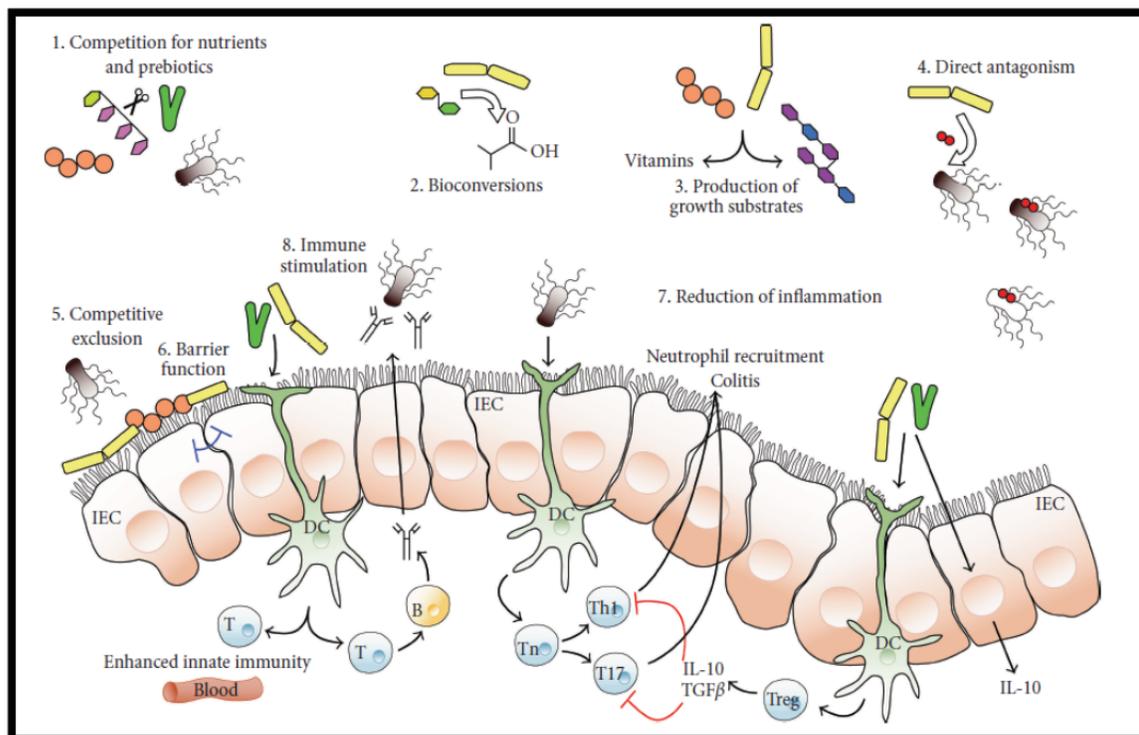
### **1.3 Efecto de probióticos en la microbiota intestinal**

La microbiota intestinal de organismos acuáticos, representa un importante factor en el mantenimiento de la salud del organismo ya sea por la prevención de la colonización de patógenos, degradación de los alimentos, producción de compuestos antimicrobianos, producción de nutrientes y manteniendo la mucosa normal inmunitaria (Escobar-Briones et al., 2006).

Otra importante función tuvo que emerger en los recientes años sugiriendo que el efecto de la microbiota comensal influencia procesos como son el metabolismo de lípidos del huésped así como el desarrollo de la respuesta inmune. La inter-relación entre la microbiota y el huésped son claramente importantes en relación a la salud y el desbalance entre estos sistemas ocasiona el desarrollo de enfermedades.

En la Figura 3 se muestra los mecanismos potenciales por los cuales los probióticos influyen sobre la microbiota intestinal. El consumo de probióticos puede modular la microbiota o cambiar sus propiedades metabólicas por competición por substratos nutricionales y por alteración de la dinámica de la utilización de carbohidratos por parte de la microbiota intestinal. La aplicación de métodos para determinar perfiles metabólicos en modelos animales han sugerido otra ruta indirecta por lo cual las bacterias probióticas

pueden impactar en la microbiota, ya sea por producción de un microambiente diferente debido a un rango diverso de rutas metabólicas.



**Figura 3.** Esquema donde se ilustra los mecanismos potenciales por los cuales bacterias probióticas pueden impactar en la microbiota. Estos mecanismos incluyen (1) competición por ingredientes de la dieta con sustrato de crecimiento, (2) bioconversión de productos fermentados, por ejemplo, azúcares con propiedades inhibitorias, (3) producción de sustrato de crecimiento, por ejemplo Exopolisacáridos o vitaminas, para el uso de otras bacterias, (4) antagonismo directo por bacteriocinas, (5) exclusión competitiva por sitios de adhesión, (6) incremento de la función de barrera, (7) reducción de inflamación, (8) estimulación de la respuesta inmune innata (O'Toole y Cooney, 2008).

Así mismo, algunas bacterias probióticas también producen vitaminas (Stanton et al., 2005) y exopolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas que sirven como sustrato para crecimiento de microorganismos comensales (O'Toole y Cooney, 2008) (Figura 3). De igual forma se ha demostrado que probióticos pueden impactar la microbiota general por antagonismo directo y/o exclusión competitiva con bacterias probióticas que presenten la capacidad de adhesión haciendo una exclusión de bacterias de la microbiota sobre el epitelio. Además, el efecto de barrera al colonizar el epitelio logra evitar la adhesión de

microorganismos patógenos al hospedero siendo uno más de los mecanismos de acción de los probióticos.

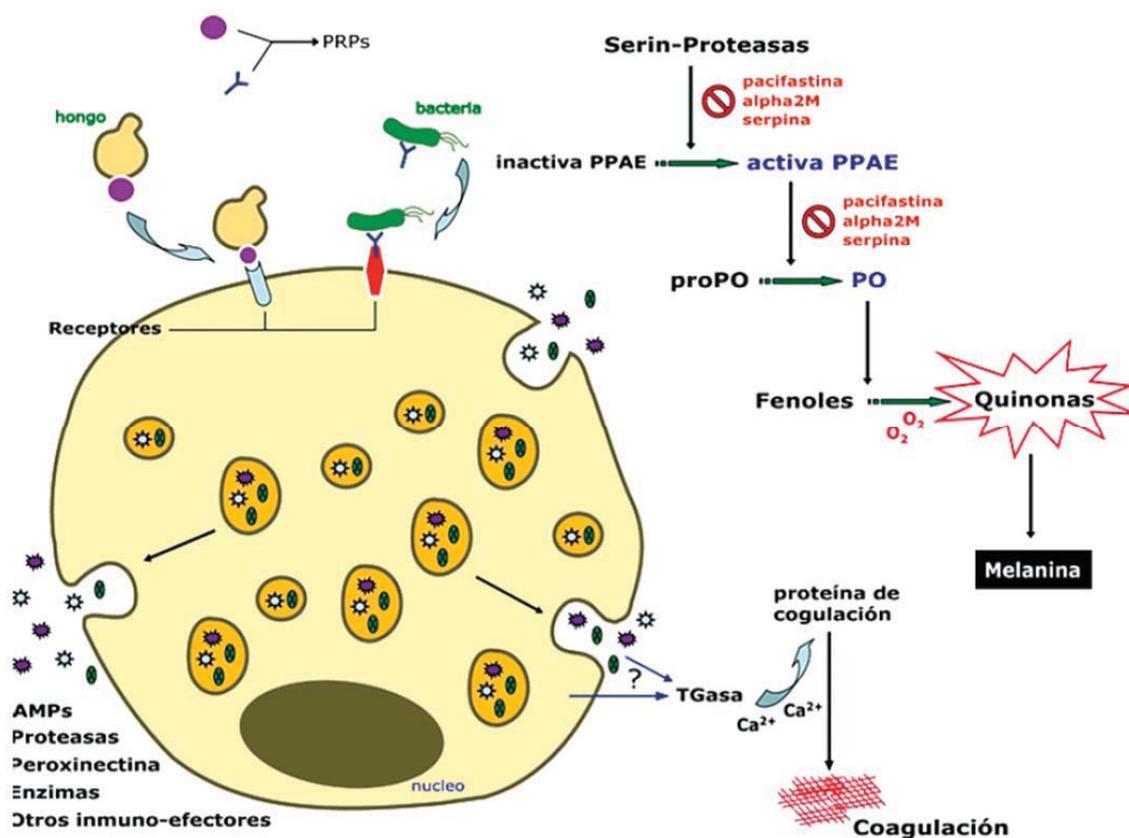
Diversos trabajos enlistan los beneficios que aportan estos probióticos a los organismos de cultivo, sin embargo, son pocos los trabajos que estudian el tipo de modulación que se realiza a la microbiota intestinal y sus efectos en la salud del organismo huésped. El interés de investigar la microbiota intestinal está basado en la necesidad de un mejor entendimiento de cómo los probióticos pueden influenciar en la composición bacteriana. Este tipo de estudios han sido ampliamente realizados en vertebrados (Brikbeck, 2005; Austin, 2006; Escobar-Briones et al., 2006; Bakke-McKellep, 2007), pero en invertebrados está muy limitado (Johnson et al., 2008).

#### **1.4. Respuesta inmune en invertebrados**

En crustáceos decápodos, los hemocitos circulantes son generalmente clasificados en tres tipos, hialinos, semigranulares y granulares. Los hemocitos están involucrados no solo en la coagulación sino también en la producción de melanina vía el sistema profenoloxidasa (proPO), los cuales juegan un importante rol en la defensa contra patógenos. Ambos hemocitos granulares y semigranulares llevan a cabo funciones como son de reconocimiento y defensa. La presencia de compuestos microbianos en el sistema inmune pueden activar directamente las funciones celulares de defensa tales como fagocitosis, melanización, encapsulación y coagulación; las proteínas reconocedoras presentes en el plasma amplían ese estímulo. Estas proteínas son LPS-binding protein, peptidoglycan-binding protein, and LPS- and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein (LGBP), y PGRP presente en el plasma (Chiu et al., 2007).

El sistema proPO puede ser activado en forma natural por componentes microbianos, como los  $\beta$ -glucanos de hongos, los peptidoglicanos y los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Figura 4). Los cuales se unen a estas proteínas de reconocimiento desencadenando la liberación del contenido granular, donde la proPO es convertida a PO mediante una serin-proteinasa, llamada enzima activadora de la profenoloxidasa (EaproFO). La PO promueve la oxidación de fenoles a quinonas, que se polimerizan de manera noenzimática formando

depósitos insolubles de melanina, que pueden ser observados como manchas oscuras en el caparazón de los camarones (Campa-Córdova et al., 2002) (Figura 3). Además de su papel en la melanización, el sistema proPO está involucrado en algunas reacciones celulares de defensa como son, la fagocitosis, la formación de nódulos, la encapsulación, la adhesión y la locomoción de hemocitos (Vargas-Albores, 1995).



**Figura 4.** Activación del sistema profenoloxidasa (Barracco et al., 2008).

Así mismo, la peroxinectina (PE), una proteína asociada a el sistema proPO, esta sintetizada y almacenada en los hemocitos granulares y semi-granulares en una forma inactiva, respondiendo a estímulos por algún elemento extraño. PE tienen múltiples funciones como son adhesión celular, opsonificación, degranulación, actividad peroxidasa e incremento de la encapsulación.

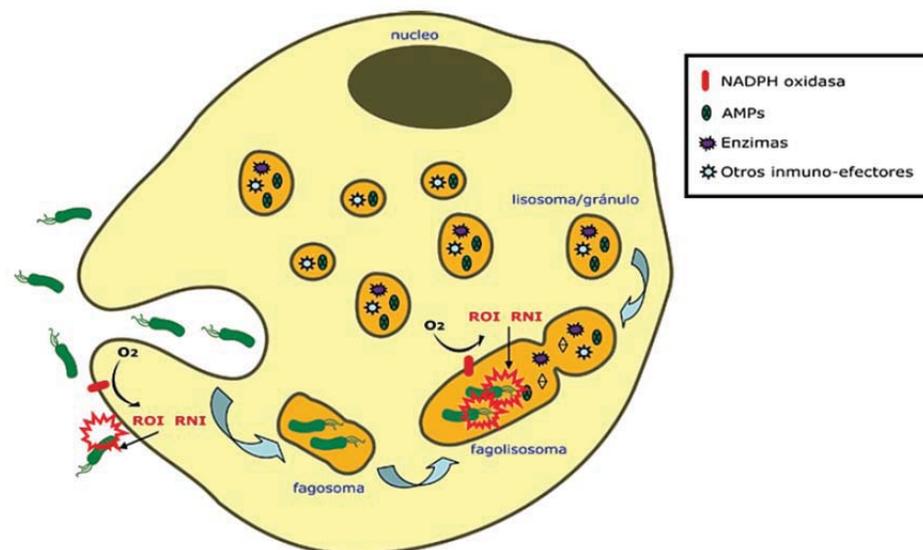
Después del proceso de invasión por microorganismos patógenos, los hemocitos migran a los sitios de infección generando una respuesta inflamatoria, en estos sitios ocurre entonces la fagocitosis de los microorganismos y/o formación de agregados celulares que envuelven a las partículas invasoras, con la subsecuente liberación de moléculas inmuno-efectoras que neutralizan y degradan a los patógenos. Durante el proceso de Fagocitosis, el patógeno es envuelto e interiorizado dentro de un fagosoma, que luego se funde con las vesículas/gránulos presentes en el citoplasma en vacuolas fagocíticas intracelulares que se unen con los gránulos lisosomales, estos se caracterizan por un pH ácido y por la presencia de una amplia variedad de enzimas hidrolíticas, capaces de matar y degradar al patógeno. Debido a la fagocitosis puede ocurrir la liberación del contenido enzimático de los lisosomas hacia el plasma, a partir de la degranulación de los hemocitos granulares. Entre las enzimas liberadas se destaca la lisozima, capaz de romper polisacáridos complejos o peptidoglicanos (PGs) aunado a esta destrucción por las enzimas lisosomales, se presenta la producción de moléculas altamente tóxicas, que ocurre con el aumento en el consumo de oxígeno a nivel intracelular (Choque respiratorio) que resulta en la producción de una variedad de radicales intermedios altamente reactivos, tanto de oxígeno (ROIs) como de nitrógeno (RNIs) (Barracco et al., 2008). Los ROIs son radicales de oxígeno que poseen electrones libres o no apareados en su órbita más externa, lo que les confiere una elevada capacidad de reacción con las estructuras y compuestos próximos, tales como membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos, esta producción de radicales está ligada a la activación de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa, localizado en la membrana celular y en la superficie de los gránulos lisosomales y es activado por lipopolisacáridos, lipoproteínas de bacterias y  $\beta$ -glucanos de hongos. Esta activación resulta en la reducción del oxígeno molecular al anión superóxido ( $O_2^-$ ) subsecuentemente inicia la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y otros compuestos reactivos como son

radical hidroxilo (-OH) y en aniones hidroxilo (OH<sup>-</sup>) por la reacción Haber-Weiss o, luego de la disminución en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en ácido hipocloroso (HOCL), oxígeno singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y en cloraminas por la acción de la mieloperoxidasa (MOP) (Bogdan et al., 2000; Chiu et al., 2007) (Figura 5). El anión superóxido es el primer producto libre del choque respiratorio y juega un importante rol en la actividad microbicida (Barracco et al., 2008).

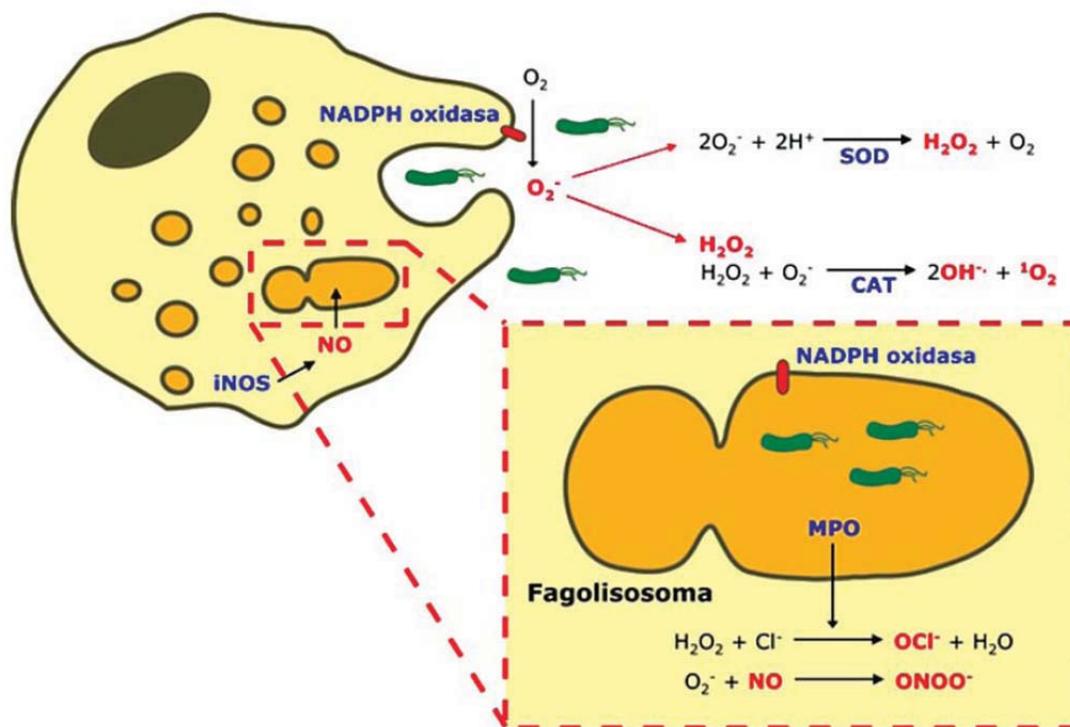
De igual forma, las proteínas y péptidos antimicrobianos o AMPs son componentes esenciales del sistema inmune innato, pudiendo presentar una actividad microbicida rápida y potente contra un amplio espectro de microorganismos (Barracco et al., 2008). El mecanismo de acción de los AMPs es a nivel de membrana del patógeno, provocando su desestabilización, ocasionado por una actividad detergente, a través de la interacción electrostática con los fosfolípidos aniónicos de la membrana, llevando a un desequilibrio de sus funciones (Barracco et al., 2008). También pueden insertarse en la bicapa lipídica, formando grandes poros, lo que lleva a un flujo incontrolado de solutos del contenido citoplasmático, resultando en la muerte del organismo. En penaeidos, tres familias de AMPs fueron descritas y caracterizadas a partir de los hemocitos: peneidinas (Destoumieux et al., 1997); crustinas (Gross et al., 2001; Bartlett et al., 2002) y factores anti-lipopolisacáridos (ALFs) (Gross et al., 2001; Supungui et al., 2002).

Las peneidinas son péptidos antimicrobianos de 5 a 8 kDa; moléculas altamente catiónicas, compuestas por una región N-terminal rica en residuos de prolina y una región C-terminal conteniendo seis residuos de cisteína unidos por tres puentes disulfídicos (Destoumieux et al., 1997). Las peneidinas están subdivididas en varios subgrupos (peneidinas 2 a 5) siendo que cada una contiene varias isoformas distintas (Gueguen et al., 2006), son expresadas en forma constitutiva en los hemocitos y presenta una actividad potente contra bacterias Gram-positivas y hongos filamentosos (Destoumieux et al., 1999; 2000).

a)



b)



**Figura 5. a)** Mecanismos degradativos y microbicidas asociados a los hemocitos de crustáceos durante el proceso de fagocitosis. ROI: especies reactivas de oxígeno; RNI: especies reactivas de nitrógeno; AMP: péptidos antimicrobianos. **b)** Producción de especies reactivas de oxígeno (ROIs) y nitrógeno (RNIs) por los hemocitos (Barracco et al., 2008).

## 2. Antecedentes

Hoy en día los probióticos son usados como control biológicos en la prevención de ataques bacterianos representando una opción para mejorar la salud y el crecimiento de los organismos contra patógenos potenciales en la acuicultura (Gatesoupe, 1999, Iriato y Austin, 2002). La mayoría de los probióticos que se han propuesto para uso en la acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y a los géneros *Vibrio*, *Bacillus* y *Pseudomonas* además de Levaduras (Balcázar et al., 2007).

Burgenst et al. (2004), probaron un suplemento alimenticio a base de levaduras (Diamond V XP Yeast Culture) en el cultivo de juveniles de *Litopenaeus vannamei* observando que con la administración de este suplemento los organismos presentan resistencia a enfermedades bacterianas principalmente ocasionadas por *Vibrios*. De igual forma, Ziaei-Nedja et al. (2005) Observaron el efecto de un Probiótico comercial a base de *Bacillus* en la actividad enzimática digestiva de *Fenneropenaues indicus* durante el desarrollo larvario y preengorda encontrando mejoras en cuanto crecimiento y supervivencia en los tratamientos con el probiótico.

### 2.1. Habilidad competitiva contra patógenos

Para seleccionar microorganismos posiblemente probióticos es necesario conocer su potencial de colonización, habilidad de competencia con patógenos, producción de sustancias antimicrobianas y su capacidad para incrementar la resistencia a las enfermedades (Balcázar, 2002).

Numerosos estudios se han encaminado a conocer el efecto inhibitorio, tal es el caso de Nakayama et al. (2009) quienes investigaron el efecto de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *B. megaterium* en términos de producción de toxinas e inhibición de *Vibrio harveyi*, concluyendo que *B. subtilis* inhibe el crecimiento de *Vibrios*; *B. licheniformis* y *B. megaterium* suprimen la actividad hemolítica de *Vibrio*.

Vaseehram y Ramsamy (2003), encontraron que el crecimiento del patógeno *Vibrio harveyi* es controlado por el probiótico *B. subtilis* BT23 tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. De manera similar, Rengpipat et al. (2000), reportaron que la inoculación con *Bacillus*S11, el cual había sido reportado previamente presenta efecto inhibitorio *in vitro* contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* incrementa la supervivencia de *P. monodon*. Así mismo, Balcázar et al. (2007) observaron que *B. subtilis* UTM 126 inhibe el crecimiento de patógenos como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Ochoa y Olmos (2006) reportaron que *B. subtilis* y *B. megaterium* presentaron alta degradación de ingredientes comúnmente usados en alimentos del camarón. Ziaei-Nejad et al. (2006), examinaron un probiótico comercial a base de *Bacillus* (i.e. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus* y *B. circulans*) observaron un incremento en la actividad enzimática (Amilasa, Lipasa y proteasa total) durante el proceso de digestión y crecimiento de *Fenneropenaeus indicus* en varias etapas ontogénicas. Guo et al. (2009) sugieren que la inoculación del probiótico *B. fusiformis* en el cultivo larvario de *L. vannamei* incrementa la supervivencia y metamorfosis.

## 2.2. Colonización bacteriana y su efecto en la microbiota intestinal

La microbiota intestinal de organismos acuáticos ha mostrado una alta dependencia de la colonización bacteriana durante el desarrollo temprano, condiciones ambientales y cambios en la dieta (Ringø et al., 1995, 2006a; Ringø y Birkbeck, 1999; Olafsen, 2001). Por tal el conocer el impacto que genera los probióticos en la modulación de la microbiota intestinal ha sido estudiado en vertebrados pero en invertebrados ha sido limitado. Tal es el caso de Li et al. (2007) quienes determinaron el efecto de fructooligosacaridos de cadena corta en la microbiota intestinal de *L. vannamei*, demostrando que el prebiótico altera la composición de la microbiota GI así como incrementa la concentración de hemocitos totales (THC) y el estallido respiratorio. Así mismo, Johnson et al. (2008) analizaron la microbiota de agua de estanques e intestino del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* observando que la microbiota presente en el estanque es la que aportaba mayor concentración de lípidos a los organismos de cultivo en comparación con el alimento formulado. Así mismo, el análisis de la microbiota intestinal presente en diversos decápodos como *Fenneropenaeus chinensis* (Liu et al., 2011), larvas de *Litopenaeus vannamei* (Pangaastuti et al., 2010), *Rimicaris exoculata* (Durand et al., 2010). Sin embargo solo dos trabajos se han enfocado en analizar el efecto de *Bacillus* en la microbiota intestinal de crustáceos tal es el caso de Daniels et al. (2010) quienes evaluaron el efecto de *Bacillus* spp. y de prebióticos en el desarrollo larvario, morfología intestinal y microbiota intestinal, observando una reducción en la diversidad de las especies. Así mismo, Liu et al. (2011) analizaron la comunidad bacteriana del camarón Kuruma (*Marsupenaeus japonicus*) y determinaron que *Bacillus* ejerce un efecto en la microbiota normal de camarón, que posiblemente tenga efectos benéficos en el organismo pero esto no fue evaluado.

Por tales razones, el presente trabajo tiene como finalidad obtener bacterias con características probióticas y determinar el efecto en la supervivencia larval del camarón blanco, así como conocer el efecto en la modulación de la microbiota intestinal y respuesta inmune que genera en juveniles de *L. vannamei*.

### **3. Justificación**

La acuicultura es una actividad de gran importancia económica debido a la cantidad de divisas que genera. Sin embargo esta actividad se ha visto expuesta a la aparición y diseminación de enfermedades que han ocasionado serias pérdidas en su producción. El uso de preparaciones microbianas como medida precautoria en contra de los microorganismos patógenos que ocasionan este tipo de enfermedades ha sido estudiado. Diversos trabajos enlistan los beneficios que aportan estos probióticos a los organismos de cultivo, sin embargo, son pocos los trabajos que estudian el tipo de modulación que se realiza a la microbiota intestinal y sus efectos en la salud del organismo huésped. Esta información es considerada un apoyo para una mejor comprensión de los mecanismos de acción ejercidos por cepas probióticas.

### **4. Hipótesis**

Las cepas de bacterias aisladas del tracto digestivo de *L. vannamei* con actividad inhibitoria *in vitro* sobre Vibrios patógenos, favorecerá la supervivencia en cultivos larvarios del mismo organismo y promoverá el mejoramiento de la respuesta inmune debido a la modificación de la microbiota intestinal del camarón blanco.

## 5. Objetivo general.

Obtener cepas bacterianas con características probióticas y evaluar su efecto en la modulación en la microbiota intestinal y el tipo de respuesta que genera (respuesta inmune y resistencia a bacterias patógenas) en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

### 5.1 Objetivos específicos.

1. Obtener cepas bacterianas con características probióticas aisladas de intestino de organismos adultos de *L. vannamei*.
2. Determinar el efecto de las cepas de probióticos aisladas en la modulación de la microbiota intestinal de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*.
3. Cuantificar mediante qPCR los niveles relativos de expresión de genes específicos, relacionados a la respuesta inmune en invertebrados, dirigido a la producción de melanina, adhesión celular, encapsulación y fagocitosis en hemocitos de camarón *Litopenaeus vannamei*, en exposición aguda al patógeno *Vibrio parahaemolyticus*.

## 6. Materiales y métodos

Para la obtención de las cepas bacterianas se utilizaron organismos adultos de *Litopenaeus vannamei* los cuales fueron mantenidos en el laboratorio de nutrición experimental del CIBNOR (La Paz, B.C.S.), hasta el momento de la extracción de los intestinos.

### 6.1. Aislamiento bacteriano

De cada muestra de intestino se realizaron aislamientos bacterianos en Agar Marino (Difco, 2216), Agar YPD y Agar Mann Rogosa y Sharp (Agar MRS, difco) mediante la utilización de la técnica de dilución seriada y extensión en superficie para aislar colonias de bacterias marinas y levaduras. La incubación se realizó a 30°C por 24 h.

Las colonias aisladas de los cultivos se observaron al microscopio mediante tinción Gram para observar la morfología de las colonias; siendo seleccionadas aquellas células con formas de bacilos. Las cepas aisladas se transfirieron a caldo YPD, caldo Marino y Caldo MRS con 15% de glicerol y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 6.2. Cultivo bacteriano

La cepa de prueba preservada a -80 °C fue descongelada y cultivada en caldo soya triptica (CST) incubando a 30°C por 24 h. El cultivo se centrifugo a 5000 x g durante 10 min, se elimino el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en una solución estéril de NaCl al 2.5%. Se determinó la densidad óptica (540 nm) en un espectrofotómetro, la cual se ajustó a 1 para obtener una concentración de  $1 \times 10^9$  células/mL (Determinado por cuenta viable). A partir de la muestra con densidad de 1.0 se hicieron las diluciones requeridas para los bioensayos *in vitro* e *in vivo*.

### 6.3. Cultivo de bacterias patógenas

*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. campbelli* pertenecen a la colección de Microorganismos de Importancia Acuática (C.A.I.M., siglas en inglés) pertenecientes al Centro de Investigación para la Nutrición y Desarrollo, Unidad Mazatlán para Acuicultura y Manejo Ambiental, las cuales se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en caldo de soya tripticasa (CST) con 2.5% de NaCl y 15% glicerol, hasta el momento de su utilización.

Cuando se requirió, las cepas fueron descongeladas y cultivadas en CST con 2.5% de NaCl e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 h. El cultivo se centrifugó a  $5000 \times g$  durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en una solución estéril de NaCl al 2.5%. Se determinó la densidad óptica (600nm) en un espectrofotómetro, la cual se ajustó a 1.0 para obtener una concentración de  $1 \times 10^9$  células/mL. A partir de la muestra con densidad de 1.0 se hicieron las diluciones requeridas para las pruebas de antagonismo.

### 6.4. Actividad inhibidora *in vitro*

El efecto bactericida de cada cepa aislada se probó *in vitro* contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. campbelli* usando el método de Dopazo et al. (1988), en el cual placas con agar soya tripticasa (AST) preparado con 2.5% de NaCl, fueron inoculadas puntualmente con 10  $\mu\text{L}$  de un cultivo de 24 h de cada cepa bacteriana. Después de una incubación de 24 h a  $30^{\circ}\text{C}$ , las células bacterianas se mataron con vapor de cloroformo durante 45 min. Las placas se recubrieron usando 6 mL de AST con 2.5% NaCl y 0.9% de agar, conteniendo 0.1 mL de una dilución 1/10 de un cultivo de 16 h de las cepas patógenas. Las placas fueron leídas a las 24 h de incubación a  $30^{\circ}\text{C}$  y cada cepa que mostró una zona de inhibición de al menos 5 mm se consideró con inhibición positiva para los patógenos probados.

Otra prueba de inhibición fue realizada de acuerdo a la técnica descrita por Balcázar et al. (2007); Donde cepas patógenas fueron inoculadas en TSA suplementadas con 2.5% de NaCl. Pozos de 3 mm de diámetro fueron hechos en el agar solidificado, fueron adicionados 10  $\mu$ L de un cultivo de cada una de las cepas candidatas a probióticos a probar. Las placas fueron incubadas a 30°C y zonas de inhibición alrededor de los pozos fueron medidas después de 24 horas.

### 6.5. Actividad hemolítica

Para determinar la actividad hemolítica de las cepas candidatas a probióticos se utilizó agar base sangre (DIFCO) al que se le adicionó 5% de sangre estéril y 2.5% de Cloruro de Sodio (Koneman, 2001). Cada cepa bacteriana fue inoculada en cajas Petri preparadas con Agar Base Sangre y se incubaron a 30°C en condiciones aerobias de acuerdo a los requerimientos de cada bacteria (Tabla I). Así mismo, se probó la actividad hemolíticade las cepas en hemocitos de camarón, de acuerdo a la técnica descrita por Chang et al., 2000, donde 1 mL de hemolinfa obtenida de camarones sanos fue inmediatamente transferida en un tubo estéril conteniendo 133  $\mu$ L 3% (w/v) de Rosa Bengal (disuelto en buffer citrato–EDTA). Esta mezcla fue adicionada a un medio basal que contenía 10 g Bacto peptona, 5 g de cloruro de sodio y 15 g de Agar disueltos en 1000 mL de agua destilada este medio fue autoclaveado y enfriado a 45-50°C. Fue adicionada 1 mL de hemolinfa por cada 15 mL de medio.

**Tabla I.** Patrón de hemolisis bacteriana

Tipo de hemolisis	Características
Alfa ( $\alpha$ )	Se deduce a partir de una zona parda a verdosa alrededor de las colonias
Beta ( $\beta$ )	Las bacterias sintetizan una hemolisina que origina una zona de lisis transparente alrededor de las mismas
Gamma ( $\gamma$ )	Algunas bacterias crecen en agar sangre sin producir ningún cambio en los glóbulos rojos. No hemolisis.
Sin crecimiento	Algunas especies bacterianas no son capaces de crecer en este medio.

## **6.6 Ensayo de Dot-Blot para cepas bacterianas seleccionadas aisladas de intestino de camarón de *L. vannamei***

### **6.6. 1. Extracción de moco**

El moco fue extraído de las paredes del intestino de reproductores de camarón blanco de *L. vannamei* utilizando una espátula de hule pequeña previamente esterilizada, resuspendiendo el moco obtenido en buffer Hepes-Hanks (HH) pH7.4 frío. El extracto crudo de moco fue centrifugado a 11,000 rpm por 10 min a 4°C con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de partículas y células epiteliales. El sobrenadante fue colocado en un tubo limpio y centrifugado nuevamente a 11,000 rpm a 4°C por 30 min, fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. Se cuantificó la concentración de proteína del extracto crudo de moco con la utilización del método BCA (BCA Protein Assay Kit).

### **6.6.2. Marcado Enzimático**

A alícuotas de moco previamente congeladas se les adicionó un inhibidor de proteasas Na<sub>2</sub>EDTA hasta una concentración final de 1 mM. El moco fue dializado contra un buffer de carbono de sodio 0.1 M a un pH 9.5 y 4°C toda la noche. Por separado se disolvieron 5 mg de peroxidasa (Horse Radish Peroxidase), HRP en 2.5 mL de agua destilada y se añadió a la mezcla 500 µL de peryodato de sodio 0.1 M recién preparado. La mezcla se agitó suavemente por 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se dializó contra un buffer de acetatos 0.0001 M con pH 4.4 toda la noche a 4°C.

Una vez dializada la enzima se añadió 20 µL de buffer de carbonatos 0.1 M, pH 9.5. Se procedió a mezclar 1 mL de la enzima tratada con 1 mL del extracto crudo de moco preparado a una concentración de 4 mg/mL de proteína. La mezcla se conservó a temperatura ambiente por 2 h mezclando ocasionalmente y se añadió a la misma 100 µL de una solución recién preparada de Borohidruro de sodio para reducir enzimas libres. La mezcla se dializó finalmente contra un buffer de boratos 0.1 M pH 7.4 durante toda la

noche a 4°C. El moco marcado fue mezclado con volúmenes iguales de glicerol al 80% y se almacenó a -20°C.

### **6.6.3. Preparación del Cultivo**

Se analizaron 7 cepas bacterianas que presentaron efecto inhibitorio *in vitro* en contra de los vibrios patógenos. Cultivos primarios crecidos por 24 h en LDM (Conway y Kjelleberg, 1989), fueron resembrados en 5 mL de medio fresco LDM y se incubaron hasta que el cultivo se encontró al final de la fase de crecimiento logarítmico, posteriormente, se cosecho 1 mL del cultivo el cual fue centrifugado y se le adicionó 1 mL de buffer Hepes Hanks (HH) pH 7.4 centrifugando a 1570 x g durante 5 min a 4°C, resuspendiendo el pellet en HH y ajustando la densidad óptica a 1 de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

### **6.6.4. Preparación de la membrana**

Una membrana de teflón (Inmobilon, Millipore), fue cortada e hidratada por 2 s en metanol, posteriormente fue enjuagada en agua destilada por 5 min y equilibrada en buffer HH procediendo a colocarla sobre una cama húmeda de papel filtro para evitar la deshidratación.

### **6.6.5. Inmovilización del cultivo y Ensayo de Dot-Blot**

Suspensiones bacterianas (10 µL) fueron inmovilizadas sobre la membrana equilibrada, colocando por triplicado fue incubada por 20 min a temperatura ambiente y agitación suave pero constante. La membrana con las muestras cargadas y aun húmedas, fue bloqueada con 10 mL de una solución al 3% Albumina de Suero Bovino (ASB), incubando durante 30 min con agitación suave para evitar que las células se despeguen de la superficie de la membrana, se realizaron tres lavados con 10 mL de Buffer HH por intervalos de 10 min entre cada lavado y a temperatura ambiente, ya bloqueada la membrana fue incubada con

una solución que contenía 10 mL de buffer HH y 100  $\mu$ L de moco previamente marcado, por un periodo de 2 h a temperatura ambiente y manteniendo agitación suave y constante. La membrana fue lavada en tres ocasiones con buffer HH. Para llevar a cabo el desarrollo de color, la membrana fue enjuagada brevemente con 10 mL de una solución de acetato de sodio 0.1 M, pH=5.1, añadiendo enseguida 10 mL de la misma solución que contenía 3.5 mg de diaminobenzidina que sirvió como cromógeno y 2.5  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno, como sustrato de la enzima. Una vez desarrollado el color, la reacción se detuvo enjuagando la membrana con agua destilada estéril.

## **6.7 Crecimiento en moco evaluado mediante cuenta viable en Agar Marino**

### **6.7.1. Preparación del moco**

Para realizar las cuentas viables de las bacterias inoculadas en moco intestinal de camarón, diluciones de moco fueron hechas hasta obtener una concentración de 4 mg/mL en HH. Posteriormente se transfirieron 3 mL de moco diluido a cajas petri y fueron expuestos a la luz U.V. por 8 min.

### **6.7.2. Preparación del cultivo**

Cepas seleccionadas fueron cultivadas por 24 h a 37°C en medio LDM, posteriormente fue inoculado moco estéril con 5000 células por cada 200  $\mu$ L de moco, se realizaron cuentas viables de los cultivos así como toma de muestras de moco cultivado con las bacterias para realizar las tinciones con naranja de acridina para determinar crecimiento en moco.

### **6.7.3. Tinción con Naranja de Acridina**

A partir de los cultivo de moco inoculado con las bacterias, se tomaron 200  $\mu$ L por duplicado, posteriormente fue centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado con 200  $\mu$ L de PBS y se le adicionó 50  $\mu$ L de una solución al 0.01% de Naranja de Acridina e incubadas a temperatura ambiente

durante 30 min, después de este periodo de incubación se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril. Preparaciones fueron hechas para observarlas en un microscopio de fluorescencia marca Olympus BX41 y un filtro B-2A (EX470-490, DM 585).

### **6.8. Efecto de Bacterias candidatas a probióticos en la supervivencia larvaria de *L. vannamei***

Una vez seleccionadas *in vitro* las cepas probióticas, fue evaluado *in vivo* su efecto protector en larvas de camarón blanco. Fueron utilizados nauplios de *L. vannamei* procedentes del laboratorio de Acuicultura Mahr S.A. ubicado en la ciudad de la Paz, B.C.S., grupos de 225 nauplios/L fueron cultivados en tanques de cultivo con capacidad útil de 40 L a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidad de 36 ppm, con aireación constante y agua de mar filtrada a  $1 \mu\text{m}$  y esterilizada por luz UV. Larvas fueron alimentadas con  $2 \times 10^5$  células/mL de *Chaetoceros calcitrans* e *Isochysis galbana* (proporción 1:1). Después de mysis I, fueron alimentadas con nauplios de *Artemia salina* precocidos, diariamente se realizaban recambios de agua del 25 %.

Un primer bioensayo fue realizado, un total de 4 cepas bacterianas (YC3-B, C2-2, YC5-2 y YC2-a) que demostraron su efectividad *in vitro* fueron inoculadas diariamente a una densidad de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, así como una mezcla bacteriana (YC3-B, C2-2, proporción 1:1 a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL), el antibiótico comercial (oxitetraciclina) a 4 mg/L y los probióticos comerciales EPICIN (1.5 ppm) y ALIBIO (Zoea I: 1 ppm, Zoea II: 2 ppm, Zoea III: 3 ppm, Mysis: 4 ppm y Postlarva: 5 ppm), a partir de zoea I hasta obtener postlarvas de *L. vannamei*, con nauplios no tratados como control.

En orden para observar el efecto de las tres bacterias que resultaron mejores en términos de supervivencia larvaria un segundo bioensayo fue realizado donde larvas fueron tratadas con una mezcla de las cepas bacterianas (*Bacillus mix*: YC3-B, C2-2 y YC5-2 a una proporción 1:1:1 a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL) así como el probiótico comercial ALIBIO y un grupo sin tratamiento como control.

### 6.9. Efecto de Bacterias candidatas a probióticos en el desarrollo larvario

Con el fin de demostrar el efecto de los probióticos, se monitorearon diariamente el avance del desarrollo de los organismos, y estos datos se usaron para el cálculo del índice de desarrollo (I.D.) de acuerdo a Villegas y Kanazawa (1979):

$$I.D. = \frac{\sum i \cdot n_i}{n}$$

en donde:  $i$  = El valor absoluto atribuido a cada estadio larvario (3: Z<sub>III</sub>; 4: M<sub>I</sub>; 5: M<sub>II</sub>; 6: M<sub>III</sub> y 7: PL<sub>1</sub>).  $n_i$  = número total de larvas en el estadio  $i$ .  $n$  = número total de organismos analizados.

### 6.10. Identificación de las cepas bacterianas

Para la identificación de las cepas candidatas a probióticos, se procedió a la extracción del ADN genómico con el uso del kit Promega Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, USA). Se realizó la amplificación del gen 16S rRNA ( $\approx 1.5$  Kb fragmentado de ADN) de cada cepa por PCR con el uso de los primers universales pA y (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) y pH\* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3), como fue descrito por Broda et al., 1999.

## 6.11. Efecto de probióticos en la microbiota del tracto digestivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

### 6.11.1. Bioensayo

Se realizó un bioensayo que tuvo una duración de 27 días con juveniles de camarón blanco con un peso promedio de  $8 \pm 0.1$  g; fueron colocados en tanques de cultivo con capacidad útil de 80 L a una densidad de siembra de 21 organismos/tanque donde se inocularon diariamente los probióticos manejando los siguientes tratamientos: *Bacillus* mix (cepas YC3-B, C2-2 y YC5-2) a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL; probiótico comercial Alibio a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL (Figura 6a y 6b); juveniles no tratados como control, se realizaron muestreos cada 5, 10, 15 y 20 días tomando 1 camarón de cada tratamiento y del control por quintuplicado. De igual forma, se realizó toma de muestras de intestino al tiempo 0, 12y 48h durante la prueba reto contra *V. parahaemolyticus*, extrayendo el intestino y colocándolo en 1 mL de Etanol absoluto para precipitar el ADN; ya en el laboratorio se elimino el etanol y el intestino fue congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización (Figura 6c).

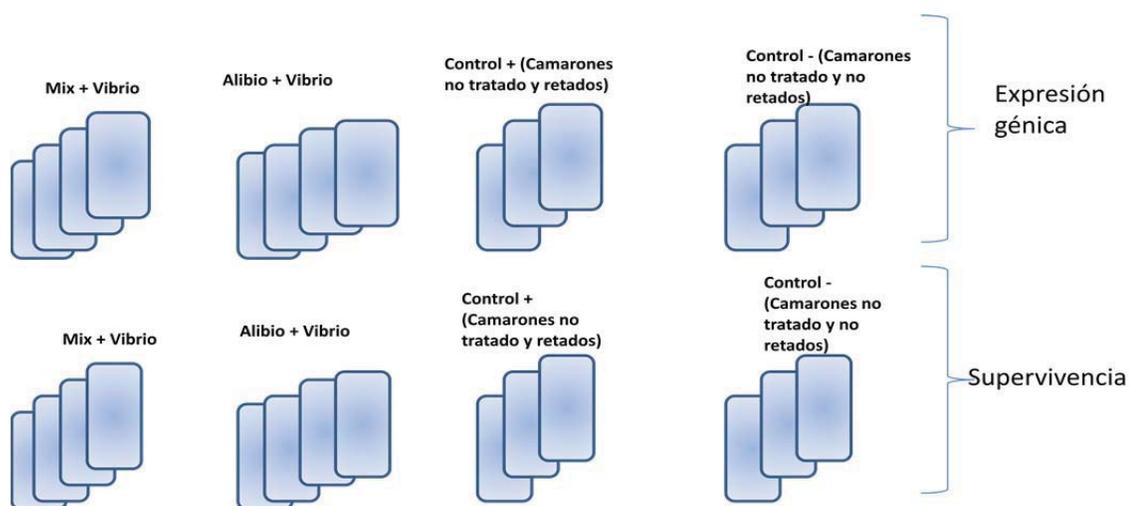


**Figura 6.** Cultivo de *L. vannamei* para toma de muestra de intestino.

### 6.11.2. Prueba reto

Se realizó una prueba reto contra la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM 170). Juveniles previamente tratados con los probióticos fueron divididos en dos grupos, un

grupo designado para la determinación de la expresión génica y un segundo grupo designado para determinar supervivencia (Figura 6). Ambos grupos fueron inyectados en el tercer segmento abdominal con una suspensión bacteriana a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  UFC/g de camarón, se realizaron toma de muestras de hemolinfa antes de la prueba reto ( $T_0$ ) a la 1, 3, 6, 12, 24 y 48h pos inyección, para cuenta de hemocitos totales y para realizar la extracción del RNA total y cuantificación de genes de respuesta inmune con el uso de la técnica de PCR en tiempo real (Figura 7).



**Figura 7.** Prueba Reto contra *Vibrio parahaemolyticus*.

### 6.11.3. Extracción de Hemolinfa

La hemolinfa fue extraída en la base del pleópodo del primer segmento abdominal cerca del poro genital utilizando una jeringa de 3.0 mL conteniendo 600  $\mu$ L de una solución anticoagulante pre-enfriada a 4°C (dependiendo de la hemolinfa colectada, se calculó el factor de dilución respecto a los 600  $\mu$ L de anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 10mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ ) (Vargas-Albores et al., 1996). La hemolinfa fue colocada en tubos eppendorft de 1.5 mL y colocados en un baño de hielo.

### **6.11.3.1. Cuantificación de hemocitos**

El conteo de los hemocitos circulantes se realizó conforme a la técnica descrita por Campa-Córdova et al., 2002, en donde a 50  $\mu$ L de hemolinfa se les aplicaron 200  $\mu$ L de formaldehído al 10%. Los hemocitos fueron cuantificados con el uso de un hematocitómetro (Neubauer) en un microscopio óptico binocular (Olympus CX21, USA) a un aumento de 10x.

El número de hemocitos se determina en células por mililitro. Para ello, se dividió el número de células contadas entre el número de cuadrantes leídos (8) x 10,000 x el factor de dilución con la solución fijadora (5) x el factor de dilución con la solución anticoagulante (2.5).

### **6.11.4 Análisis estadísticos**

Porcentajes de supervivencia obtenidos a partir de los bioensayos fueron transformados al arcoseno para su posterior análisis. Valores de supervivencia transformados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y en caso de existir diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se hizo una comparación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD  $P < 0.05$ . Análisis estadísticos fueron realizados usando en software Statistica 6.0.

## **6.12. Análisis de comunidad bacteriana con el uso de la técnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**

### **6.12.1. Amplificación por PCR**

Para la identificación de la microbiota asociada al tracto digestivo de adultos de *L. vannamei*, se utilizó la técnica SSCP con previo aislamiento de ADN de los tractos digestivos. Se procedió a realizar una PCR anidada utilizando oligonucleótidos para el gen 16S, con la utilización de los oligonucleótidos pA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

y pH\*: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', que fueron descritos por Broda et al. 1999.

Cada reacción contenía 25 ng de ADN, 2.5  $\mu$ L de buffer taq 10x, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP'S, 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 1U de taq polimerasa (Invitrogen) y agua mili Q para tener un volumen final de 25  $\mu$ L. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cycler de BIO RAD con el programa descrito en la tabla II.

**Tabla II.** Programa de PCR para la amplificación del gen 16S.

Temperatura	Tiempo	
95°C	4 min	
94°C	45 s	} 35 ciclos
56°C	45 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	$\infty$	

Se realizó una segunda PCR utilizando como templado la primera PCR pero como oligonucleótidos Com 1 5'CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3' y Com 2ph 5'CCG TCA ATT CCT TGG AGT TT 3', que amplifican las regiones variables V4 y V5 del gen 16S, cada reacción contenía 250 ng de ADN (5 ng/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L de buffer taq 10x, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP'S, 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 2.5 U de taq polimerasa (Invitrogen) y agua mili Q para tener un volumen final de 50  $\mu$ L. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cycler de BIO RAD con el programa descrito en la tabla III.

**Tabla III.** Programa de PCR para la amplificación de las regiones variables del gen 16S

TEMPERATURA	TIEMPO	
94°C	3 min	} 30 Ciclos
94°C	1 min	
50°C	1 min	
72°C	1.10 min	
72°C	5 min	
4°C	$\alpha$	

### 6.12.2. Preparación de cadena sencilla de DNA

Los productos de PCR fueron purificados mediante el Kit PCR Purification Kit (QIAGEN), una vez purificados fueron tratados con Lambda exonucleasa (BioLabs) para eliminar la hebra conteniendo al primer fosforilado: la reacción contenía 2.5  $\mu$ g del producto de PCR, 2.5 U de Lambda exonucleasa y 4  $\mu$ L de buffer 10X para tener un volumen final de 30  $\mu$ L. Los tubos conteniendo la mezcla de reacción se agitaron en vortex por 10s y se incubaron a 37°C por 45 min. Transcurrido este tiempo se llevo a cabo la purificación del ADN de cadena sencilla mediante el kit de purificación Minielute (QIAGEN). El ADN de cadena sencilla fue mezclado con un volumen igual de solución desnaturizante (formamida 95%, NaOH 10 Mm, azul de bromofenol 0.25%, cianol-xileno 0.25%). Las muestras fueron desnaturizadas a 95°C por 2 min y posteriormente se transfirieron a un baño con hielo por 2 min antes de ser cargadas en el gel de acrilamida (Tabla IV).

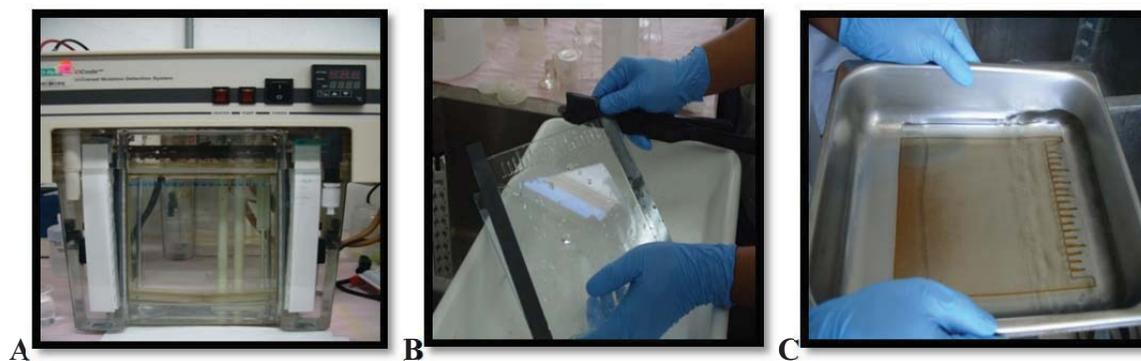
**Tabla IV.** Preparación del gel de acrilamida al 0.625%.

Reactivo	Volumen (mL)
MDE	6.240
TBE 10X	2.000
Persulfato de amonio 40%	0.020
TEMED	0.008
H <sub>2</sub> O milli Q	11.752

La electroforesis se llevó a cabo a 260 V, 65 mA, durante 18h a una temperatura de 14°C. Al término del programa de corrida los geles fueron visualizados mediante tinción con plata.

### 6.12.3. Tinción de geles de SSCP con Nitrato de Plata

Los geles fueron fijados con solución fijadora (ácido acético 10%) durante 30 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación se recuperó la solución fijadora y se procedió a realizar 3 lavados con agua milli Q durante 5 min cada uno. Posteriormente los geles se sumergieron en la solución de tinte (AgNO<sub>3</sub> 0.1%, formaldehído 0.05%) por 30 min y se lavaron con agua milli Q por 2 min. Las bandas fueron visualizadas en solución de revelado (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.3%, formaldehído 0.075%, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0.002%) hasta la aparición de las bandas (Figura 8).

**Figura 8.** Electroforesis y tinción de plata de geles de SSCP

Finalmente, los geles fueron documentados en un scanner (UMAX, Powerlook 2100 XL) en formato TIFF con una resolución de 300 dpi necesarios para el análisis de datos con el software Gel Compare II (Applied. Maths. Inc).

#### **6.12.4. Elusión y re-amplificación de bandas seleccionadas**

Antes de cortar las bandas de interés, los geles de SSCP fueron previamente hidratados con agua milli Q estéril, una vez hidratados, se procedió a cortar las bandas con el uso de un bisturí estéril. Bandas fueron colocadas en tubos de 1.5 mL previamente etiquetados y se les adicionó 50  $\mu$ L de buffer “Crush and Soak” (acetato de amonio 0.5 M, acetato de magnesio 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0 y SDS 0.1%) fragmentando la acrilamida con una punta de micropipeta estéril. Los tubos se incubaron por 3 h a 37°C y 800 rpm en un termomix, se centrifugó a 12,000 g por 1 min a temperatura ambiente y se transfirió 40  $\mu$ L de sobrenadante a un tubo nuevo. A este tubo se le adicionó 2 volúmenes de alcohol absoluto y se incubó toda la noche a 4°C para precipitar el ADN. Tubos fueron centrifugados a 12,000 g por 15 min a 4°C, para finalmente eliminar el sobrenadante y secar el pellet para posteriormente ser resuspendido en 10  $\mu$ L de Tris-HCl (10 mM, pH 8.0), se realizó una reamplificación del ADN obtenido de cada una de las bandas utilizando los oligos Com 1 y Com 2ph (Schwieger y Tebbe, 1998). Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2% en TAE teñidos con SIBRsafe y fueron mandados a secuenciar a la empresa Genewiz (NJ, USA).

#### **6.12.5. Análisis estadísticos de curvas densitométricas de los geles de SSCP**

Para determinar la diversidad en la comunidad microbiana correspondiente a los perfiles de bandeo obtenidos de los geles de SSCP, fue utilizado los siguientes índices: (1) Shannon's diversity index  $H' = \sum [p_i(\ln p_i)]$ , el cual refleja la diversidad de la comunidad microbiana; (2) Shannon's equitability index  $E' = H'/\ln(S)$ , donde S es el numero de OTU's (presumiblemente especies) y  $p_i$  es la proporción de la intensidad de la banda (Dethlefsen et

al., 2008). Para determinar la similitud entre los tratamientos se utilizaron las curvas densitométricas obtenidas de cada una de las muestras las cuales fueron exportadas a una matriz binaria (PAST software). El análisis de componentes principales (PCA) se realizó a partir de las matrices de correlación generados a partir de una matriz binaria, que se expreso como un valor de coeficiente de similitud de Pearson (Fromin et al., 2002). PCA fue realizado con el software Statistica 6.0.

### **6.13. Análisis de la expresión de genes de respuesta inmune por qPCR en tiempo real**

#### **6.13.1. Primers**

Todos los primers fueron sintetizados por Sigma. Para confirmar la especificidad de cada uno de ellos, se realizaron PCR de punto final con un set de muestras de cada uno de los tiempos muestreados, la visualización se realizó en un gel de agarosa al 2%. Las secuencias de los primers utilizados se presentan en la Tabla V.

**Tabla V.** Secuencia de primers utilizados para cuantificación de genes de respuesta inmune por qPCR.

Gen	clave	Secuencia	Referencia
Peroxinectina	PE-F	5'TGGACCTCGCGGGAGAT 3'	Wang et al., 2007
	PE-R	5'GACCGATAGCCACCATGCTT 3'	
LPS, $\beta$ -glucan binding protein	LGBP-F	5'ACCGCAGCATCAGTTATAACC 3'	Wang et al., 2007
	LGBP-R	5'GTCATCGCCCTTCCAGTTG 3'	
Penaedina 2	PEN 2-F	5'TCGTGGTCTGCCTGGTCTT 3'	Wang et al., 2010
	PEN 2-R	5'CAGGTCTGAACGGTGGTCTTC 3'	
Clotting protein	CP-F	5'TCTTTGCGCAGTTGGTGATC 3'	Wang et al., 2010
	CP-R	5'TGAGGTGACCGAGTGCAAAA 3'	
Lysozima	Lyso-F	5'TTCCGATCTGATGTCCGATGA 3'	Ji et al., 2009
	Lyso-R	5'TTGCTGTTGTAAGCCACCCAG 3'	
Profenoloxidasa	ProPO-F	5'GAGATCGCAAGGGAGAACTG 3'	Wang et al., 2010
	ProPO-R	5'CGTCAGTGAAGTCGAGACCA 3'	
Proteína activadora de la fagocitosis	LV-PAP-F	5'CTAGCCCCCTATCAAAGGAACTGC 3'	Palomec-Antonio, 2010
	LV-PAP-R	5'GGATGCCAACATAGACTGATGCAC 3'	
Proteína ribosomal L8	L8-F	5'TAGGCAATGTCATCCCCATT 3'	Gómez-Anduro et al., 2006
	L8-R	5'TCCTGAAGGAAGCTTTACACG 3'	
$\beta$ -actina	Lv-Act-F	5'ATCCTCACCTGAAATACCCCATC 3'	Palomec-Antonio, 2010
$\beta$ -actina	Lv-Act-R	5'TCTGTGTCATCTTCTCGCGGTTAG 3'	

### **6.13.2. Caracterización cualitativa por PCR punto final, estandarización de la reacción por PCR cuantitativo y análisis de los genes de referencia.**

#### **6.13.2.1. Extracción de RNA**

Hemolinfa de camarón de cada uno de los organismos muestreados fue centrifugada a 800 g /10 min para separar los hemocitos del plasma. Un total de 98 muestras para cada uno de los tiempos (tiempo 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h) se les realizó extracción de RNA total utilizando el método de TriPure Isolation Regent (Roche Applied Science) siguiendo la metodología descrita por el proveedor, en un volumen final de 30  $\mu$ L; donde a cada tubo que contenía hemocitos se le agregó 200 mg de perlas de vidrio así como 1 mL de TriPure y fueron mezclados por vortex por 20 s, fueron centrifugados a 12,000 g  $\times$  10 min a 4 °C y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente; se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se le agregó 200  $\mu$ L de cloroformo fue mezclado por vortex durante 15 s e incubado a temperatura ambiente por 10 min después fue centrifugado a 12,000  $\times$  15 min a 4°C obteniéndose la separación de RNA, DNA y proteínas, se procedió a recuperar la fase superior y colocarla en un tubo limpio agregando 1  $\mu$ L de RNA de transferencia y 500  $\mu$ L de etanol absoluto; se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g  $\times$  10 min a 4°C, se procedió a realizar un lavado con etanol al 75% (con H<sub>2</sub>O DEPC), se centrifugó a 7,500 g  $\times$  5 min a 4°C. El pellet fue puesto a secar por 10 min a temperatura ambiente y fue resuspendido en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC e incubado a 60°C por 15 min, este fue precipitado con etanol almacenado a -80°C hasta su utilización.

RNA obtenido de las muestras de camarón fueron digeridos con DNAsa con la siguiente reacción:

**Tabla VI.** Tratamiento con DNAsa I (Promega): Preparar mezcla maestra

<b>Solución</b>	<b>Reacción 1x</b>
Agua DEPC	2.0 $\mu$ L
10X buffer para DNAsa I	6.5 $\mu$ L
RNAsin	0.5 $\mu$ L
DNAsa I	6.0 $\mu$ L
Volumen total	15.0 $\mu$ L

Se agregó 15  $\mu$ L de la mezcla de reacción a cada tubo que contenía 5  $\mu$ L de RNA de las muestras de camarón, fueron incubados a 37°C durante 30 min, después de este tiempo se le añadió 6.5 $\mu$ L de LiCl a una concentración 4M y 65  $\mu$ L de fenol /cloroformo y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó a  $\sim$  12,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y fue precipitados con 2.5 volúmenes de etanol absolutos durante toda la noche a -20°C. Se centrifugó a  $\sim$  12,000 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue descartado, pellet fue lavado con 500  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó a  $\sim$  12,000 rpm durante 15 min a 4°C, fue descartado el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 20  $\mu$ l de agua DEPC y almacenó a -20°C.

#### **6.13.2.2. Síntesis cDNA con Go Script Reverse**

Se Mezclaron 5  $\mu$ L de RNA y 1  $\mu$ L de Oligo dT, se incubaron a 70°C durante 5 min inmediatamente después los tubos fueron colocados en hielo, se procedió a centrifugar a máxima velocidad y se regresó al hielo, se preparó la siguiente mezcla de reacción.

**Tabla VII.** Mezcla de reacción para síntesis de cDNA.

<b>Solución</b>	<b>Reacción 1x</b>
Agua DEPC	6.5µL
Buffer 5x Go Script	4.0 µL
dNTP's 10mM	1.0 µL
MgCl <sub>2</sub> (1.5 mM)	1.2 µL
RNAsin	0.5 µL
Enzima Go Script	0.8 µL
Volumen Total	14.0 µL

Se añadió 14 µL a cada tubo de la mezcla de reacción y se incubó a 25°C durante 5 min, después a 45°C durante 1 hora y a 70°C durante 15 min.

#### **6.13.2.3. PCR cuantitativo (qPCR)**

La PCR en tiempo real fue realizada con el uso de la enzima SSoFast Eva Green supermix. Las reacciones fueron efectuadas en el equipo C1000 CFX 96 Real time system (Bio-Rad) mediante el uso del software CFX Manager 2.1 (Bio-Rad). Los volúmenes de reacción se detallan a continuación y el programa de amplificación.

**Eva Green (Bio-Rad)****Tabla VIII.** Preparación de mezcla maestra

<b>Solución</b>	<b>Reacción 1x</b>
Agua libre de nucleasas	1.9 $\mu\text{L}$
Eva Green Súper Mix 2x	2.5 $\mu\text{L}$
Primer F	0.05 $\mu\text{L}$
Primer R	0.05 $\mu\text{L}$
cDNA	0.5 $\mu\text{L}$
<b>Volumen total</b>	<b>5 <math>\mu\text{L}</math></b>

**Tabla IX.** Condiciones de PCR:

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95 °C	30 seg	1
95 °C	5 seg	40
60 °C	20 seg	
65-95°C	5 seg	Incrementos de 0.5 °C

**6.13.2.4. Análisis de expresión**

El equipo proporciono los valores de Cq de los 9 genes (PE, PEN2, Lyso, ProPO, CP, PAP, LGBP, L8 y Actina), los cuales fueron exportados a una hoja de cálculo de Excel para su análisis correspondiente. Para el análisis de la expresión relativa se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak et al., 2001).

## 7. Resultados

### 7. 1. Aislamiento bacteriano

Se aislaron 9 cepas bacterianas del tracto intestinal del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Fueron cultivadas en medio TSA y Agar Marino con 2.5% de NaCl, realizando resiembras por estría cruzada para lograr cultivos puros. Se realizaron análisis morfológicos de las colonias aisladas para determinar Forma, Elevación, Margen, Coloración y tamaño a las 24 h de incubación como primera identificación así como el tipo de hemólisis que presentan para eritrocitos y hemocitos de camarón (Tabla II y Tabla III).

**Tabla X.** Morfología colonial de cepas bacterianas aisladas del intestino de camarones adultos de *L. vannamei*.

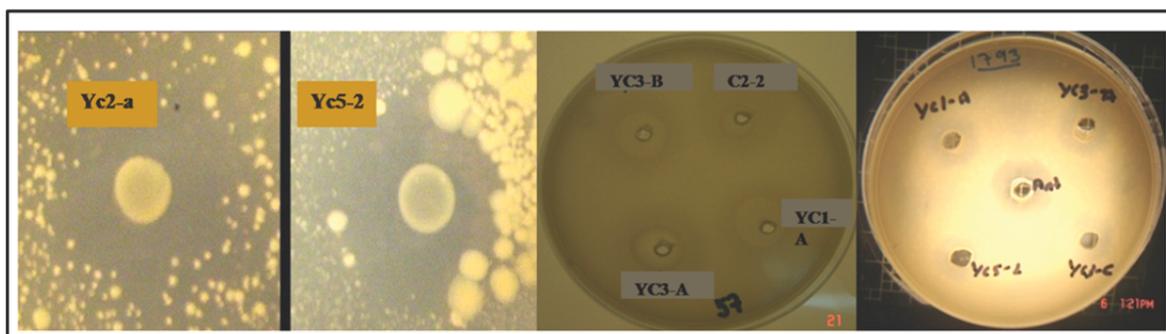
Cepa	Forma	Elevación	Margen	Color	Tamaño (mm) 24 h	Tipo de Hemolisis
YC1-A	Irregular	Monticular	Ondulado	Café-naranja	6	$\alpha$
YC3-A	Irregular	Monticular	Ondulado	Blanco-seco	8	$\alpha$
YC5-2	Circular	Convexa	Entero	Amarillo	3	$\gamma$
YC2-A	Irregular	Monticular	Ondulado	Blanca		$\gamma$
C2-2	Circular	Convexa	Entero	Crema	5	$\gamma$
YC3-B	Circular	convexa	entero	Blanco cremoso	5	$\gamma$
YC3-C	Irregular	Umbilicada	Lobulado	Blanco-seco	7	$\alpha$
YC2-B	Circular	Convexa	Entero	Crema	6	$\alpha$
YC3-D	Circular	Convexa	Lobulado	Amarillo	3	$\alpha$

## 7. 2. Selección de cepas bacterianas.

### 7.2.1. Pruebas de antagonismo

Durante el proceso de selección y caracterización, fue determinado la habilidad para inhibir el crecimiento de especies de *Vibrio* utilizando el método de doble capa descrito por Dopazo et al. (1988). Solo dos aislamientos YC5-2 y YC2-a inhibieron el crecimiento de *V. campbelli* (CAIM 333) y *V. vulnificus* (CAIM 157).

La prueba de difusión mostró que a las 24 h de cultivo las cepas inactivas YC5-2, YC3-b, C2-2 y YC2-a presentaron los mayores halos de inhibición (11-21.5 mm) para el patógeno *V. parahaemolyticus* (CAIM 170), *V. harveyi* (CAIM 1793) así como sensibilidad mas no inhibición para el patógeno *V. alginolyticus* (CAIM 57) (Fig. 9, Tabla XI).



**Figura 9.** Halos de inhibición utilizando la técnica de difusión.

Resultados con la técnica de difusión mostraron que las nueve cepas presentaron efecto inhibitorio contra cuatro de las 5 especies de *Vibrio* (CAIM 170, CAIM 1793, CAIM 157 y CAIM 333) (Tabla XI).

**Tabla XI.** Efecto antagonístico de bacterias probióticas contra cepas de vibrio patógenas.

Cepa	Gram	Actividad hemolítica	Halo de Inhibición (mm)				
			<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. campbelli</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
	Hemocitos	CAIM 170	CAIM 1793	CAIM 333	CAIM 157	CAIM 57	
YC5-2**	+	NR	17.5±0.7	11.0±1.8	5.0±1.4	18.0±1.4	*
YC2-a**	+	NR	13.5±1.0	12.0±3.0	9.0±1.4	6.5±0.2	*
C2-2	+	NR	21.5±1.1	11.5±2.1	NR	NR	*
YC3-B	+	NR	13.5±2.1	11.0±2.1	NR	NR	*
YC1-A	+	4.5±0.7	16.5±2.1	8.9±0.5	9.0±0.5	21.9±1.6	*
YC3-C	+	4.5±1.4	17.5±0.7	10.0±1.4	9.1±0.1	18.7±1.1	*
YC3-A	+	3.5±0.7	13.5±1.1	8.0±1.4	8.6±1.6	18.1±1.8	*
YC2-B	+	8.5±0.7	8.5±2.1	13.0±1.0	NR	4.6±0.8	*
YC3-D	+	8.7±0.3	9.5±0.7	11.0±1.0	NR	10.75±0.4	*

\*Sensibilidad pero no inhibición total de su crecimiento en *V. alginolyticus* en las nueve cepas.

\*\*Demostraron inhibición in vitro contra vibrios patógenos por el método de Dopazo et al., 1988.

### 7. 3. Ensayo de adhesión a moco y mucina por el método Dot-Blot

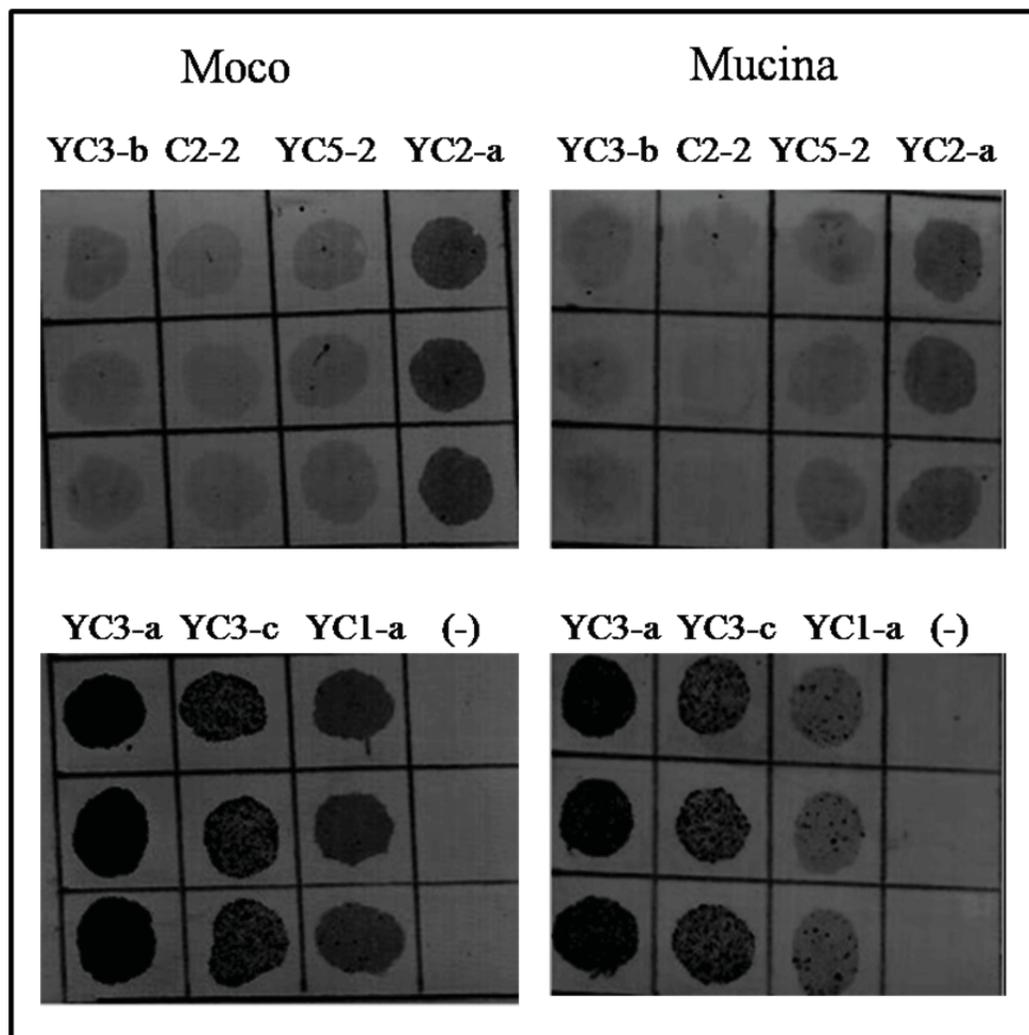
La habilidad para adherirse a moco intestinal es considerado uno de los principales criterios de selección de microorganismos probióticos como la adhesión prolongada, su permanencia en el intestino y por lo tanto ejercer un efecto saludable en el organismo huésped (Apostolou et al., 2001). Durante la caracterización del potencial probiótico, se estudio la habilidad de adherirse y colonizar el intestino de juveniles de camarón. Se realizó un ensayo Dot-Blot basado en la formación de un complejo entre compuestos promotores de la adhesión localizados en la superficie celular de bacterias y el moco intestinal como receptor etiquetado enzimáticamente, seguido por la visualización de ambos componentes en un matriz de fase solida (Rojas et al., 2002).

Para determinar la capacidad de adhesión de las bacterias seleccionadas, se realizó un ensayo de adhesión a moco tipo Dot-Blot, los resultados presentados en la tabla XII, muestran que todas las cepas analizadas se adhieren en mayor o menor grado a moco marcado y mucina, como control negativo se utilizó el buffer HH (Fig. 10, Tabla XII).

**Tabla XII.** Capacidad de adhesión de bacterias a moco intestinal de camarón blanco *L. vannamei* a mucina gástrica de cerdo.

<b>Cepa</b>	<b>Tipo de adhesión a moco de camarón marcado</b>	<b>Tipo de adhesión a mucina</b>
1.-YC3-b	Media	Media
2.-C2-2	Media	Débil
3.-YC5-2	Media	Media
4.-YC2-a	Fuerte	Fuerte
5.-YC3-a	Fuerte	Fuerte
6.-YC3-c	Fuerte	Fuerte
7.-YC1-a	Fuerte	Fuerte

En la Figura 10 se muestran las membranas utilizadas para determinar la capacidad de adhesión de cada una de las cepas a moco marcado en la tabla XII.



**Figura 10.** Ensayo de adhesión a moco de camarón y mucina por el método de Dot-Blot.

#### 7.4. Crecimiento en moco de bacterias seleccionadas.

Siete cepas fueron capaces de crecer en el moco intestinal a las 24h de haber sido inoculadas; después de 48h el número de células viables disminuyó alrededor del 50% para las cepas YC5-2, YC3-a, YC3-c, YC1-a y YC2-a presentaron conteos entre  $18 \times 10^6$

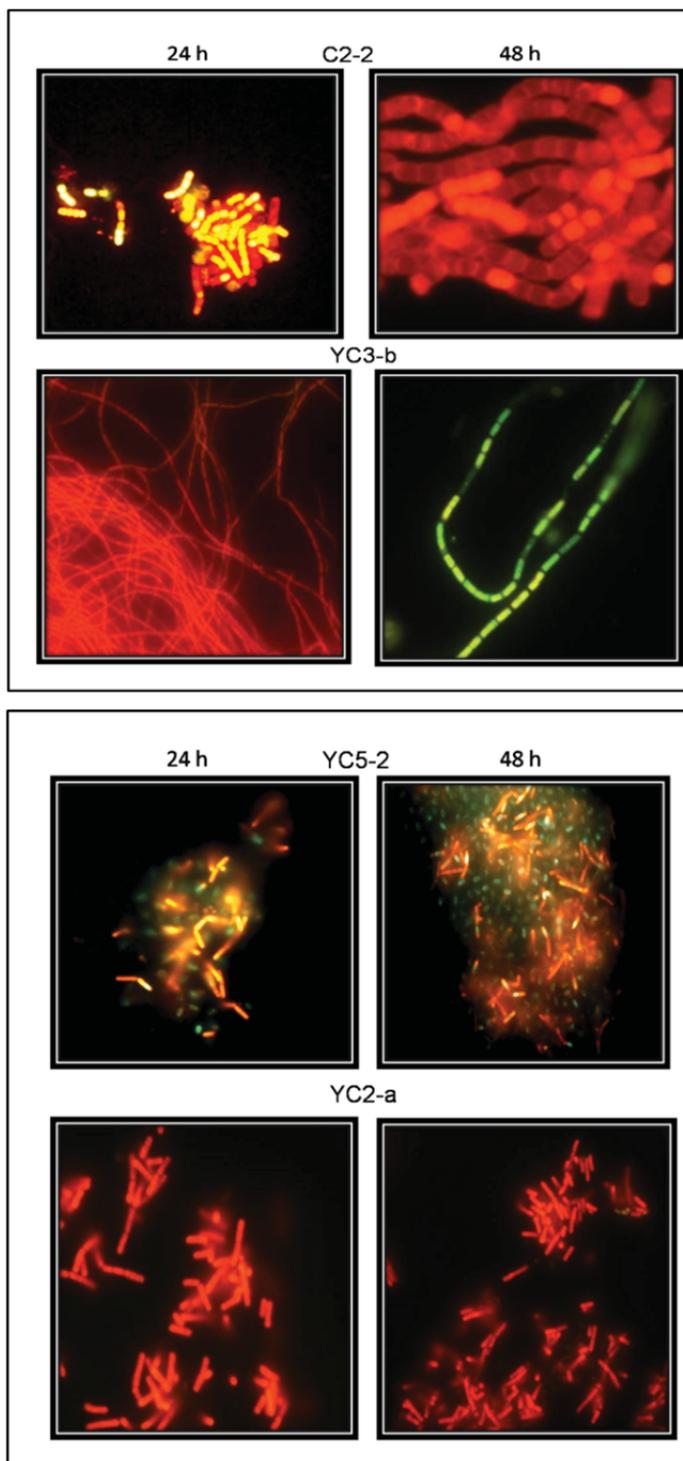
UFCmL<sup>-1</sup> and  $10 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> a las 24h, con un decrementos a las 48h presentando valores de  $1.3 \times 10^6$ UFC mL<sup>-1</sup> y  $0.126 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

La cuantificación del crecimiento se llevo a cabo por la técnica de cuenta viable en medio Agar Marino (Difco, 2216) partiendo de una inoculación de 5000 células/200μL de moco, los resultados obtenidos mostraron que las 7 cepas fueron capaces de crecer en moco y continuar siendo viables después de 24h de incubación pero a las 48h se observó un decremento en la concentración de UFC/mL (Tabla XIII).

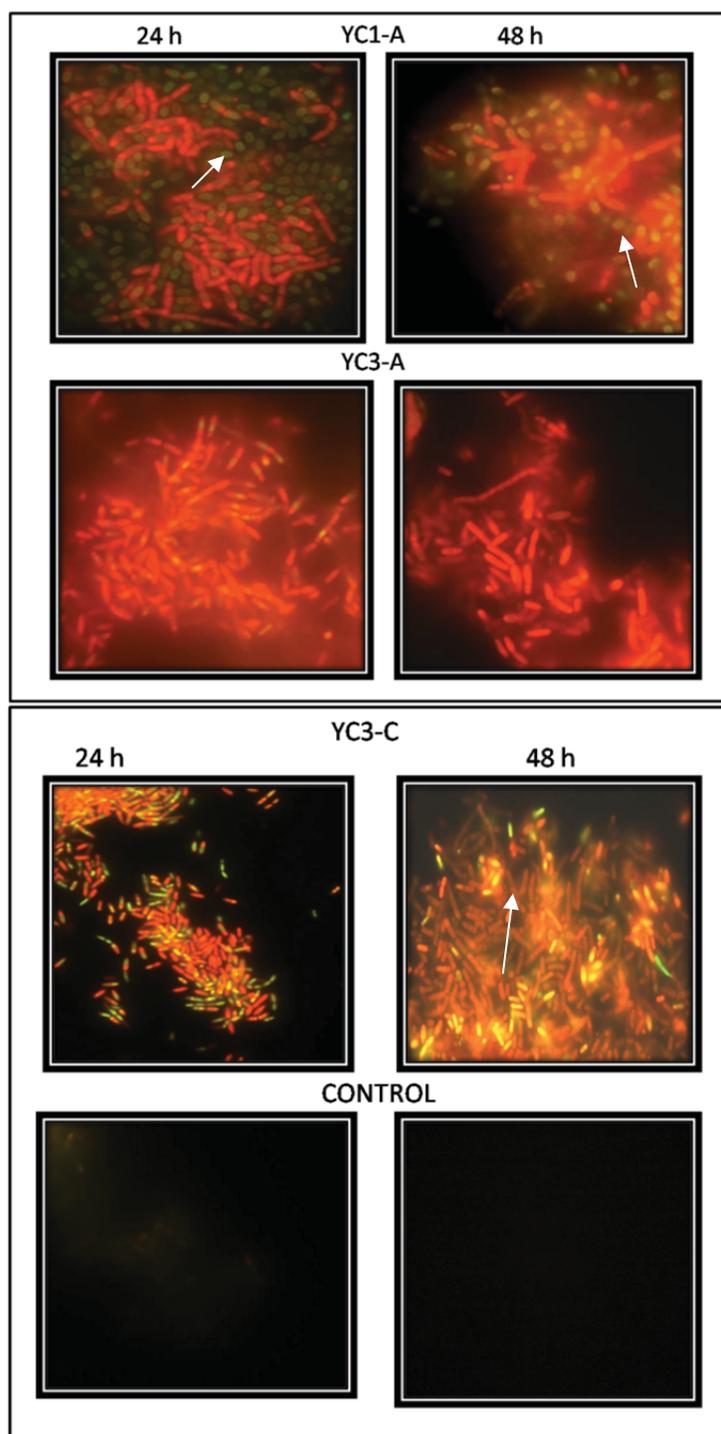
Tabla XIII. Crecimiento en moco evaluado mediante cuenta viable en Agar Marino para cepas seleccionadas.

Cepas	UFC mL <sup>-1</sup>	
	Tiempo (h)	
	24	48
YC3-b	$1.9 \times 10^6$	$0.18 \times 10^6$
C2-2	$4.1 \times 10^6$	$0.18 \times 10^6$
YC5-2	$>10.0 \times 10^9$	$0.13 \times 10^6$
YC2-a	$18.0 \times 10^6$	$1.30 \times 10^6$
YC3-a	$>10.0 \times 10^9$	$0.27 \times 10^6$
YC3-c	$>10.0 \times 10^9$	$0.84 \times 10^6$
YC1-a	$>10.0 \times 10^9$	$0.54 \times 10^6$
Control	0	0

Por otra parte, la evaluación cualitativa de crecimiento en moco fue evaluada por microscopia de fluorescencia permitiendo determinar mediante observación directa a las cepas capaces de crecer en moco, observando esporas libres a las 48h de cultivo, tal como se observa en las Figuras 11 y 12.



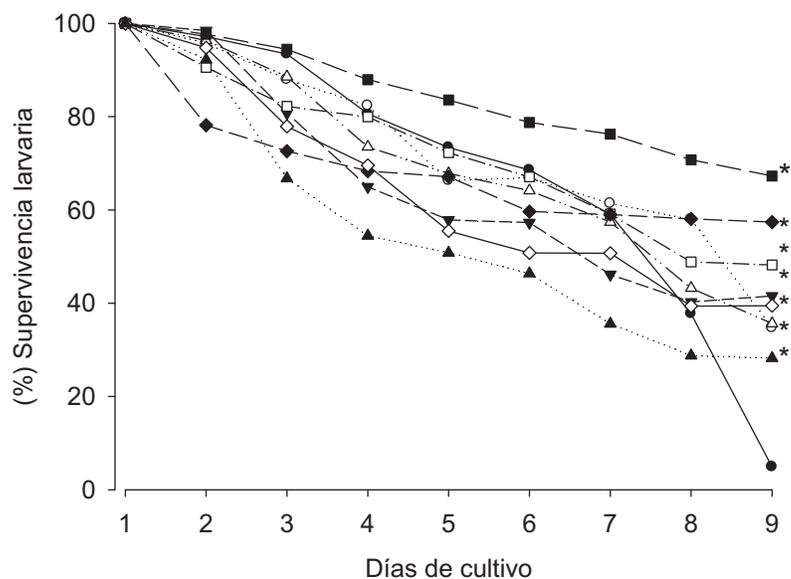
**Figura 11.** Cepas bacterianas creciendo en moco intestinal de camarón a las 24 y 48h de cultivo, teñidas con naranja de acridina. Crecimiento observado por microscopía de fluorescencia a una magnificación de 100X.



**Figura 12.** Cepas bacterianas creciendo en moco intestinal de camarón a las 24 y 48h de cultivo, teñidas con naranja de acridina. Crecimiento observado por microscopía de fluorescencia a una magnificación de 100X.

### 7. 5. Efecto de las cepas bacterianas en la supervivencia e índice de desarrollo larval.

Nauplios de *L. vannamei* fueron cultivados con una suspensión bacteriana de las cepas seleccionadas a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, con nauplios no tratados como control; el probiótico comercial ALIBIO y un tercer tratamiento adicional que consistió en el antibiótico Oxitetraciclina (OXT). En la Figura 13 se observa la supervivencia larval de los organismos cultivados con los inoculos bacterianos. Los organismos tratados con la bacteria YC5-2 presentaron un 67.26% de supervivencia final, mientras que las larvas de camarón tratadas con los probióticos comerciales Alibio y Epicin se obtuvo 57.38% y 48.19%, respectivamente.



**Figura 13.** Porcentajes de supervivencia larvaria de *L. vannamei* inoculadas con las cepas candidatas a probióticos: YC2-a (○), YC5-2 (■), YC3-b (△), C2-2 (▼), probióticos comerciales Epicin (□) y Alibio (◆); mezcla bacteriana Mix-1 (◇) (cepas C2-2 y YC3-b 1:1) a una concentración de  $1 \times 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>, antibiótico Oxitetraciclina (▲) y organismos no tratados como Control (●). \*Diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ )

El análisis de varianza aplicado a los porcentajes de supervivencia convertidos a arcoseno indicó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). De igual forma la

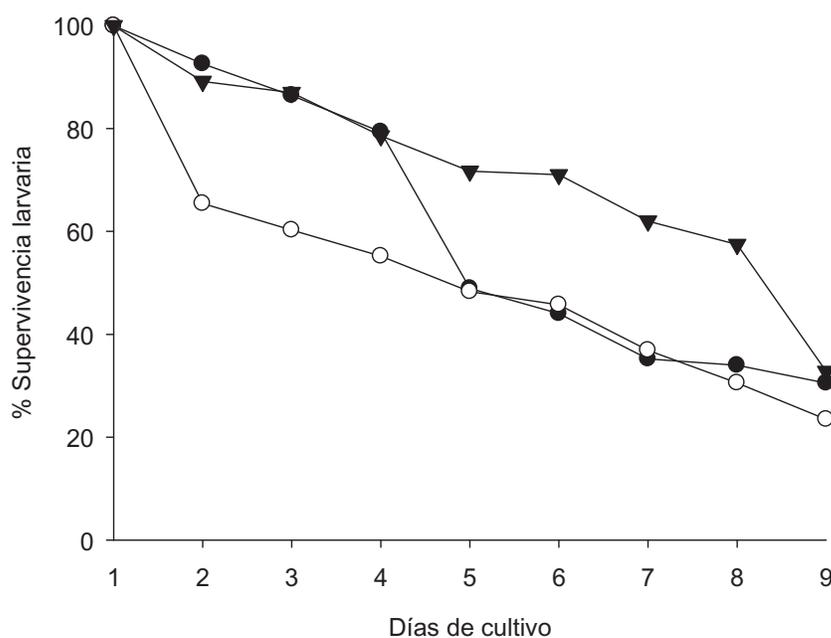
prueba de rangos múltiples de Tuckey indicó diferencias ( $p < 0.05$ ) en todos los tratamientos con respecto al control, siendo los nauplios tratados con la cepa YC5-2 (*Bacillus tequilensis*) la que obtuvo la mayor supervivencia larvaria.

En cuanto al crecimiento larval, resultados obtenidos demuestran que los organismos tratados con la mezcla bacteriana (C2-2 y YC3-b (*B. endophyticus*)) presentaron el valor más alto (6.88 = misis III avanzado-pL1) en comparación con el control que fue de 6.00 teniendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la Mezcla y los demás tratamientos y el control (Tabla XIV).

Tabla XIV. Índice de desarrollo larvario de *L. vannamei* tratados con bacterias candidatas a probióticos (C2-2, YC3-b, YC5-2 y YC2-a) y probióticos comerciales (Alibio y Epicin)

DÍA	control	TRATAMIENTOS									
		C2-2	YC3-b	YC5-2	EPICIN	YC2-a	MEZCLA	OXI	ALIBIO		
1	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	
2	1.98±0.02	2.00±0.00	1.99±0.02	2.00±0.00	1.49±0.00	2.00±0.00	1.98±0.03	2.00±0.00	1.91±0.15	1.91±0.15	
3	2.35±0.22	2.39±0.02	2.56±0.13	2.29±0.06	2.54±0.08	2.12±0.12	2.28±0.18	2.20±0.26	2.55±0.05	2.55±0.05	
4	2.84±0.08	2.87±0.17	2.89±0.05	2.79±0.02	2.98±0.04	2.69±0.19	2.91±0.03	2.86±0.04	3.06±0.24	3.06±0.24	
5	3.01±0.05	3.28±0.26	3.16±0.24	3.08±0.10	3.21±0.10	2.99±1.49	3.33±0.27	3.23±0.09	3.35±0.27	3.35±0.27	
6	3.81±0.06	3.91±0.08	3.95±0.05	3.93±0.06	3.87±0.06	3.72±0.06	4.05±0.16	3.83±0.10	3.88±0.15	3.88±0.15	
7	4.03±0.09	4.22±0.16	4.28±0.33	4.08±0.02	4.12±0.18	4.15±2.17	4.42±0.04	4.13±0.11	4.32±0.01	4.32±0.01	
8	5.17±0.04	5.17±0.13	5.11±0.04	5.22±0.13	5.07±0.05	5.17±0.06	5.06±0.10	5.24±0.09	5.64±0.38	5.64±0.38	
9	5.85±0.88	6.00±0.00	6.03±0.04	5.90±0.12	5.83±0.05	5.85±0.04	6.03±0.06	5.61±0.05	5.96±0.21	5.96±0.21	
10	5.92±0.00	6.00±0.07	6.39±0.25	5.89±0.10	6.29±0.28	5.87±0.16	6.38±0.18	6.00±0.07	6.35±0.16	6.35±0.16	
11	6.00±0.00 <sup>c</sup>	6.54±0.11 <sup>ab</sup>	6.56±0.16 <sup>ab</sup>	6.45±0.15 <sup>a</sup>	6.73±0.06 <sup>ab</sup>	6.38±0.25 <sup>ac</sup>	6.88±0.14 <sup>b</sup>	6.53±0.13 <sup>ab</sup>	6.55±0.04 <sup>ab</sup>	6.55±0.04 <sup>ab</sup>	

Dadas las características observadas en el segundo bioensayo, donde se obtuvo el porcentaje más alto de supervivencia larval en el tratamiento YC5-2 y el índice de desarrollo más alto en el tratamiento Mezcla (YC3-B y C2-2), se procedió a realizar un tercer cultivo larvario realizando la inoculación de una mezcla compuesta por las tres bacterias (YC3-B, C2-2 y YC5-2), así como un segundo tratamiento el cual consistió de el probiótico comercial Alibio, con nauplios no tratados como control, teniéndose una supervivencia final de 30.5, 23.5 y 32.8% para Mezcla, Alibio y control, respectivamente. El análisis estadístico realizado a los datos reflejó que no hay diferencias significativas entre el control y mezcla pero si entre Mezcla y Alibio ( $p < 0.05$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Porcentajes de supervivencia larvaria de *L. vannamei* inoculadas con las cepas candidatas a probióticos: Mix-2(●, Cepas C2-2, YC5-2 y YC3-b, 1:1:1) a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, Alibio (○) a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, y control (▼).

Las determinaciones del índice de desarrollo larvario del segundo bioensayo revelaron diferencias entre la mezcla (YC3-B, C2-2 y YC5-2) y ALIBIO con respecto al control. Las pruebas de comparación entre medias que se llevaron a cabo con los datos del Índice de desarrollo, confirmaron que hay diferencias significativas entre los dos

tratamientos y el control, teniendo un valor final de 7.00 para Mezcla y un valor de 6.35 y 5.76 para ALIBIO y Control, respectivamente. (Tabla XV).

**Tabla XV.** Índice de desarrollo de larvas de *L. vannamei* inoculadas con bacterias

<b>DÍA</b>	control	alibio	mezcla
1	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
2	1.98±0.04	2.00±0.00	2.00±0.57
3	2.00±0.00	2.04±0.04	2.18±0.36
4	2.63±0.32	2.71±0.34	2.92±0.09
5	3.00±0.06	2.99±0.07	3.25±0.21
6	3.23±0.34	3.52±0.13	3.72±0.33
7	3.74±0.42	3.88±0.29	4.11±0.14
8	3.82±0.45	4.14±0.19	4.46±0.07
9	4.81±0.69	4.83±0.53	5.22±0.06
10	5.63±0.43	5.40±0.36	5.65±0.37
11	5.93±0.13	6.04±0.39	6.27±0.87
12	5.76±0.38 <sup>a</sup>	6.35±0.22 <sup>b</sup>	7.00±0.14 <sup>c</sup>

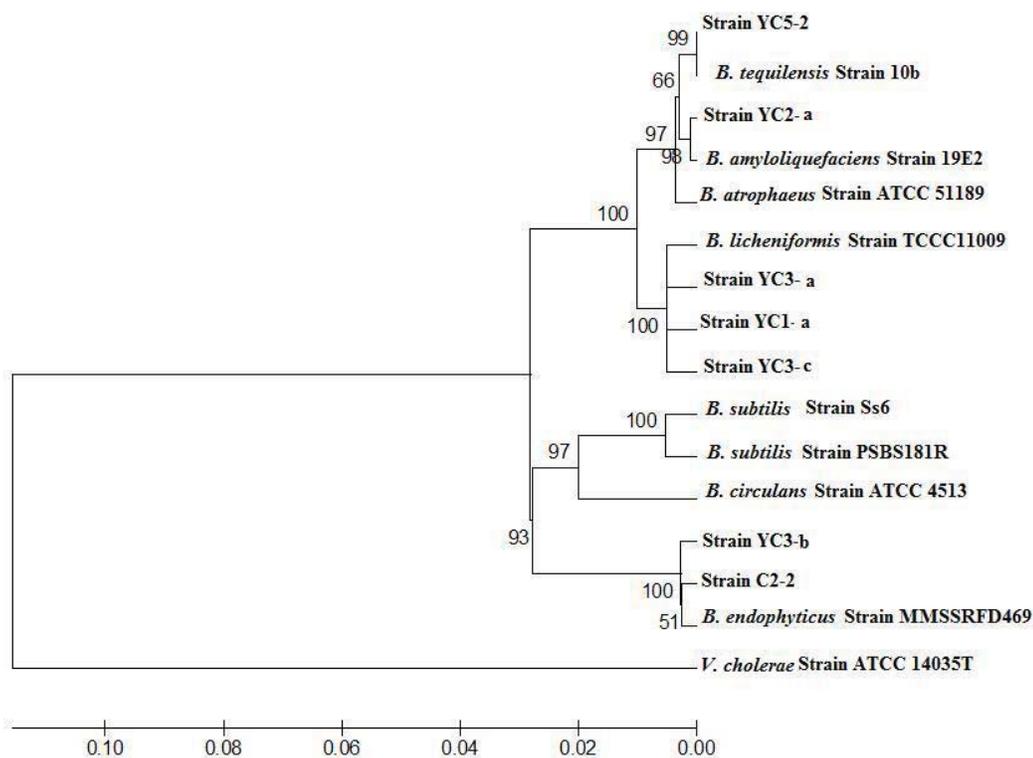
### 7.6. Identificación de las bacterias candidatas a probióticos.

La identificación fue realizada con la amplificación del gen 16S rRNA ( $\approx 1.5$  Kb fragmentado de ADN) de cada cepa por PCR con el uso de los primers universales pA y (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) y pH\* (5- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3), como fue descrito por Broda et al. (1999). Resultados de la identificación de las bacterias se muestran en la tabla XVI.

**Tabla XVI.** Identificación de bacterias seleccionadas con la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA.

Cepa	Similitud (%)	Especies
YC3-B	99.52	<i>Bacillus endophyticus</i>
C2-2	99.38	<i>Bacillus endophyticus</i>
YC5-2	99.91	<i>Bacillus tequilensis</i>
YC2-a	99.59	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
YC3-A	100.00	<i>Bacillus licheniformis</i>
YC1-A	99.00	<i>Bacillus licheniformis</i>
YC3-C	99.00	<i>Bacillus licheniformis</i>

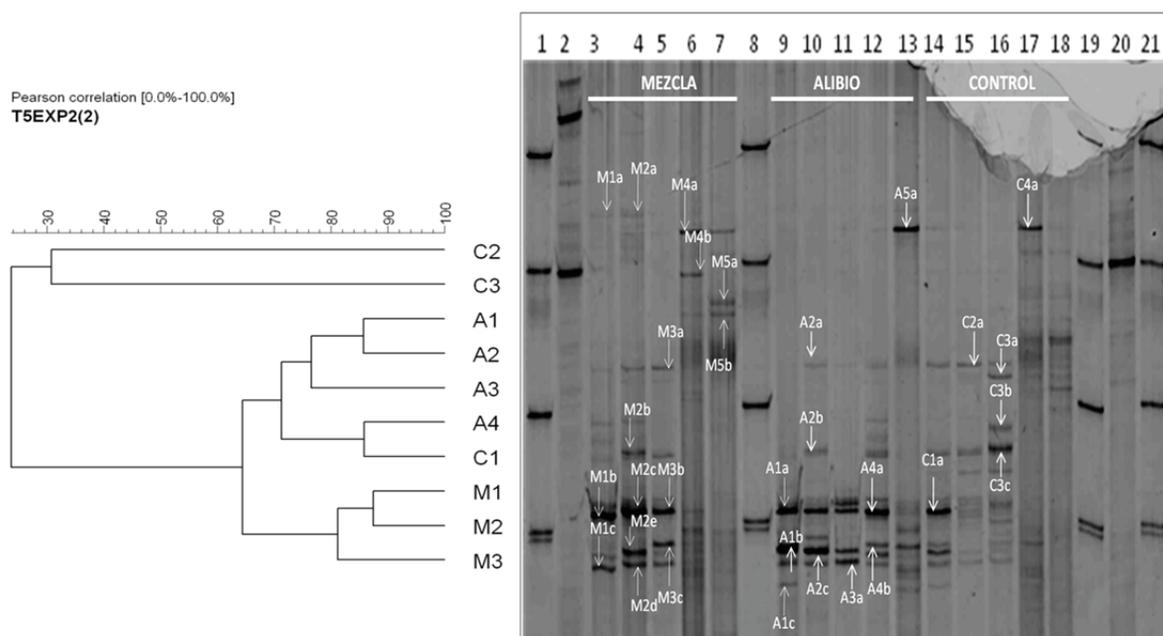
Identificación de las relaciones filogenéticas fueron inicialmente corridas en el programa BLAST (Altschul et al., 1997) y el programa megaBLAST (Zhang et al., 2000) contra la base de datos de cepas procariotas (Chun et al., 2007). Análisis de fragmentos amplificados de 1.5 kb mostraron del 98-100% de identidad a secuencias de especies de *Bacillus* previamente reportadas en base de datos (Fig. 15).



**Figura 15.** Árbol filogenético de cepas probióticas basado en las secuencias parciales del gen 16S rRNA contruidos con el método neighbor-joining del programa MEGA. Los números en los nodos representan el porcentaje de frecuencia con el cual una rama dada aparece en un análisis de “bootstrap” con 1000 replicas. *Vibrio cholerae* fue usado como “outgroup”. No se considero a las frecuencias cuyos valores estuvieron por abajo del 50%. La barra de escala corresponde a 0.1 substituciones por nucleótido.

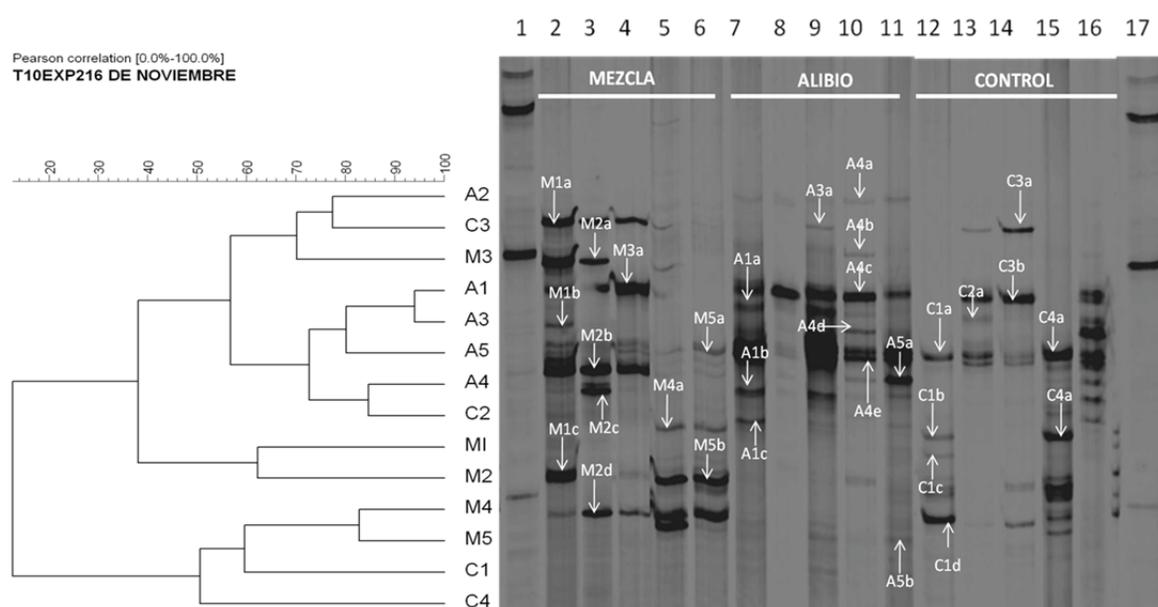
### 7.7 Efecto de probióticos en la modulación de la microbiota intestinal de juveniles de *L. vannamei*

Se generaron perfiles de bandeopara cada uno de los tiempos muestreados. El análisis de cluster UPGMA de estos perfiles para el tiempo 5, indicaron que las muestras de intestino de camarones tratados con *Bacillus* mix fueron similares entre sí al menos en un 81 %, y para el caso de Alibio fueron similares en un 71% (A1-A4), sin embargo ambos grupos solamente fueron similares en un 64.43%. Así mismo, ambos grupos *Bacillus* mix y Alibio tuvieron un porcentaje de similitud del 31% con respecto al grupo control (C2-C3), lo cual indica que el patrón de bandas de ambos tratamientos tiene diferencias significativas. (Figura 16).



**Figura 16.** Dendrograma obtenido al analizar los perfiles generados mediante SSCP de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de intestino del experimento 2 a los 5 días de inoculación. La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice. Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de intestino de camarón tratados con los probióticos. Mezcla de *Bacillus* sp.: carriles 3-7, probiótico comercial Alibio: carriles 9-13, control: carriles 14-18. Bacterias de referencia *B. licheniformis*, *R. trifoli*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter*: carriles 1, 18 y 21. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave.

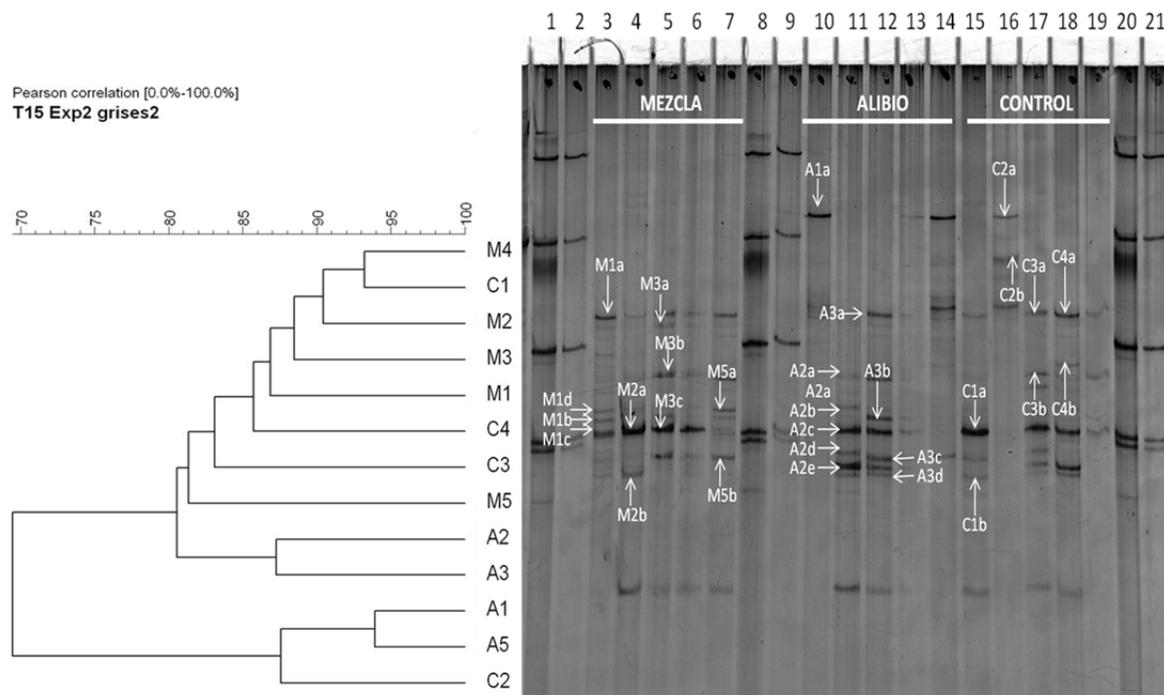
Las muestras de intestino a los 10 días de inoculación presento un patrón de bandeo distinto a la observada en el día 5, sin embargo, se sigue observando la misma tendencia de agrupamiento para cuatro de las 5 replicas, tanto para *Bacillus* mix como para Alibio presentado un porcentaje de similitud del 72.66% para A1-A5 y del 62.28% para M1-M2 y del 82.79% para M4-M5, en los controles se observó una distribución heterogénea teniendo un porcentaje de 50.56% para C1, C4 y de 77.35% de C3 con A2 y de 84.64% de C2 con A4 (Figura 17).



**Figura 17.** Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de intestino de camarón a los 10 días de inoculación con los probióticos y su análisis de agrupación. Mezcla de *Bacillus* sp.: carriles 2-6, probiótico comercial Alibio: carriles 7-11, muestras de intestino de camarón sin tratamiento (control): carriles 12-16. Bacterias de referencia *Bacillus endophyticus* (YC3-B), *Bacillus endophyticus* (C2-2), *Bacillus tequilensis* (YC5-2) carriles 1 y 17. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades de bacterias en intestino de camarones tratados con los diferentes probióticos. La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice.

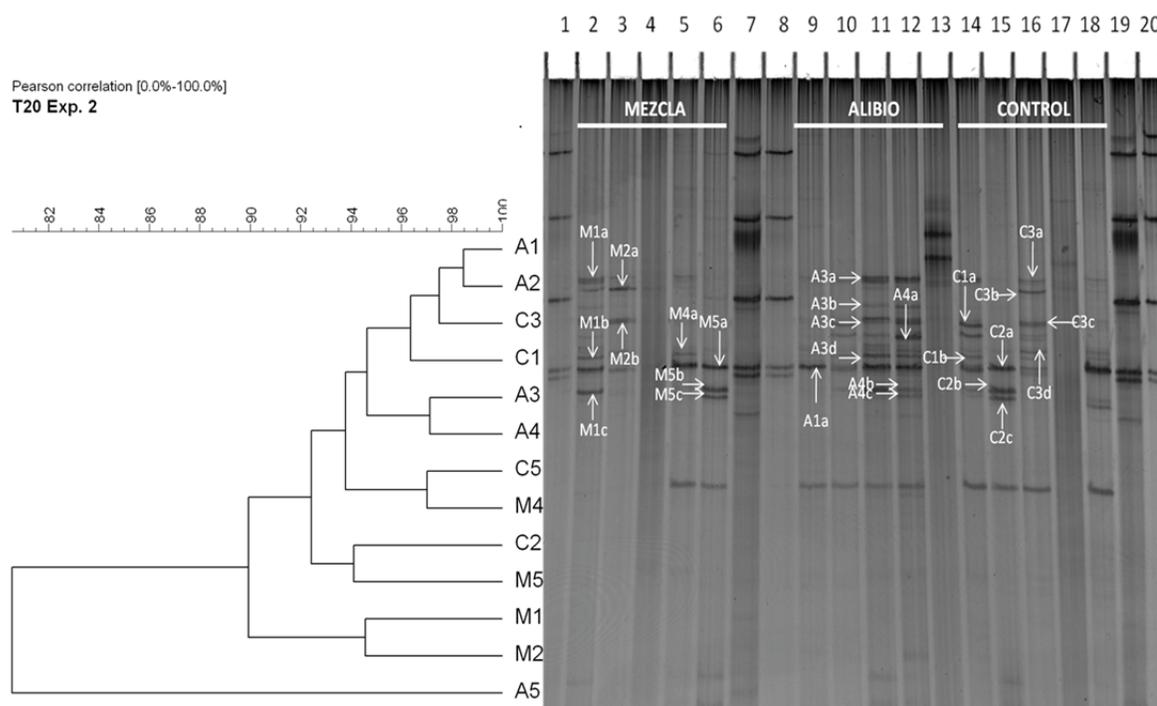
Para el tiempo 15, se observaron mayores porcentajes de similitud en comparación con los tiempos 5 y 10 y un comportamiento más homogéneo entre tratamientos,

presentando un valor para el tratamiento *Bacillus* mix de al menos 86.85% para M1, M3 y del 93.23% para M2-M4 y para el tratamiento Alibio de al menos 87.57% entre A2-A3 y del 93.93% para A1, A5, sin embargo, se presenta solo la formación de dos grupos con porcentajes de similitud del 69.43% (Figura 18).



**Figura 18.** Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de intestino de camarón a los 15 días de inoculación con los probióticos y su análisis de agrupación. Mezcla de *Bacillus* sp.: carriles 3-7, probiótico comercial Alibio: carriles 10-14, muestras de intestino de camarón sin tratamiento (control): carriles 15-19. Bacterias de referencia *B. licheniformis*, *R. trifoli*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter*: carriles 1, 2, 8, 9, 20 y 21. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades de bacterias en intestino de camarones tratados con los diferentes probióticos. La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice.

Porcentajes de similitud obtenidos al tiempo 20 indican que hay mayor similitud entre los tratamientos, obteniéndose 89.94% hasta el 98.47% (A1-A2), indicando un comportamiento más homogéneo entre los tratamientos no teniendo diferencias significativas (Figura 19).



**Figura 19.** Gel de SSCP de un fragmento del gen 16S ARNr de bacterias de intestino de camarón a los 20 días de inoculación con los probióticos y su análisis de agrupación. Mezcla de *Bacillus* sp.: carriles 2-6, probiótico comercial Alibio: carriles 9-13, muestras de intestino de camarón sin tratamiento (control): carriles 14-18. Bacterias de referencia *B. licheniformis*, *R. trifoli*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter*: carriles 1, 7 8, 19 y 20. Las bandas secuenciadas están indicadas con flecha y se muestra su respectiva clave. Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades de bacterias en intestino de camarones tratados con los diferentes probióticos. La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice.

### 7.8 Análisis de la composición de la microbiota intestinal durante la inoculación de los probióticos

Un total de 119 bandas fueron seleccionadas, secuenciadas e identificadas a partir de 4 geles de SSCP. Secuencias obtenidas presentaron ~99% de similitud con secuencias del gen 16S rRNA de diversas cepas bacterianas. Los resultados demuestran que la mayoría de las secuencias obtenidas a partir del gel de SSCP de las muestras de intestino de camarón a los 5 días de inoculación de los probióticos pertenecen a los grupos taxonómicos Flavobacteria, y  $\alpha$ -proteobacteria, siendo las bacterias *Wandonia haliotis* Haldis, y *Maribius salinus*, las especie más representativas en los tres tratamientos. La especie *Donglicola eburneuse* estuvo

presente solo en *Bacillus* mix y control. *Rhodovulum sulfidophilum* estuvo presente solo en el tratamiento Alibio y *Kordia algicida* y *Loktanella hongkongensis*, solo se presentaron en el control. Así mismo, cabe destacar la presencia de bandas únicas presentes en el tratamiento *Bacillus* mix que no pudieron ser identificadas (Uncultured bacterium).

Las secuencias obtenidas a los 10 días de inoculación de las bacterias probióticas pertenecen a los grupos taxonómicos Flavobacteria, Fusobacteria Alphaproteobacteria y con la aparición de la clase  $\gamma$ -proteobacteria. Para el tratamiento *Bacillus* mix se observó un aumento en el número de especies, con la aparición de bacterias que no se encontraban presentes a los 5 días como son: *Flavobacterium* sp. *Propionigenium maris*, *Sebaldella termitidis* *Thalassobius gelatinovor*. Para el tratamiento Alibio se observó la misma tendencia observándose una modulación de la microbiota con la disminución y/o desaparición de poblaciones (*Rhodovulum sulfidophilum* y *Maribius pelagicus*) y el aumento de nuevas poblaciones (*Thalassobius mediterraneus*, *Thiopfundum lithotrophica*, *Lutimaribacter saemakumensis*, *Donglicola eburneus*, *Tamlana crucinay* *Roseobacter* sp.). Para el control, se observó la pérdida de *Loktanella hongkongensis* y *Kordia algicida* las cuales fueron remplazadas por *Ruegeria lacuscaerilensis* y *Thiopfundum lithotrophica* (Tabla XVII).

Análisis de las secuencias al tiempo 15 indican que para el tratamiento *Bacillus* mix hubo una reducción en el número de familias, teniendo como resultado solo a los grupos taxonómicos  $\alpha$ -proteobacteria y Flavobacteria representadas por *Ruegeria lacuscaerulensis*, *Octadecabacter arcticus*, *Loktanella fryxellensis* y *Meridianimaribacter flavus*. Para el caso del tratamiento Alibio pasó todo lo contrario, hubo un incremento en los grupos taxonómicos con la aparición de Sphingobacteria y Fusobacteria. Para el grupo control casi no hubo variación solo con la aparición de *Shimia marina* y *Rhodovulum iodosum*(Tabla XVII).

Resultados demuestran que la mayoría de los morfotipos aislados a partir del gel de SSCP el tiempo 20, pertenecen a los grupo taxonómico  $\alpha$ ,  $\gamma$ -proteobacteria, Sphingobacteria, Flavobacteria para los tres tratamientos teniendo pocas variaciones, para el tratamiento *Bacillus* mix se tuvo la presencia del grupo taxonómico  $\gamma$ -proteobacteria, en comparación con Alibio que estuvo ausente para este tiempo, sin embargo se tuvo la

presencia del grupo Sphingobacteria, ambos grupos estuvieron ausentes en el tratamiento control (Tabla XVII).

*Maribius salinus* y *Donghicola eburneus* ( $\alpha$ -proteobacteria) y *Wandonia haliotis* (flavobacteria) se pueden considerar como bacterias comensales del tracto digestivo de juveniles de camarón debido a que estuvieron presentes en todos los tiempo y en todos los tratamientos (Tabla XVII).

**Tabla XVII.** Identificación parcial de secuencias individuales de los perfiles de SSCP de muestras de intestino de camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los probióticos (Mezcla y Alibio), M1-M5 (Mezcla de *Bacillus* sp.). A1-A5 (probiótico comercial Alibio), C1-C4 (camarones no tratados como control). a, b, c, d: posición de la banda en el carril. T5 (□), T10 (■) T15 (□) y T48 (■).

OTU	Similitud (%)	Identificación	Clasificación taxonomica
<b>T5</b>			
M1a	95.00	Uncultured bacterium clone	
M1b	90.16	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M1c	96.00	Uncultured bacterium clone	
M2a	90.39	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M2b	98.89	<i>Donghicola eburneus</i>	Alphaproteobacteria
M2c	90.19	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M2e	96.00	Uncultured bacterium clone	
M3a	98.62	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
M3b	90.16	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M3c	97.00	Uncultured bacterium clone	
M4a	90.63	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M5a	98.00	<i>Donghicola</i> sp.	Alphaproteobacteria
M5b	99.45	<i>Donghicola eburneus</i>	Alphaproteobacteria
A1a	90.68	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
A1b	83.00	Unidentified alpha proteobacterium	
A2a	84.06	<i>Maribius pelagius</i>	Alphaproteobacteria
A2b	90.25	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	Alphaproteobacteria
A2c	96.00	Uncultured bacterium clone	
A3a	90.00	Uncultured Fusobacteria bacterium	
A4a	90.66	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
A4b	94.00	Uncultured bacterium clone	
A5a	90.44	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
C1a	90.11	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
C2a	98.08	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria

C3a	97.24	<i>Loktanella hongkongensis</i>	Alphaproteobacteria
C3b	94.24	<i>Kordia algicida</i>	Flavobacteria
C3c	98.38	<i>Donghicola eburneus</i>	Alphaproteobacteria
C4a	90.43	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
<b>T10</b>			
M1a	90.83	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M1b	87.00	Flavobacterium sp.	Flavobacteria
M1c	97.00	Uncultured bacterium clone	
M2a	90.03	<i>Sebaldella termitidis</i>	Fusobacteria
M2b	96.00	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium	
M2c	92.00	<i>Propionigenium maris</i>	Fusobacteria
M2d	99.00	Uncultured bacterium clone	
M3a	99.00	<i>Donghicola</i> sp.	Alphaproteobacteria
M4a	95.00	Uncultured bacterium clone	
M5a	97.24	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
M5b	96.74	<i>Thalassobius gelatinovor</i>	Alphaproteobacteria
A1a	90.69	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
A1b	97.00	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	Alphaproteobacteria
A1c	94.70	<i>Thiopfundum lithotrophica</i>	Gammaproteobacteria
A3a	90.23	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
A4a	98.00	<i>Lutimaribacter saemankumensis</i>	Alphaproteobacteria
A4c	99.00	<i>Donghicola</i> sp.	Alphaproteobacteria
A4d	90.00	Uncultured bacterium clone	
A4e	89.00	Uncultured alpha proteobacterium	
A5a	99.17	<i>Tamlana crocina</i>	Flavobacteria
A5b	98.00	<i>Roseobacter</i> sp.	Alphaproteobacteria
C1a	98.35	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
C1b	93.00	Uncultured bacterium clone	
C1d	97.00	Uncultured bacterium clone	
C2a	98.06	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	Alphaproteobacteria
C3a	90.81	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
C3b	98.64	<i>Donghicola eburneus</i>	Alphaproteobacteria
C4a	94.52	<i>Thiopfundum lithotrophica</i>	Gammaproteobacteria
<b>T15</b>			
M1a	98.09	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
M1b	98.11	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	Alphaproteobacteria
M1c	89.14	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M1d	97.81	<i>Lutimaribacter saemankumensis</i>	Alphaproteobacteria
M1e	96.19	<i>Octadecabacter arcticus</i>	Alphaproteobacteria
M2a	90.16	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M2b	98.00	Uncultured bacterium clone	
M3a	97.27	<i>Loktanella fryxellensis</i>	Alphaproteobacteria
M3b	99.18	<i>Donghicola eburneus</i>	Alphaproteobacteria

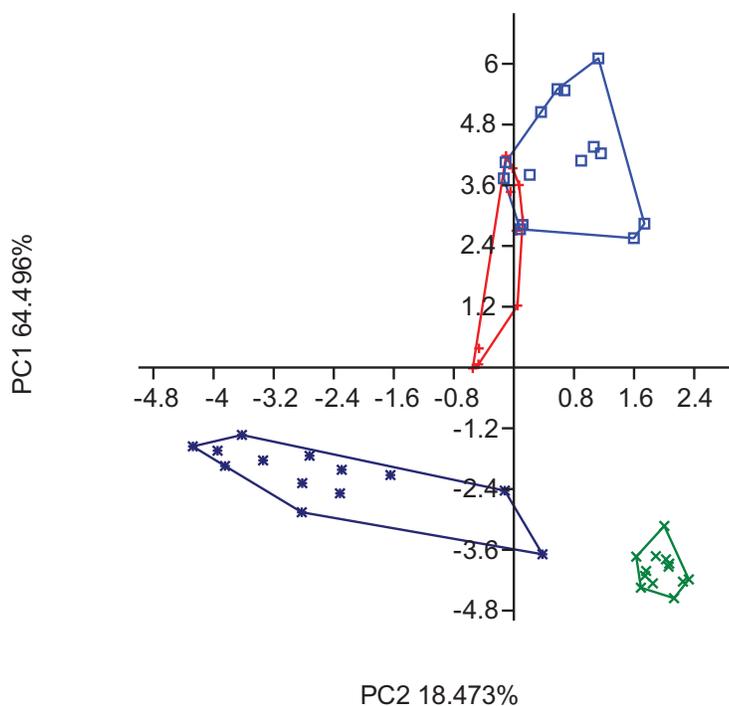
M3c	90.44	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M5a	95.62	<i>Meridianimaribacter flavus</i>	Flavobacteria
M5b	97.00	Uncultured bacterium clone	
A1a	94.00	Uncultured bacterium clone	
A2c	90.19	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
A2e	94.00	<i>Cytophaga</i> sp.	Sphingobacteria
A3a	95.12	<i>Thiopfundum lithotrophica</i>	Gammaproteobacteria
A3b	98.38	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	Alphaproteobacteria
A3c	97.00	Uncultured bacterium clone	
A3d	90.00	Uncultured <i>fusobacteria</i> clone	
C1a	94.00	Uncultured bacterium clone	
C1b	97.00	Uncultured bacterium clone	
C2a	95.00	Uncultured bacterium clone	
C2b	99.19	<i>Shimia marina</i>	Alphaproteobacteria
C3a	96.17	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
C3b	95.00	Uncultured bacterium clone	
C4a	97.02	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
C4b	96.13	<i>Rhodovulum iodosum</i>	Alphaproteobacteria

**T20**

M1a	95.41	<i>Thiopfundum lithotrophica</i>	Gammaproteobacteria
M1b	96.64	<i>Nautella italica</i>	Alphaproteobacteria
M2a	96.99	<i>Loktanella hongkongensis</i>	Alphaproteobacteria
M2b	98.36	<i>Donghicola eburneus</i>	Alphaproteobacteria
M5a	90.44	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
M5b	97.00	Uncultured bacterium clone	
A1a	90.81	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
A3a	95.11	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
A3b	96.73	<i>Celeribacter neptunius</i>	Alphaproteobacteria
A3c	92.00	Uncultured bacterium clone	Sphingobacteria
A3d	98.63	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	Alphaproteobacteria
A4a	97.81	<i>Tamlana crocina</i>	Flavobacteria
A4b	97.00	Uncultured bacterium clone	
A4c	91.00	<i>Tamlana agarivorans</i>	Flavobacteria
C1a	99.18	<i>Tamlana crocina</i>	Flavobacteria
C1b	98.37	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	Alphaproteobacteria
C2a	90.53	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis-1	Flavobacteria
C2b	97.00	Uncultured bacterium clone	
C2c	95.00	Uncultured bacterium clone	
C3a	98.64	<i>Maribius salinus</i>	Alphaproteobacteria
C3b	97.57	<i>Loktanella hongkongensis</i>	Alphaproteobacteria
C3c	99.45	<i>Donghicola eburneus</i>	Alphaproteobacteria
C3d	94.50	<i>Meridianimaribacter flavus</i>	Flavobacteria

### 7.9 Análisis componentes principales de geles de SSCP antes del reto

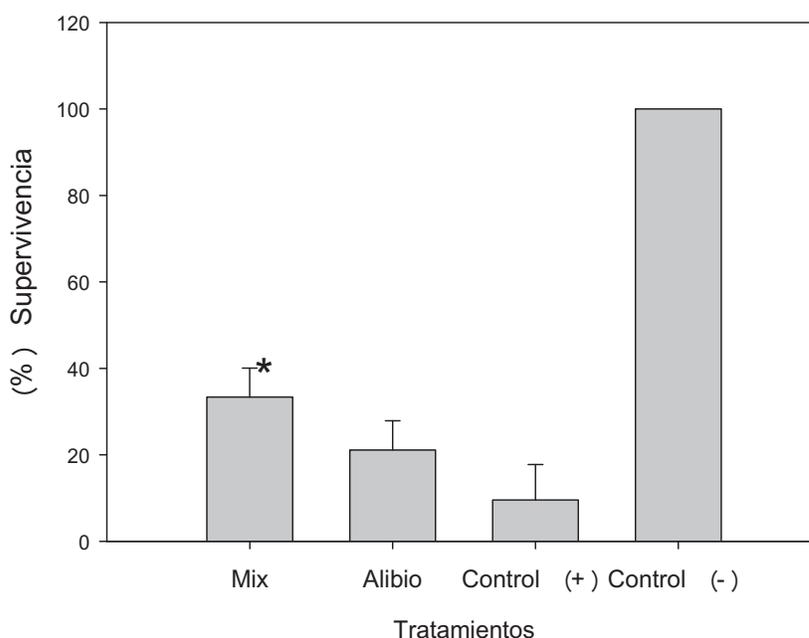
El análisis multivariado de componentes principales permitió una ordenación y simplificación de las variables originales. Se generaron dos componentes que explican el 82.97% del total de varianza en los datos (PC1:64.966% y PC2:18.473%) (Figura 20). El análisis de componentes arrojó las cargas factoriales de los dos componentes principales y fueron considerados significativos aquellos valores mayores a 0.70. Diferencias significativas en la comunidad bacteriana a los 5, 10, 15 y 20 días fueron observadas en el análisis de PCA, indicando una modulación de la microbiota con respecto al tiempo.



**Figura 20.** Análisis de componentes principales (PCA) usando Correlación de Pearson de los perfiles de bandeo generados a partir de los geles de SSCP asociados con las muestra de intestino del camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los tratamientos en cada uno de los tiempo día 5 (+), día 10 (□), día 15 (×), y día 20 (\*). Cada punto representa un perfil de SSCP de un solo camarón.

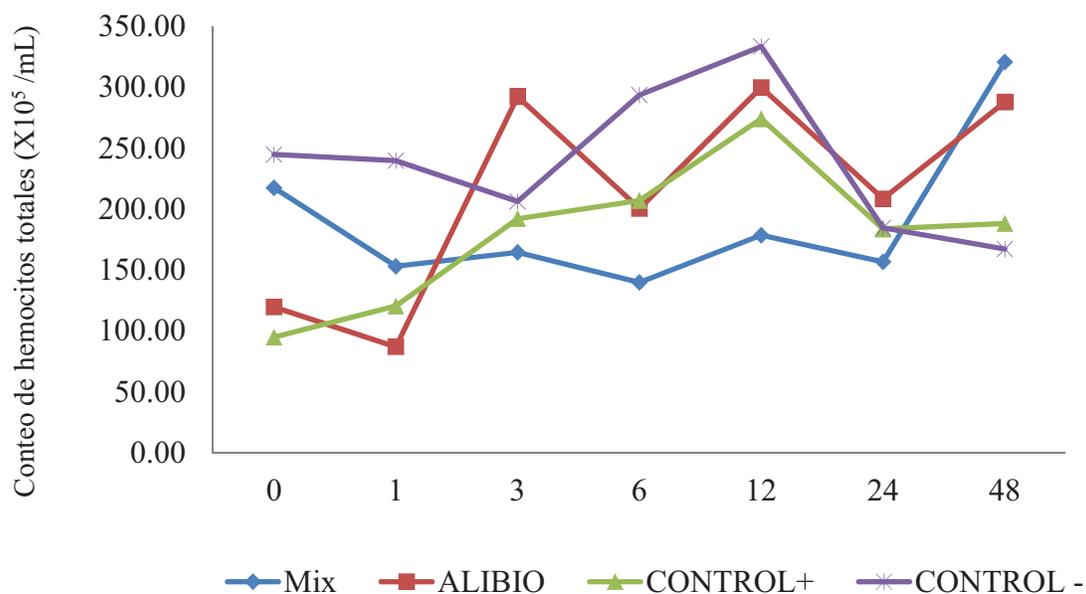
### 7.10 Prueba reto (*Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170)

Juveniles de *L. vannamei* fueron inoculados durante 20 días con cepas probióticas de *Bacillus* (Mezcla: YC5-2, C2-2 y YC3-B), un probiótico comercial (Alibio) y organismos sin tratar como control, después de 168h fueron retados contra *Vibrio parahaemolyticus*. La supervivencia final de los camarones tratados con *Bacillus* mix fue mayor a la presentada por el probiótico comercial y el control positivo (camarones no tratados y retados), presentando un porcentaje de 33.3, 21.1 y 9.5% para Mezcla (YC5-2, C2-2 y YC3-B), Alibio (probiótico comercial) y control +, respectivamente (Figura 21).



**Figura 21.** Supervivencia de juveniles de *L. vannamei* retados con *Vibrio parahaemolyticus* a las 48h de la infección: *Bacillus* mix (Mix), Probiótico comercial (ALIBIO), Camarones no tratados e infectados con *V. parahaemolyticus* (CONTROL +), Camarones no tratados e inyectados con sol. Salina 0.9% (CONTROL -). \* Diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ )

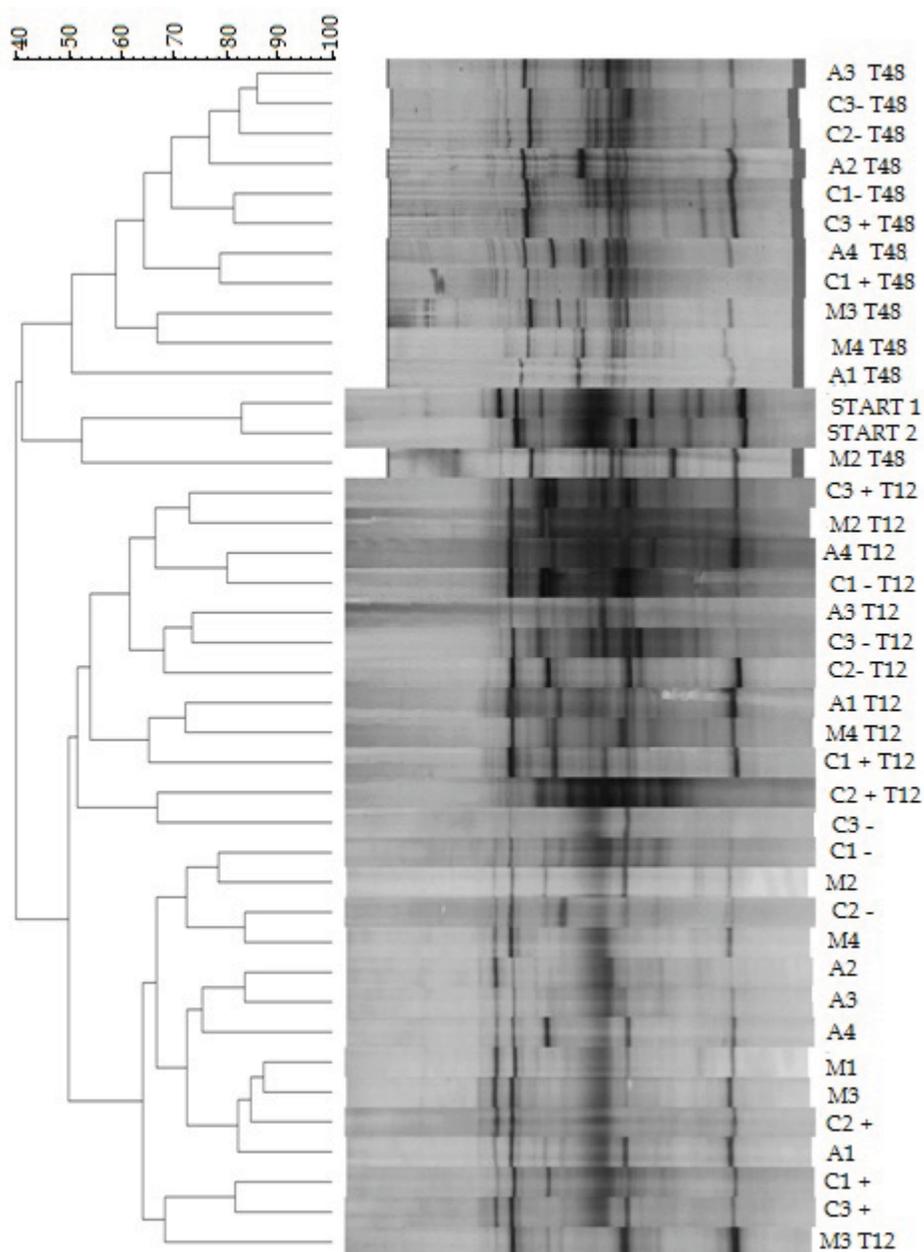
El conteo de hemocitos circulantes mostro la misma tendencia para los dos tratamientos, después de 48h, el conteo de hemocitos de los camarones tratados con la mezcla de *Bacillus* fue mayor que los otros tratamientos, presentando 320.6, 287.8, 188.1 y 167.3 x 10<sup>5</sup>/mL hemocitos para Mezcla, Alibio, control (+) y control (-), respectivamente (Figura 22).



**Figura 22.** Conteo de hemocitos circulantes de juveniles de *L. vannamei* retados con *Vibrio parahaemolyticus*. *Bacillus mix* (Mix), Probiotico comercial (ALIBIO), Camarones no tratados e infectados con *V. parahaemolyticus* (CONTROL +), Camarones no tratados e infectados con sol. Salina 0.9% (CONTROL -).

### **7.11 Efecto de *V. parahamolyticus* en la modulación de la microbiota intestinal**

Para la identificación de la microbiota asociada al tracto digestivo de camarones adultos de *L. vannamei* durante una infección bacteriana causada por *V. parahaemolyticus* se utilizó la técnica SSCP. Se realizó un dendograma con los perfiles de bandeo generados a partir de 3 geles de SSCP, se observó una clara modulación de la microbiota intestinal a las 12h post-infección (inicio de mortalidades) hasta las 48 h (organismos recuperados), dividiéndose en dos cluster presentando un valor de 40.81% de similitud a las 48 h con respecto al cluster que incluye al tiempo 0 y 12 h. Así mismo, el cluster conformado por el tiempo 0 y tiempo 12 tuvieron un porcentaje de similitud entre sí del 49.64%. Las muestras de inicio (inicio 1 e inicio 2) se presentaron dentro del mismo cluster que el tiempo 48 con un 54% de similitud con respecto al tiempo 48; indicando una recuperación de la microbiota parecida a la inicial del bioensayo (Figura 23).



**Figura 23.** Análisis de agrupación de perfiles de SSCP de comunidades bacterianas en el intestino de juveniles de *L. vannamei* a las 12 h de ser retados contra *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170 (tiempo 12). La escala del dendrograma representa el porcentaje de similitud entre clusters, calculado por el método UPGMA con coeficiente Dice.

### 7.12 Análisis de la composición de la microbiota intestinal durante la infección con la bacteria patógena *Vibrio parahaemolyticus*

Los resultados demuestran que la mayoría de las secuencias obtenidas a partir de los geles de SSCP de las muestras de intestino de camarón antes y durante la infección pertenecen a los grupos taxonómicos Flavobacteria,  $\alpha,\gamma$ -proteobacteria, cytophagia y fusobacteriasiendo las bacterias *Wandonia haliotis* Haldis y *Rugeria lacuscaerulensis* las especies más representativas en los tres tratamientos durante la infección. La especie *Cytophaga fermentans* solo estuvo presente en los organismos previamente tratados con Alibio y *Photobacterium damsela* subs. *Piscicida* estuvo presente solo en *Bacillus* mix, Alibio, control negativo. Así mismo, cabe destacar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en control positivo, Control negativo y Alibio. Así como bandas únicas presentes en el tratamiento *Bacillus* mix que no pudieron ser identificadas (Uncultured bacterium) y la presencia de las bacterias *Nautella itálica* y *Candidatus bacilluplasma mollicute* (Tabla XVIII).

*Maribius salinus* y *Donghicola eburneus* ( $\alpha$ -proteobacteria) solo fueron detectadas en *Bacillus* mix y control positivo. *Wandonia haliotis* Haldis se puede seguir considerando como bacteria comensal del tracto digestivo de juveniles de camarón debido a que estuvieron presentes en todos los tiempos y en todos los tratamientos (Tabla XVIII). Así como especies únicas en control negativo como son: *Thiopfundum lithotrophica*, *Sebaldella termitidis*, *Elizabethkingia anophelis*, *Oceanicola* sp. y *Thioclava pacifica*. De igual forma el género *Thalassobium* sp. solo fue detectado en ambos controles.

**Tabla XVIII.** Identificación parcial de secuencias individuales de los perfiles de SSCP de muestras de intestino de camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los probióticos y retados contra *V. parahaemolyticus*, M1-M3 (Mezcla de *Bacillus* sp.). A1-A4 (probiótico comercial Alibio), C1(-)-C3(-): camarones no tratados e inyectados con solución salina como control negativo; C1(+)-C3(+): camarones no tratados y retados. a,b,c,d: posición de la banda en el carril. T0 (□), T12 (□) y T48 (□).

OTU	% Similitud	Identificación	Posición taxonómica
<b>Bacillus mix</b>			
<b>T0</b>			
M1b	96%	<i>Nautella itálica</i>	$\alpha$ -proteobacteria
M1d	90%	Candidatus bacilloplasma mollicute	
M1c	90%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	Flavobacteria
M2a	95%	<i>Maribius salinus</i>	$\alpha$ -proteobacteria
M2b	98%	<i>Donghicola eburneus</i>	$\alpha$ -proteobacteria
<b>T12</b>			
M2a	84%	Uncultured bacterium clone	
M3a	97%	Flavobacteriaceae bacterium	
M3b	97%	Flavobacteriaceae bacterium	
M3c	97%	Flavobacteriaceae bacterium	
		Photobacterium damsela subsp.	$\gamma$ - proteobacteria
M3d	97%	Piscicida	
<b>T48</b>			
M2a	94%	<i>Thalassobius gelatinovor</i>	$\alpha$ -proteobacteria
M2c	93%	<i>Planktotalea frisia</i>	$\alpha$ -proteobacteria
M2d	98%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
M2h	99%	Unidentified alpha proteobacterium	
M2i	99%	Uncultured bacterium clone	
<b>ALIBIO</b>			
<b>T0</b>			
A1a	90%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	flavobacteria
A1c	90%	<i>Cytophaga fermentans</i>	Cytophagia
A1d	90%	<i>Sebaldella termitidis</i>	
A4a	90%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	Flavobacteria
A4b	90%	<i>Cytophaga fermentans</i>	Cytophagia
		<i>Photobacterium damsela</i> subsp.	$\gamma$ -proteobacteria
A4c	96%	Piscicida	
<b>T12</b>			
A1a	97%	Flavobacteriaceae bacterium	
A1b	96%	Flavobacteriaceae bacterium	

A1c	89%	Uncultured bacterium clone	<i>Cytophaga</i>
A1d	90%	<i>Cytophaga fermentans</i>	
A1e	97%	Flavobacteriaceae bacterium <i>Photobacterium damsela</i> subsp.	$\gamma$ -proteobacteria
A1f	98%	Piscicida	
A1g	89%	Uncultured bacterium clone	
A1i	90%	Uncultured bacterium	
A1j	87%	<i>Vibrio furnissii</i>	$\gamma$ -proteobacteria
A3a	85%	Desulfovibrionaceae bacterium	<i>Flavobacteria</i>
A3b	93%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	
A3c	98%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
A4a	90%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	<i>Flavobacteria</i>

**T48**

A1b	92%	Flavobacteriaceae bacterium	
A2a	90%	<i>Paracoccus versatus</i>	
A2b	82%	<i>Vibrio</i> sp.	$\gamma$ -proteobacteria
A2c	91%	Uncultured bacterium clone	$\alpha$ -proteobacteria
A2d	100%	<i>Donglicola eburneus</i>	
A3b	90%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	<i>Flavobacteria</i>
A3c	92%	Flavobacteriaceae bacterium	$\alpha$ -proteobacteria
A3d	98%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	
A3e	98%	Uncultured bacterium clone	

**CONTROL NEGATIVO****T0**

C2b(-)	97%	Flavobacteriaceae bacterium	$\gamma$ -proteobacteria
C2c(-)	99%	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. Piscicida	

**T12(-)**

C1a(-)	89%	Flavobacteriaceae bacterium	<i>Flavobacteria</i>
C1b(-)	85%	Alpha proteobacterium	
C2a(-)	91%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	<i>Fusobacteria</i>
C2b(-)	97%	Flavobacteriaceae bacterium	
C2c(-)	89%	<i>Sebaldella termitidis</i>	<i>Flavobacteria</i>
C2f(-)	96%	Uncultured bacterium clone	
C2g(-)	89%	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C3a(-)	99%	<i>Thalassobius</i> sp.	
C3b(-)	93%	<i>Thiopfundum lithotrophica</i>	$\gamma$ -proteobacteria
C3c(-)	97%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C3f(-)	91%	Uncultured bacterium clone	

**T48(-)**

C1a(-)	92%	<i>Vibrio mediterrani</i>	$\gamma$ -proteobacteria
--------	-----	---------------------------	--------------------------

C1b(-)	98%	<i>Ruegeria lacuscaerilensis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C1c(-)	99%	Uncultured bacterium clone	
C2a(-)	95%	<i>Oceanicola</i> sp.	$\alpha$ -proteobacteria
C2b(-)	91%	Flavobacteriaceae bacterium	
C2c(-)	97%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	
C2d(-)	92%	<i>Vibrio</i> sp.	$\gamma$ -proteobacteria
C2e(-)	97%	Uncultured bacterium clone	
C3a(-)	97%	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C3b(-)	92%	<i>Thioclava pacifica</i>	
C3c(-)	97%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C3d(-)	87%	Uncultured bacterium clone	

### CONTROL POSITIVO

#### T0

C2c	99%	Uncultured bacterium clone	
C3b	97%	Uncultured bacterium clone	
C3c	94%	Flavobacteriaceae bacterium	

#### T12

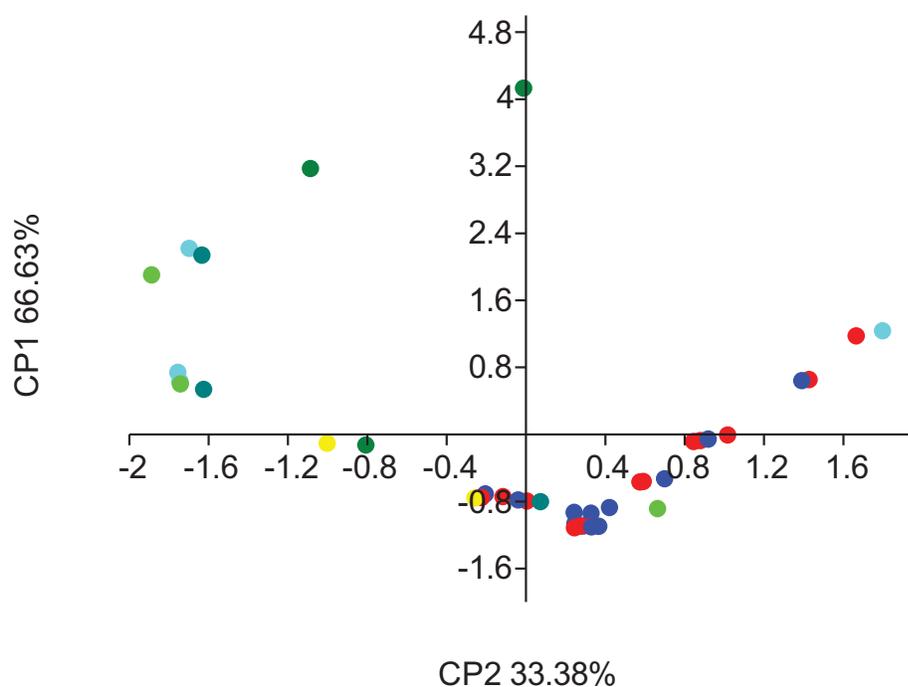
C1a	90%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	Flavobacteria
C1b	97%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C1c	87%	Uncultured bacterium clone	
C1d	97%	<i>Maribius salinus</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C2a	93%	Uncultured bacterium clone	
C2b	87%	Uncultured bacterium clone	
C2c	95%	<i>Thalassobius</i> sp.	$\alpha$ -proteobacteria
C3a	87%	Uncultured bacterium clone	
C3b	88%	Uncultured bacterium clone	
C3c	90%	<i>Donghicola eburneus</i>	$\alpha$ -proteobacteria

#### T48

C2a	91%	uncultured bacterium clone	
C2b	100%	<i>Donghicola</i> sp.	$\alpha$ -proteobacteria
C2c	87%	uncultured bacterium clone	
C3a	98%	uncultured bacterium clone	
C3b	90%	<i>Wandonia haliotis</i> Haldis	Flavobacteria
C3c	98%	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	$\alpha$ -proteobacteria
C3d	98%	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	$\gamma$ -proteobacteria
C3e	92%	<i>Vibrio</i> sp.	$\gamma$ -proteobacteria
C3h	99%	uncultured bacterium clone	

### 7.13 Análisis componentes principales de geles de SSCP después del reto

El análisis multivariado de componentes principales permitió una ordenación y simplificación de las variables originales. Se generaron dos componentes que explican el 100% del total de varianza en los datos (CP 1:66.63% y CP2:33.38%) (Figura 24). El análisis de componentes arrojó las cargas factoriales de los dos componentes principales y fueron considerados significativos aquellos valores mayores a 0.70. No se determinaron diferencias significativas entre los tiempo 0 y 12h en los perfiles de bandeo, sin embargo es clara la tendencia a separarse los tiempos 0 y 12h de las 48h, resultados similares a los obtenidos en el dendograma de similitud, indicando una modulación de la microbiota a las 48h.



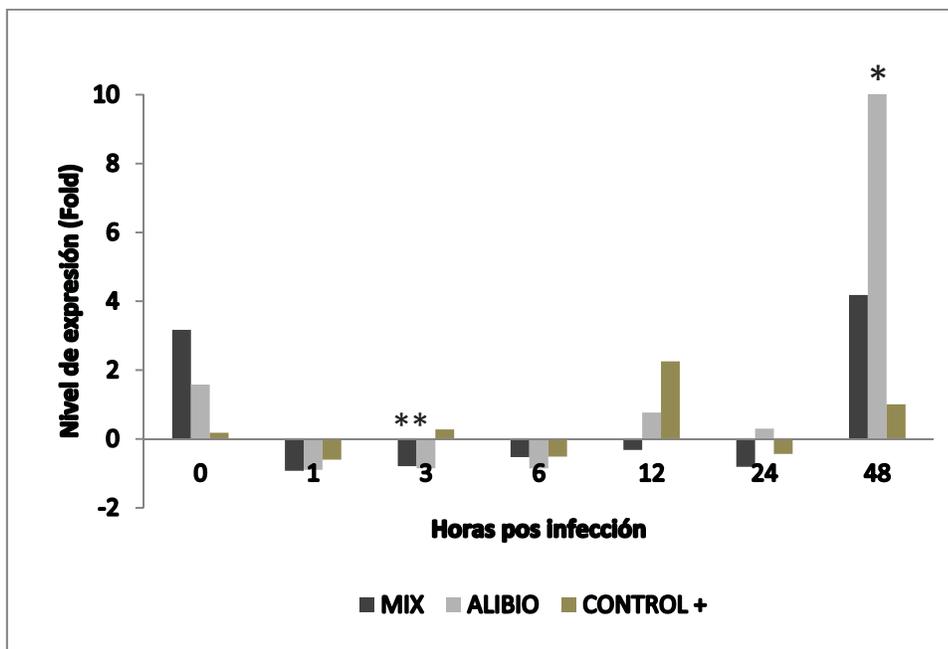
**Figura 24.** Análisis de componentes principales (PCA) usando coeficiente Dice de los perfiles de bandeo generados a partir de los geles de SSCP asociados con las muestra de intestino del camarón blanco *L. vannamei* inoculados con los tratamientos y retos contra *V. parahaemolyticus* en cada uno de los tiempo: Tiempo 0 (■), 12 h (■), 48 h (*Bacillus* mix:■), Alibio (■), control + (■) y control negativo (■). Cada punto representa un perfil de SSCP de un solo camarón.

#### **7.14 Efecto de probióticos en la respuesta inmune del camarón blanco expuesto a *V. parahaemolyticus***

Para determinar el efecto protector de los probióticos a camarones infectados con *V. parahaemolyticus* se llevaron a cabo PCRq de varios genes implicados en respuesta inmune (PE, Pen2, PAP, CP, ProPO, Lyso, BGLP). Los resultados se muestran como la relación entre la expresión de cada uno de los genes analizados con respecto a la expresión de la media geométrica de los genes  $\beta$ -actina y L8, que actuaron como genes de referencia y normalizados con respecto al control negativo (sin tratamiento y no infectados).

##### **7.14.1 Peroxinectina (PE)**

El PCR cuantitativo del gen Peroxinectina mostró que los tratamientos Alibio y *Bacillus Mix* incrementan los niveles de expresión del gen a las 48h de la inyección con *V. parahaemolyticus*. Los niveles de expresión del gen en camarones tratados con *Bacillus mix*, Alibio y control (+) fue de 4.17, 20.98 y 1, respectivamente (Figura 25). En cuanto al análisis de la expresión de PE, se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) al tiempo 3 con una sub expresión del transcrito para los tratamiento MIX y Alibio; Al final del experimento (48h) se dió un aumento en los niveles de expresión del gen para los dos tratamientos y el control (Figura 25). La sobreexpresión de Peroxinectina es considerada por ser asociada con un incremento en la encapsulación y actividad de fagocitosis para incrementar la resistencia contra un patógeno (Kobayashi et al., 1990). Peroxinectina (PE) es una proteína asociada del sistema proPO, es sintetizada y almacenada en los hemocitos gradulares y semigranulares en su forma inactiva y es liberada en respuesta a un estímulo, se activa afuera de las células para mediar el apego y propagación de hemocitos (Johansson et al., 1988, Liang et al., 1992).



**Figura 25.** Niveles de expresión del gen Peroxinectina (PE). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-). \*Diferencia significativa.

#### 7.14.2 Penaeidina 2 (PEN 2)

En cuanto al análisis de expresión del gen Penaeidina 2 (PEN 2) en camarones tratados con los probióticos y retados con *V. parahaemolyticus*, se observó un aumento en los niveles de expresión para *Bacillus mix* y Alibio durante las tres primeras horas pos infección, con un decremento a partir de las 6 h hasta el final del bioensayo. Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) fueron observadas entre *Bacillus mix*, Alibio y control +, con valores 7.99, 3.333 y 2.45, respectivamente (Figura 26).

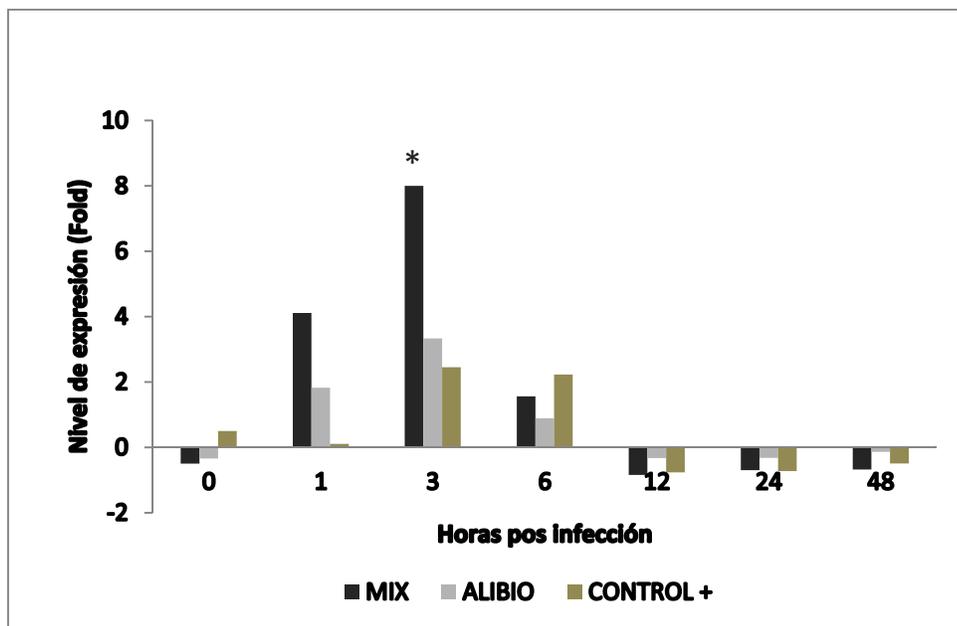


Figura 26. Niveles de expresión del gen PEN 2 (Penaeidina 2). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-). \*Diferencia significativa.

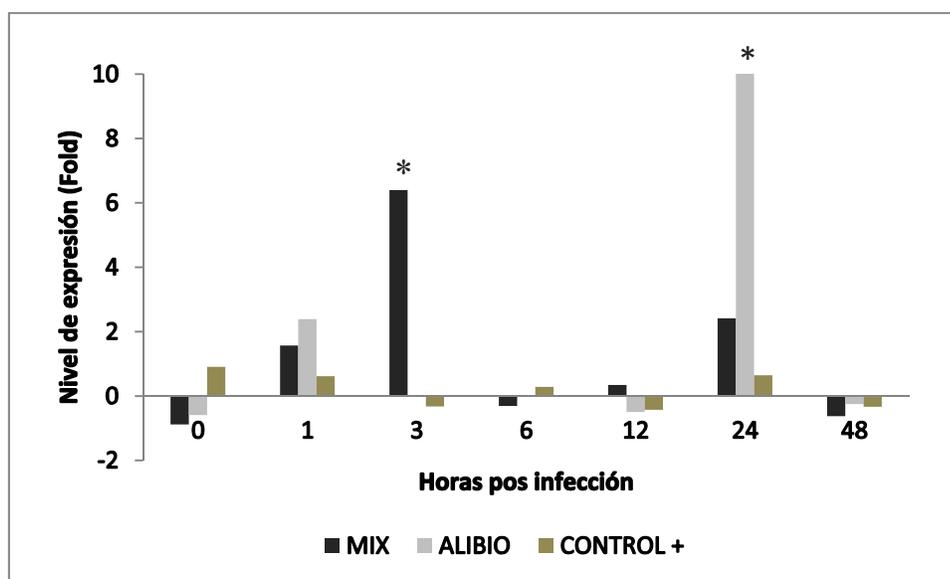
Penaeidinas son una familia de péptidos antimicrobianos (AMPs) que son encontrados solo en camarones penaeidos. Se divide en tres subfamilias (PEN2, PEN3, y PEN4), de las cuales son distribuidas de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y a la presencia de varios motifs (Barchere et al., 2004; de Lorgeril et al., 2008).

Se ha demostrado que peneidinas presentan actividad antibacteriana y antifúngica (Destoumieux et al., 1999). Diversos autores han sugerido que peneidinas no presentan ningún efecto en bacterias gram-negativas tales como las Vibrionaceae (Destoumieux et al., 1999). Sin embargo en nuestros resultados PEN2 fue significativamente sobre expresado después de la inyección con *V. parahemolyticus* durante las primeras horas del reto bacteriano.

#### 7.14.3 Proteína activadora de la fagocitosis (PAP)

El PCR cuantitativo del gen PAP mostró que los tratamientos *Bacillus mix* y *Alibio* incrementan los niveles de expresión. Se observó un incremento en los niveles de expresión a partir de la primera hora después de haber sido inyectados, teniéndose el mayor nivel de

expresión a las 3h para los camarones tratados con *Bacillus mix* (6.39) comparado con Alibio (0.033) y control + (0.32). Para el caso del tratamiento Alibio el nivel más alto de expresión fue observado a las 24h con un valor de 14.06 comparado con *Bacillus mix* de 2.41 y control + de 0.64 (Fig. 4) ( $P < 0.05$ ) (Figura 27).

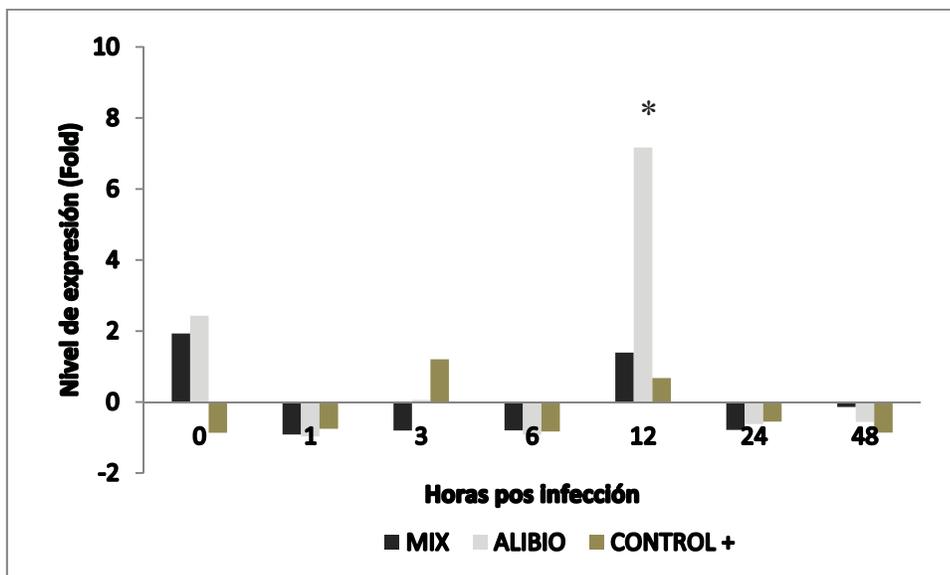


**Figura 27.** Niveles de expresión del gen PAP (Proteína activadora de la fagocitosis). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-). \* Diferencia significativa.

#### 7.14.4 Clotting protein (CP)

Coagulación es un mecanismo de defensa esencial en crustáceos, los cuales atrapan material extraño y previene pérdida de hemolinfa (Martin et al., 1991). La proteína que constituye la coagulación tuvo que ser nombrada Clotting protein (CP) (Kopacek et al., 1993) y la proteína que inicia el proceso de coagulación es la Transglutaminasa (TGase).

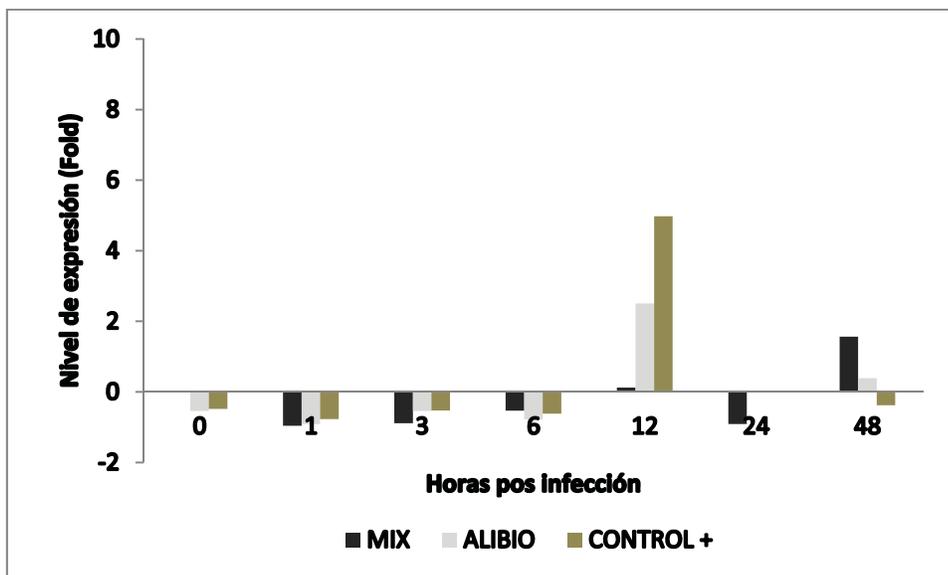
Niveles de expresión del gen CP fue significativamente mayor en Alibio (7.16) comparado a *Bacillus mix* (1.39) y control + (0.67) a las 12h post-inyección con *V. parahamolyticus*. Se observó una sub expresión a la 1, 3, 6, 24 y 48h post-inyección (Fig. 28). Cabe destacar que la mayor mortalidad durante el reto fue observada a las 12 h.



**Figura 28.** Niveles de expresión del gen CP (Clotting protein). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-). \* Diferencia significativa.

#### 7.14.5 Profenoloxidasa (proPO)

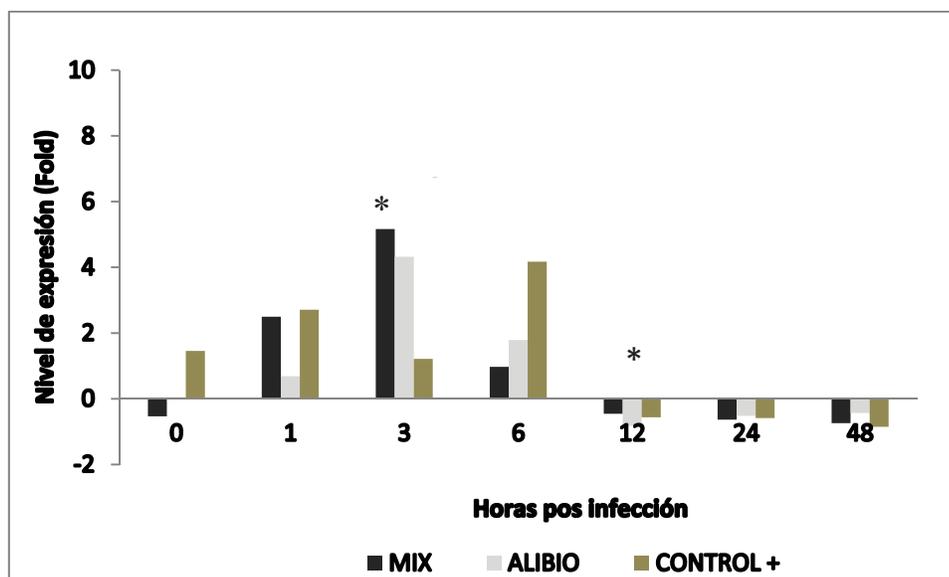
Para el gen profenoloxidasa ambos tratamientos (Mix y Alibio) presentaron una expresión muy baja sin que se encontraran diferencias significativas. Sin embargo, aunque estadísticamente no se reflejaron diferencia, es importante notar la tendencia que muestra su perfil de expresión a las 12 y 48h post-inyección con un aumento en el nivel de expresión (Fig. 29). El pico más alto de mortalidad fue a las 12h pos infección.



**Figura29.** Niveles de expresión del gen proPO (Profenoloxidasa). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-).

#### 7.14.6 Lysozima (Lyso)

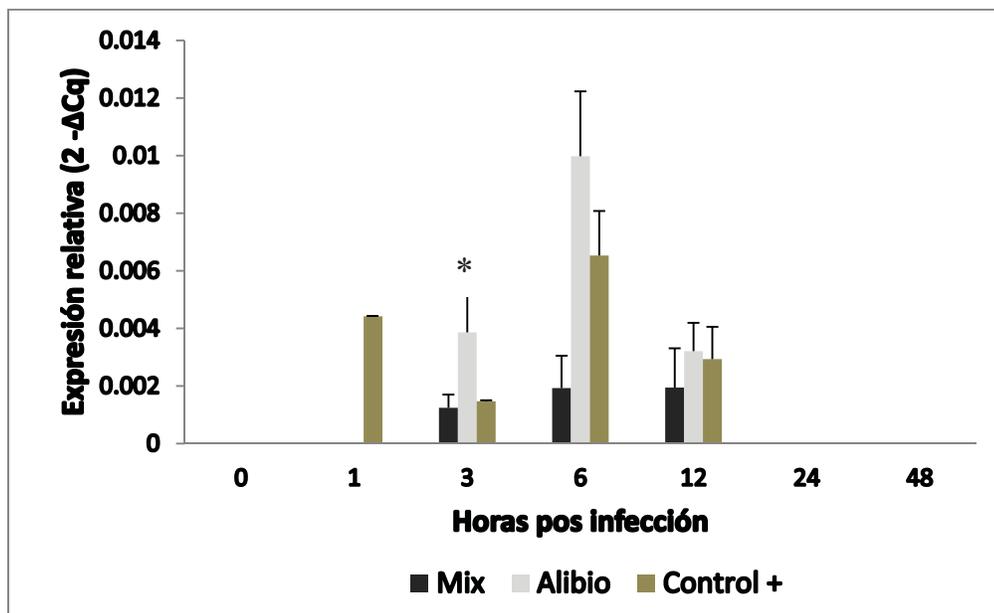
Resultados obtenidos para Lysozima reflejaron un aumento en los niveles de expresión del gen a las 3, 6 y 12h. Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) fueron observadas para el tratamiento Mix teniéndose el pico más alto en el nivel de expresión a las 3h (5.16) comparado con Alibio (4.323) y control + (1.12) (Fig. 30). Estos resultados son consistentes con reportes previos donde se ha evidencias el incremento en la expresión del transcrito después de ser retados con Vibrios (*V. campbelli* y *V. alginolyticus* en *L. vannamei* y *F. merguensis*) (Burge et al., 2007; Mai et al., 2009). Lysozima hidroliza los enlaces  $\beta$ -glycosidicos de peptidoglicanos, resultando en la disrupción de células bacterianas y fúngicas (Simser et al., 2004).



**Figura 30.** Niveles de expresión del gen Lyso (Lysozima). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-). \*Diferencia significativa.

#### 7.14.7 LGBP (LPS-and $\beta$ -glucan binding protein)

Resultados obtenidos en cuanto al gen LGBP muestran solo expresión del transcrito en tres diferentes tiempos (3, 6 y 12h) para los tratamientos Mix, Alibio y Control +, lo cual concuerda con la función del gen, el cual es de reconocimiento de patógenos así como con la activación del sistema ProPO, comunicación en los hemocitos y producción de melanina (Wang et al., 2010). Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) fueron observadas en la expresión relativa del gen al tiempo 3 para el tratamiento Alibio con un valor de 0.0038, comparado con Mix de 0.0012 y Control + de 0.0014. No fue detectado en Control negativo (camarones no infectados). De igual forma solo se observó la expresión del gen en el Control + en la primer hora post inyección, probablemente debido a que los camarones no tratados con los probióticos fueron más sensibles a la infección (Figura 31). Proteínas de reconocimiento específico, incluyendo  $\beta$ -1.3-glucan-binding protein, LPS-binding protein, peptidoglycan-binding protein y LPS and  $\beta$  1,3-glucan binding protein (LGBP), los cuales reconocen y responden a la presencia de elementos extraños.



**Figura 31.** Niveles de expresión del gen LGBP (LPS-and  $\beta$ -glucan binding protein). El nivel de expresión fue normalizado con el grupo control (-). \*Diferencia significativa.  
5F

## 8. Discusión.

*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Vibrio*, *Streptococcus*, *Alteromonas*, *Aeromonas* y *Nitrosomonas* son los géneros bacterianos comúnmente utilizados para el control de vibriosis en el cultivo del camarón (Gatesoupe, 1994; Rengpipat et al., 2000; Venkat et al., 2004; Balcázar et al., 2007a; Aly et al., 2008). Bacterias Gram-positivas tales como *Bacillus* se presentan como una alternativa para el uso de antibióticos, estas bacterias son comúnmente encontradas en sedimentos marinos y forman parte de la ingesta natural de los camarones de cultivo (Moriarty, 1999). El proceso en la selección de cepas con capacidad probióticas, requiere de aislar y caracterizar microorganismos presentes en el intestino de camarones adultos de *L. vannamei* considerando que los mismos estarán adaptados a crecer y multiplicarse en este órgano. Una ruta común para la selección de probióticos es el realizar pruebas de antagonismo *in vitro*; sin embargo, este criterio no puede ser usado para predecir un posible efecto *in vivo* (Balcázar et al., 2006). Por tal, es esencial el conocer el origen de la cepa para que pueda sobrevivir y colonizar en el tracto gastrointestinal del organismo huésped (Vine et al., 2004). Algunas especies de *Bacillus* producen hemolisinas las cuales pueden ser de riesgo para el organismo (Liu et al., 2009b). En este estudio, la actividad hemolítica fue negativa para las cepas que fueron seleccionadas, indicando que estos aislamientos no representan un riesgo a la salud del hospedero. En lo que respecta a las pruebas de antagonismo estas mostraron que cepas probióticas fueron capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como son *V. harveyi* (CAIM 1793), *V. parahaemolyticus* (CAIM 170), *V. campbelli* (CAIM 333), *V. alginolyticus* (CAIM 57), y *V. vulnificus* (CAIM 157). Resultados similares fueron obtenidos por Balcázar et al. (2007a), quienes observaron que *B. subtilis* UTM 126 fue capaz de inhibir el crecimiento de *V. parahaemolyticus* PS-107. Nakayama et al. (2009) encontraron que líquido sobrenadante de cultivo de *B. subtilis*, *B. liqueniformis* y *B. megaterium* inhiben el crecimiento de *V. harveyi* por un tiempo de 24h. Decamp et al. (2008) administraron *B. subtilis* y *B. licheniformis* en el cultivo larvario de *L. vannamei* y *Penaeus monodon* observando una inhibición del crecimiento de diversas cepas de *Vibrio* e incrementando la supervivencia del camarón. Los posibles efectos inhibitorios del género *Bacillus* pueden ser atribuidos a varias razones: alteraciones del pH en el medio de cultivo, uso de nutrientes

esenciales y producción de compuestos volátiles (Guillan et al., 2004; Chaurasia et al., 2005; Yilmaz et al., 2006). Así mismo, *Bacillus* spp. también produce polipeptidos (bacitracina, gramicidina S, polimixina y tirotricina) los cuales son activos contra un amplio rango de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, lo cual explica su efecto inhibitorio contra *Vibrios* patógenos (Morikawa et al., 1992; Perez et al., 1993; Drablos et al., 1999). Durante la caracterización del potencial probiótico, se determinó la habilidad para adherirse y colonizar el intestino del camarón. Cepas bacterianas adhesivas proliferaron lo que fue visible por microscopia de epifluorescencia, confirmando que las cepas fueron capaces de adherirse a la mucosa intestinal y mucina gástrica del camarón *L. vannamei*. De igual forma, el número de células viables incrementó en el moco a las 24h con una subsecuente disminución a las 48 h, mostrando abundantes esporas libres (Figuras 11 y 12). Estudios similares reportaron que cepas de *Bacillus* spp. son capaces de crecer en agua y colonizar el tracto digestivo de camarones; esta habilidad está relacionada con una exclusión competitiva entre cepas de *Bacillus* contra otras bacterias patógenas por nutrientes, espacio o producción de bacteriocinas (Moriarty, 1998; Rengpipat et al., 1998; Verschuere et al., 2000). Duc et al. (2004) reportaron que esporas de *Bacillus* pueden germinar en el tracto digestivo de humanos y animales. En la actualidad, no se sabe si células o esporas de *Bacillus* son responsables de la exclusión competitiva y los efectos probióticos que se atribuyen a varias especies de *Bacillus* que les permitan transitar con éxito en el tracto digestivo de animales y suelos (Patterson y Burkholder, 2003; Sanders et al., 2003).

Resultados obtenidos en el cultivo larvario indicaron que la mayor supervivencia fue proporcionada por las larvas tratadas con la cepa YC5-2 (*B. tequilensis*), sin embargo la mayor tasa de desarrollo de las larvas se obtuvo con el Mix-2 (C2-2: *B. endophyticus*, YC3-b): *B. endophyticus* y YC5-2: *B. tequilensis*). La diferencia en la supervivencia entre los dos bioensayos se puede explicar por la variabilidad genética de los reproductores de camarón y su procedencia. Además, la baja supervivencia en el grupo control (5%) del segundo bioensayo refuerza el punto de vista que los probióticos son altamente efectivos para incrementar la supervivencia larval. Srinivas et al. (2009) encontraron que prácticas tradicionales (recambios largos de agua, aplicación de desinfectantes y antimicrobianos o

ambos) son requeridos para completar exitosamente el ciclo larval, por lo tanto, la baja tasa de supervivencia larval del grupo control era de esperarse. Debido a que los brotes de enfermedades causan pérdidas económicas importantes, una amplia gama de agentes quimioterapéuticos se ha utilizado para reducir enfermedades bacterianas. Oxitetraciclina (OXT) es el antibiótico comúnmente utilizado en la larvicultura en el noroeste de México para evitar la vibriosis por *V. alginolyticus* y *V. harveyi* (Uno et al., 2010). En este trabajo, larvas tratadas con OXT tuvieron mayor supervivencia y desarrollo en comparación con el grupo control; sin embargo OXT no fue tan eficaz como algunas de las cepas probióticas.

De acuerdo con Jones et al. (1997) el inicio de la alimentación exógena de las larvas de penaeidos es una fase crítica en la supervivencia, crecimiento y desarrollo debido a que el intestino de las larvas está expuesto a microorganismos del medio que los rodea durante la transición de nauplio V a Zoea I. En este trabajo *B. tequilensis* (cepa YC5-2), *B. endophyticus* (cepa C2-2 y YC3-b), y *B. subtilis* (cepa YC2-a) aumentaron significativamente la supervivencia de las larvas en cultivo. Diversos autores indican que el uso de probióticos se presenta una modificación de las comunidades bacterianas presentes en el agua de los tanques de cultivo mejorando la supervivencia de larvas de crustáceos (Nogami y Maeda, 1992; Garriques y Arévalo, 1995; Balcázar y Rojas, 2007b, Gomez et al., 2008; Guo et al., 2009).

Los beneficios de los probióticos en la acuicultura han sido demostrados, sin embargo, las aplicaciones de estos tratamientos deben basarse en la comprensión de los mecanismos involucrados y las consecuencias putativas. Una parte esencial de ese entendimiento se puede proporcionar con estudiar el funcionamiento de las interacciones huésped-microorganismo y las consecuencias de su modulación. Análisis de perfiles de bandeo obtenidos a partir de los geles de SSCP indicaron una modulación de la microbiota durante por primeros 10 días de inoculación después de este tiempo, no hubo cambios significativos en la microbiota intestinal de camarones tratados con *Bacillus mix*. Perfiles de bandeo de *Bacillus mix* y Alibio fueron muy similares entre réplicas, presentando diferencias con respecto al control. En este trabajo, la mayoría de los OTU's (Unidad Taxonómica Operativa) identificados mediante geles de SSCP tratados con los probióticos pertenecen a la clase filogenética  $\alpha$ ,  $\gamma$ -proteobacteria, Flavobacteria, Shingobacteria y

Fusobacteria. En comparación con otras especies de invertebrados, tal es el caso de *Fenneropenaeus chinensis* donde la microbiota estuvo representada por las clases  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ -proteobacteria (Liu et al., 2011), o el camarón tigre *Penaeus monodon* por Fusobacterias y  $\gamma$ -proteobacteria (Chaiyapechara et al., 2011) o en *Rimicaris exoculata* con la microbiota compuesta por derribacteres, mollicutes,  $\gamma$ - $\epsilon$ -proteobacteria, una pequeña fracción de firmicutes, cytophaga-flavobacter-bacteroides, verricomicrobiae y  $\beta$ . $\delta$ -proteobacteria (Durand et al., 2010). Así mismo, juveniles expuestos a *Bacillus mix* y Alibio presentaron la mayor diversidad bacteriana, en comparación con los controles (número total de OTU's, alto índice de diversidad de Shannon (H') y de uniformidad (E')). Resultados demostraron que comunidades bacterianas fueron dominadas por  $\alpha$ -proteobacteria y Flavobacteria durante todo el cultivo en todos los tratamientos estando representadas por *Maribius salinus*, *Donghicola eburneus* ( $\alpha$ -proteobacteria) y *Wandonia haliotis* (Flavobacteria) en todos los tratamientos y en todos los tiempo. Estos resultado difieren con lo encontrado por Liu et al. (2011) quienes observaron un dominio de  $\gamma$ -proteobacteria en la comunidad bacteriana de *Fenneropenaeus chinensis*, similares resultados fueron obtenidos por Payne et al. (2007) en la langosta *Panulirus ornatus*; Durand et al. (2010) en *Rimicaris exoculata*; Daniels et al. (2010) en la langosta *Homarus gammarus* y Chaiyapechara et al.(2011) en *Penaeus monodon*.

Demsey et al. (1989) sugiere que solo uno o dos grupos filogenéticos dominan el intestino del camarón presentando muy baja diversidad; estos reportes se han basado principalmente en cultivos dependientes por técnicas microbiológicas, en comparación con técnicas moleculares indican que del 10-50% de la población es cultivable (Holzapfel et al., 1988). En el presente trabajo bandas representadas por *Bacillus mix* no fueron detectadas, sin embargo esto puede ser debido a que la técnica SSCP visualiza solo a las poblaciones bacterianas predominantes en una muestra, datos proporcionados por Gelsomino et al. (1999) sugieren que solo especies abundantes generan una banda debido al límite de detección de bacterias en DGGE debe de ser superior a  $10^6$  células, en este trabajo se probó la concentración de  $10^5$  células, lo cual podría ser la causa de la no detección. Análisis de secuencias a los 5 días de inoculación indican una modulación de la microbiota intestinal en los organismos tratados con *Bacillus mix* presentando una alta diversidad de especies. A

los 10 días, las secuencias muestran un efecto de los probióticos en la modulación de la microbiota intestinal, resultados similares fueron obtenidos por Liu et al. (2010), donde *Bacillus* sp. incrementó la variación individual y la diversidad de especies en *Marsupenaeus japonicus*. Comunidades microbianas a los 15 y 20 días fueron más estables con pocas variaciones y mayor similitud. Resultados parecidos fueron obtenidos por Daniels et al. (2010), quienes reportaron que con la adición del prebiótico mannanoligosacáridos y de *Bacillus* se logró la estabilización de la población microbiana endógena y en cierta medida, suprime las variaciones y la afluencia de nuevas especies en la langosta Europea *Homarus gammarus*.

Vibriosis es una enfermedad común en organismos marinos asociados con altas mortalidades alrededor del mundo (Egidius, 1987; Lightner, 1994; Estes et al., 2004). Cerca de 20 especies pertenecientes al género *Vibrio*, incluidas *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. anguillarum* han sido reportadas como patógenos oportunistas en animales acuáticos (Prayitno y Latchford, 1995; Hameed et al., 1996; Vandenberghe et al., 1998). Resultados de la infección bacteriana contra *V. parahaemolyticus* demostró el mayor porcentaje de supervivencia se produjo con los camarones tratados con *Bacillus* mix (~33%), seguido por Alibio (~21%) y control positivo (~9%). Sin embargo, el análisis de los perfiles de bandeo de cada uno de los geles de SSCP realizados durante el reto contra *V. parahaemolyticus* indican un aumento en el número de bandas presentes a las 12 h post infección con una subsecuente disminución a las 48h. Resultados similares fueron obtenidos por Zhou et al. (2011) quienes observaron que al infectar tilapia (*Oreochromis* sp.) con *Aeromonas hydrophila* previamente tratadas con prebióticos mostraron una reducción en su recuento total de bacterias intestinales así como en la diversidad y uniformidad de especies, atribuyendo este efecto a la presencia del patógeno. Cabe destacar que no existen estudios sobre el efecto de patógenos en la microbiota intestinal de invertebrados y en vertebrados está muy limitado con excepción del estudio realizado por Zhou et al. (2011).

Diversos estudios indican que la comunidad microbiana intestinal del camarón está principalmente compuesta por los géneros *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (Dempsey et al., 1989; Moss et al., 2000;

Oxley et al., 2002). En este estudio, especies de *Vibrio* fueron detectadas en control positivo (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio* sp.) así como en control negativo (*Vibrio mediterrani*) y Alibio (*Vibrio* sp.) confirmando la infección; en contraste en el tratamiento *Bacillus mix* no se observó la presencia del patógeno lo que podría indicar algún tipo de protección por parte del probiótico a los organismos en cultivo, evitando así la presencia de *Vibrio* en la microbiota; sin embargo, si se tuvo la presencia de especies consideradas patógenas como son *Photobacterium damsela* subs. piscicida la cual fue detectada en todos los tratamientos. Vibriosis y photobacteriosis son causados por bacterias de la familia Vibrionaceae, (Benediktsdóttir et al., 1998; Eguchi et al., 2000), donde se pueden incluir las especies *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. salmonicida*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* los cuales son causantes de infecciones importantes en especies de peces (Hanna et al., 1991; Sung et al., 1999). Photobacteriosis es causada por *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida (anteriormente *Pasteurella piscicida*) que es una bacteria altamente patógena que no parece tener especificidad de huésped, infectando a una gran variedad de especies de peces (Toranzo et al., 1991; Noya et al., 1995). Vandenberghe et al. (1999) demuestran que las infecciones por *V. parahaemolyticus* y *P. damsela* se producen en juveniles y adultos de *Litopenaeus vannamei*.

En el presente estudio camarones que recibieron *Bacillus mix* y el probiótico comercial presentaron un incremento en la respuesta inmune resultando en una mayor resistencia a la infección con *V. parahaemolyticus*, indicando un incremento en los niveles de expresión del transcrito de los genes Lysozima, Proteína activadora de la fagocitosis (PAP) y Penaeidina tipo 2 (PEN 2), proteína de coagulación (CP), y Peroxinectina (PE) así como, la proteína de reconocimiento LGBP. Así mismo, el conteo de hemocitos circulantes (THC) de camarones inoculados con los probióticos fue significativamente más alto que el grupo control negativo a las 48h de haber realizado la infección. Es bien sabido que el ciclo de vida, alimentación, enfermedades, contaminantes, y estrés afectan la cantidad de hemocitos circulantes en crustáceos, tanto en cantidad como en calidad (Persson et al., 1987; Cheng y Chen, 2001). Un incremento en el THC provee una mejor respuesta inmune

durante periodos de estrés (Truscott, 1990) además de proporcionar resistencia a enfermedades en crustáceos (Le Moullac et al., 1998).

Resultados obtenidos por Burge et al. (2006) demuestran que organismos inyectados con *V. campbelli* producen un decremento en la señal transcripcional en hemocitos circulantes y tejido perimetral a las 4h post-inyección. Así mismo, notaron un aumento en la concentración de lysozima en el músculo, sugiriendo una migración de los hemocitos al sitio de inyección durante las primeras 4h, después de este periodo de tiempo se incrementó la señal en los hemocitos y disminuyó la expresión en tejido. Resultados obtenidos en este trabajo indican una sobre expresión a las 3h post inyección probablemente atribuido al efecto del *Bacillus mix* al estimular el sistema inmune contra una infección bacteriana. Wang et al. (2010) observaron un aumento en los niveles de expresión del gen lysozima a las 36 hpi con *Vibrio harveyi* en juveniles de *L. vannamei*, indicando que este gen es un componente esencial en la respuesta inmune contra bacterias Gram-negativas. Ji et al. (2009) observaron un aumento en los niveles de expresión del transcrito a las 6h, teniendo el pico más alto de expresión a las 24h post inyección con LPS. En lo que respecta con la Proteína activadora de la fagocitosis (PAP) diversos autores han demostrado un incremento en los niveles de expresión de este gen ante la presencia de un patógeno o un estrés, tal es el caso de Watanabe (1998) encontró que RPL 26 (PAP) en *P. japonicus* fue expresado durante el ciclo de muda. RPL 26 fue encontrado al ser sobre expresado en respuesta a la activación de macrófagos en ratón cuando fueron tratados con LPS, silica e IFN $\gamma$  (Segade et al., 1996). Además, se ha observado que este gen incrementa la actividad fagocítica de los hemocitos cuando son incubados con la proteína glutathione-s-transferasa-PAP (GST-PAP) observando una sobreexpresión del gen RPL 26 (PAP) a las 6 y 72h pos inyección con VIH (*V. harveyi*, inactivo) WSSV (Inactivado con formalina) y fucoisan (Deachamag et al., 2006).

De igual forma, peneidinas presentan una actividad antibacteriana y antifúngica (Destoumieux et al., 1999), la actividad antibacteriana es predominantemente dirigida contra bacterias gram-positiva; un efecto bactericida de las peneidinas tuvo que ser observado contra las bacterias *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* y *A. iridansasi* como hongos filamentosos como *Fusarium oxysporum*. Sin embargo en nuestros resultados

PEN2 fue significativamente sobre expresado después de la inyección con *V. parahemolyticus* durante las primeras horas del reto bacteriano. Similares resultados fueron obtenidos por Wang et al. (2010), quienes observaron un incremento en los niveles de expresión de PEN2 y PEN4 a partir de las 18 h pos infección con *V. harveyi*, indicando que ambos péptidos antimicrobianos pudieran estar relacionados con la limitación en la invasión por el patógeno.

Por otro lado, la proteína de reconocimiento de lipopolisacaridos y  $\beta$ -1,3 glucano (LGBP) y la proteína de adhesión celular, peroxinectina (PE), son moléculas relacionadas con el sistema proPO. En este estudio ambos genes presentaron un incremento en los niveles de expresión en los organismo tratados con el probiótico comercial sugiriendo que un incremento de PE puede incrementar la actividad biológica de adhesión celular, opsonización, degranulación, peroxidasa y encapsulación en camarón tratados con el probiótico (Johansson y Söderhäll, 1988; Thörnqvist et al., 1994; Johansson and Söderhäll, 1989; Johansson et al., 1995; Kobayashi et al., 1990). Resultados similares fueron obtenidos por Liu et al. (2005) quienes observaron una sobreexpresión de transcrito del mRNA peroxinectina a las 24h pos infección con *V. alginolyticus*. Asi mismo, Chiu et al. (2007), observaron un incremento en los niveles de expresión del transcrito de peroxinectina en *Litopenaeus vannamei* a las 168h de haber sido inoculados con el probiótico *Lactobacillus plantarum*.

En lo que respecta a la proteína de coagulación (CP), Wang et al. (2010) observaron que niveles de expresión de mRNA de TGasa y CP fueron alterados después de la infección con *V. harveyi*. En *Marsupenaeus japonicus*, Cheng et al. (2008) demostraron que el RNAm correspondiente a CP es expresado en el hepatopáncreas de los camarones y en varios otros tejidos, con excepción de los hemocitos y de los músculos; siendo el tejido epidérmico sub cuticular de *M. japonicus* el principal sitio de la síntesis de CP, esto comparado con nuestro trabajo podría justificar el nivel bajo de expresión en los tiempos muestreados con excepción del tiempo 12.

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa que protege al hospedero en las primeras horas y días después de la infección (Lee y Söderhäll, 2002). La primera fase distintiva de respuesta inmune en camarones es aproximadamente a las 12h después de un

reto con patógenos (Bachère et al., 2004). Basados en esta información y considerando que el registro de mayor mortalidad fue a las 12h postinfección y al incremento en los niveles de expresión de genes de respuesta inmune (PAP, Lysozima, PEN 2) antes de las 12h nos indican que los camarones previamente tratados con los probióticos poseen una fuerte habilidad de defensa que los llevo a tratar de combatir la infección contra *V. parahaemolyticus*.

En resumen este trabajo demuestra que *Bacillus mix* mantiene una comunidad bacteriana equilibrada y natural que mejora la producción larval que se ve reflejada en la tasa de desarrollo, además, modula y reduce la diversidad de las comunidades bacterianas del intestino e incrementa la respuesta inmune de tipo celular y humoral influyendo en la salud del organismo huésped ante una posible infección.

## 9. Conclusiones

1. El tratamiento Mix compuesto por *Bacillus*, aceleran la metamorfosis larvaria hasta con 1 día de diferencia en comparación con el control y los otros tratamientos. Así mismo, protege a juveniles de *L. vannamei* ante la infección por *Vibrio parahaemolyticus* además de incrementar el numero de hemocitos circulantes a las 48h post-infección.
2. Ambos probióticos influyen en la modulación de la microbiota y presentan la mayor diversidad de especies al menos durante los primeros 10 días de inoculación. La presencia de *V. parahaemolyticus* en control positivo confirmo la infección bacteriana y la ausencia de especies de *Vibrio* en *Bacillus* confirma su protección.
3. *Bacillus* mix estimula la expresión de los genes PAP, Lyso y PEN2 durante las primeras 6 horas pos infección.
4. Alibio estimula la expresión de los genes PE, CP y PAP a las 12, 24 y 48h post-infección.
5. Flavobacteria y  $\alpha$ -proteobacteria (*Wandonia haliotis haldis*, *Donghicola eburneus* y *Maribius salinus*) fueron las bacterias presentes en los tres tratamientos pudiendo ser consideradas como bacterias comensales del intestino del camarón.
6. En conclusión *Bacillus* mix fue benéfico en términos de resistencia a *V. parahaemolyticus* e incrementa la respuesta inmune celular y humoral confirmando su efectividad como probiótico.

## 10. Literatura citada

- Aguirre-Guzmán G. y Ascencio-Valle F. 2001. Infectious diseases in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res Dev Microbiol* 4: 333-348.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaeffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Aly S.M., Abd-El-Rahman A.M., John G., Mohamed M.F. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture* 277, 1–6.
- Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. 2011. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Sagarpa. México. [www.conapesca.sagarpa.gob.mx](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx)
- Apostolou E., Pelto L., Kirjavainen P.V., Isolauri E., Salminen S.J. y Gibson G.R. 2001. Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence in situ hybridization. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30, 217-221.
- Austin, B. 2006. The bacterial microflora of fish, revised. *Scientific World J.* 6:931-945.
- Baake-McKellep A.M., Penn M.H., Salas S., Refstie S., Sperstad S., Landsverk T., Krogdahl A. 2007. Effects of dietary soybean meal, insulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Brit J Nut* 97:699-713.
- Bachere E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 198:149–68.
- Bachère E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture* 227, 427–438.
- Balcazar J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. CIVA 2002. (<http://www.civa2002.org>), 877-881.

- Balcazar J.L., Rojas-Luna T., 2007b. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr Microbiol* 55, 409-412.
- Balcazar J.L., Rojas-Luna T., Cunningham P. 2007a. Effect of the addition of four potential strain on the survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vanamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J Invertebr Pathol* 96, 147-150.
- Balcázar J.L., Ruíz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114, 173–186.
- Bartlett T.C.; Cuthbertson B.J.; Shepard E.F., Chapman R.W., Gross, P.S., Warr, G.W. 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar Biotechnol* NY, 4: 278-293.
- Barracco M.A., Perazzolo L.M., Rosa R.D. 2008. Inmunología del camarón. En: Morales V.Q., Cuéllar-Anjel J. (eds.) 2008. 169-223 pp. Guía-Técnica Patología e inmunología de camarones penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.
- Benediktsdóttir E., Helgason S., Sigurjónsdóttir H. 1998. *Vibrio* spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature. *J Fish Dis*, 21, 19–28.
- Birkbeck T.H., Ringo E. 2005. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: *Microbial Ecology in Growing Animals* (ed. By W. Holzapfel & P. Naughton *Biology in Growing Animals Series* (ed by S.G. Pierzynowski & R. Zabielski). 208–234. Elsevier.
- Bogdan C., Röllinghoff M., Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin in Immunol*, 12: 64-76.
- Brock J.A. y Lightner D.V. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea. In: O. Kinne (ed.) *Diseases of Marine Animals Vol. 3*, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 245-424.

- Broda D.M., Lawson P.A., Bell R.G., Musgrave D.R. 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1539-1550.
- Burge E.J., Madigan D.J., Burnett L.E., Burnett K.G. 2006. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunol*, 25:1-13
- Burge E.J., Madigan D.J., Burnett L.E., Burnett K.G. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunol* 22:327-39.
- Burgents J., Burnett K. G., Burnett L. E. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*. 231:1-8 pp.
- Campa-Córdova A.I., Hernández-Saavedra N.Y., De Philippis R. y Ascencio, F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulfated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*, 12: 353-366.
- Chaiyapechara S., Rungrassamee W., Suriyachay I. 2011. Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. *Microb Ecol* DOI: 10.1007/s00248-011-9936-2
- Chaurasia B., Pandey A., Palni L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin N., 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiol Res* 160, 75-81.
- Chavez-Sanchez M. C., Higuera-Ciapara I. 2003. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad. CIAD, A.C. 95 pp. Mazatlán, Sinaloa.
- Cheng W, Chen J. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 11(1):53-63.

- Cheng W., Tsai, I.-ho Huang C.-jen, y Chiang P.-chi. 2008. Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) 32, 265-274. doi:10.1016/j.dci.2007.05.009
- Chin-I C., Wen-Yu L., Chung-Zen S. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. Dis Aquat Organ 43(14), 153–157.
- Chiu C., Guu Y., Liu C. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish Shellfish Immunol, 23: 364–377.
- Chun J., Lee J.H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., Lim Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Syst Evol Micr 57:2259–2261
- Comité estatal de sanidad acuícola de Sinaloa (CESASIN) 2004. Estudio de Diagnostico sanitario para determinar la situación actual de la presencia de enfermedades de Alto Impacto en el Cultivo de Camarón en el Estado de Sinaloa. SAGARPA-CONAPESCA.
- Conway, P. L., y Henriksson, A. 1989. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. J. Gen Microbiol 135:1175–1186.
- Daniels C.L., Merrifield D.L., Boothroyd D.P., Davies S.J., Factor J.R. Arnold K.E. 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiology and gut microbiota. Aquaculture 304:49–57
- de Lorgeril J., Gueguen Y., Goarant C., Goyard E., Mugnier C., Fievet J., et al. 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. Mol Immunol, 45: 3438–45.
- de la Peña L.D., Nakai T. y Muroga K. 1995. Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Fish Pathol, 30:39–45.

- Deachamag P., Intaraphad U., Phongdara A., Chotigeat W. 2006. Expression of a Phagocytosis Activating Protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture*, 225:165–75.
- Decamp O., Moriarty D.J.W., Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquac Res* 39, 334–338.
- Defoirdt T., Bossier P., Sorgeloos P., Verstraete W. 2005. The impact of mutations in the quorumsensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environ Microbiol* 7:1239–1247.
- Dempsey A.C., Kitting C.I., Rosson R.A. 1989. Bacterial variability individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana* 56:267–278.
- Destoumieux D., Munoz, M., Bulet P., Bachère E. 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci*, 57:1260–71.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorsselaer A., Rodriguez J., Bachère E., 1997. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides in the shrimp, *Penaeus vannamei* Decapoda.. *J Biol Chem* 272, 28398–28406.
- Destoumieux D., Bulet P., Strub J.-M., Van Dorsselaer A., Bachère E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem*, 266, 335–346.
- Dopazo C., Lemos M., Lodeiros C., Barja J., Toranzo A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 97-101.
- Drablos F., Nochilson D., Ronning M. 1999. EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A. *Biochim Biophys Acta* 1431:433–442
- Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M., 2004. Characterisation of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* 70, 2161–2171.
- Durand L., Zbinden M., Cueff–Gauchard V., Duperron S., Roussel E.G., Shillito B., Cambon–Bonavita M.A. 2010. Microbial diversity associated with the

- hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol Ecol*, 71:291–303
- Egidius E. 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. *Aquaculture* 67, 15–28.
- Eguchi M.; Fujiwara, E.; Miyamoto, N. 2000. Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: Adaptation or debilitation? *J. Infect. Chemother*, 6, 126–129.
- Escobar-Briones L., Olvera-Novoa M.A., Puerto-Castillo C. 2006. Avances sobre ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. VIII Simposium internacional de Nutrición Acuicola. 15-17 de Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Estes R.M., Friedman C.S., Elston R.A. y Herwig, R.P. 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* 58, 223–230.
- Fromin N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Forestier N., Teyssier-Cuvelle S., Gillet F., Aragno M., Rossi P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* 4:634–643
- Fuller R. 1989. A review: probiotics in man and animal. *J Appl Bacteriol* 66:365–378
- Garriques D., Arevalo G., 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming through Troubled Water. : Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture 1995*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 53–59.
- Gatesoupe F.J. 1999. Review/The use of probiotics un aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gatesoupe F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquat. Living Resour.* 7, 277-282.

- Gelsomino A., Keijzer W.A.C., Cacco G., Van Elsas J.D. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 38:1–15
- Gómez R., Geovanny D., Shen M.A. 2008. Influence of probiotics on the growth and digestive enzyme activity of white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ocean Coast Sea Res.* 7, 215–218.
- Gomez-Anduro GA, Barillas-Mury CB, Peregrino-Uriarte AB, Lalita Gupta L, Gollas-Galvan T, Hernandez-Lo'pez J, et al. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev Comp Immunol*, 30:893–900.
- Gomez-Gil B., Roque A., Turnbull J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 259–270.
- Gross P.S., Bartlett T.C., Browdy C.L., Chapman R.W., Warr G.W. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol*, 25:565–77.
- Gueguen Y, Garnier J, Robert L, Lefranc MP, Mougnot I, de Lorgeril J. 2006. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence based classification and recommended nomenclature. *Dev Comp Immunol*, 30:283–8.
- Gullian M., Thompson F., Rodríguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1–14.
- Guo J.J., Liu K.F., Cheng S.H., Chang C.I., Lay J.J., Hsu Y.O., Yang J.Y., Chen T.I. 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquac Res* 40, 609–618.
- Hameed A.S.S., Rao P.V., Farmer J.J., Brenner F.W.H. y Fanning G.R. (1996) Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbellii*-like bacterium affecting hatchery reared *Penaeus indicus* (Milne Edwards, 1837) larvae. *Aquaculture Res* 27, 853–863.

- Hanna P.J.; Altmann K., Chen D., Smith A., Cosic S., Moon P. 1991. Development of monoclonal antibodies for the rapid identification of epizootic *Vibrio* species. *J Fish Dis* 15, 63–69.
- Harris L. 1995. The involvement of toxins in the virulence of *Vibrio harveyi* strains pathogenic to the black tiger shrimp *Penaeus monodon* and the use of commercial probiotics to reduce shrimp hatchery disease outbreaks caused by *V. harveyi* strains. CRC for Aquaculture, Scientific Conference abstract, Bribie Island, Australia. Holzapfel W, Haberer P, Snel J, Schillinger U. 1988. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41:85–101
- Irianto A. y Austin B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 25, 333–342
- Ishimaru K., Akagawamatsushita M. y Muroga K. 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *Int J Sys Bacteriol* 45, 134–138.
- Ji P.-feng, Yao C.-luan, y Wang Z.-yong. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol*, 27(4), 563-570. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.fsi.2009.08.001
- Johansson M.W., Lind M.I., Holmblad T., Thörnqvist P.O., Söderhäll K. 1995. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish, blood. *Biochem Biophys Res com*, 216:1079-1087.
- Johansson M.W., Söderhäll K. 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J Cell Biol*, 106:1795-1803.
- Johnson C.N., Barnes S., Ogle J., Grimes J.D., 2008. Microbial Community Analysis of Water, Foregut, and Hindgut during Growth of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Closed-System Aquaculture. *J World Aquacult Soc*, 39(2):251–257.
- Jones D.A., Yule A.B., Holland D.L., 1997. Larval nutrition. In: D'Abramo, L.R., Conclin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*. World Aquacult Soc, Baton Rouge, LA.
- Jory D. E. 1998. Use of probiotics in Penaeid shrimp growout. *Aquaculture Magazine*, 24(1): 62-67.

- Kobayashi M., Johansson M.W., Soderhall K., 1990. The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell Tissue Res*, 260, 13–18.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C., 2001. *Diagnóstico Microbiológico*. Médica Panamericana, Mexico City. 533 pp.
- Kopáček P., Hall, M., Söderhäll K. 1993. Characterization of a clotting proteins isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem*, 213: 591-597.
- Lavilla-Pitogo C.R., M.C.L. Baticados E.R. Cruz-Lacierda y J.D. de la Pena 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91: 1–13.
- Le Moullac G., Soyeux C., Saulnier D., Ansquer D., Avarre J.C., Levy P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol* 8:621–9.
- Lee S.Y., Söderhäll K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol* 12, 421–437.
- Li P., Burr G.S., Gatlin D.M., Hume M.E., Patnaik S., Castille F.L., Lawrence A.L. 2007. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *J Nutr* 137:2763–2768
- Liang Z., Lindblad P., Beauvais A., Johansson M.W., Latgé J.P., Hall M., et al. 1992. Crayfish  $\alpha$ -macroglobulin and 76 kD protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kD protein. *J Insect Phys*, 38:987–95.
- Lightner D. V. y Redman R. M. 1994. An epizootic necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture* 122:9–18.
- Liu P.C., Lee K.K., Chen S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol* 22, 413–416.
- Liu C.H., Cheng W., Chen J.C. 2005. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesised in the semi-granular and granular cells, and its

transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 18:431–44.

- Liu C.H., Chiu C.S., Ho P.L., Wang S.W. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J Appl Microbiol* 107:1031–1041
- Liu H., Wang L., Liu, M., Wang B., Jiang K., Ma S., Li Q. 2011. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses. *Aquaculture* 317:32–36
- Liu H., Liu M., Wang B., Jiang K., Jiang S., Sun S., Wang L. 2010. PCR-DGGE analysis of intestinal bacteria and effect of *Bacillus* spp. On intestinal microbial diversity in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicas*). *Chinese J Oceanol Limnol*, 28: 808–814
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-208.
- Maeda M., Nogami K., Kanematsu M. y Hirayama K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia* 358: 285-290.
- Mai W.J., Hu C.Q. 2009. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis*. *Mol Biol Rep*, 36:1587–95.
- Martin, G.G., Hose, J.E., Omori, S., Chong, C., Hoodbhoy, T., Mackrell, N. 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comp Biochem Phys*, 100: 517- 522.
- Moriarty D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164:351–358
- Moriarty, D.J.W., 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Gren, P. (Eds.), *Microbial Biosystems: New Frontiers*. : Proceedings of the 8 th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax. 351–358 pp.

- Morikawa M., Ito M., Imanaka T. 1992. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. *J Ferment Bioeng* 74:255–261
- Moss S.M., LeaMaster B.R., Sweeney J.N. 2000. Relative abundance and species composition of gram negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *L. vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *J. World Aquacult Soc* 31, 255-263.
- Nakayama T., Lu H., Nomura N. 2009. Inhibitory effects of *Bacillus* probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Lett Appl Microbiol* 49, 679–684
- Nash G., C. Nithimathachoke C. Tungmandi A. Arkarjamorn P. Prathanpipat y P. Ruamthaveesub. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand, p. 143–155. *In* M. Shariff, R. P. Subasinghe, and J. R. Arthur (ed.), *Diseases in Asian aquaculture I*. Fish Health Section, Asian Fisheries Soc, Manila, The Philippines.
- Nogami K., Maeda M., 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus tribeculatus*. *Can J Fish AquatSci* 49, 2373–2376.
- Noya M., Magarinos B. 1995. Lamas, J. Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquaculture*, 131, 11–21.
- Ochoa-Solano, J.L. y Olmos-Soto J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol* 23, 519-525.
- O’Toole P.W., Cooney J.C. 2008. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. Doi: 10. 1155/2008/175285
- Olafsen J. A. 2001. Interaction between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*: 223–247.
- Oxley A.P.A., Shipton W., Owen L., McKay D. 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied microbiology*, 93, 214-223.

- Owens L. y Hall-Mendelin 1989. Recent Advances in Australian shrimps (sic) diseases and pathology. *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti, AQUACOP, IFREMER, Actes de Colloque 9: 103–112.
- Owens L., Muir, P., Sutton D. y Wingfield, M. 1992. The pathology of microbial diseases in tropical Australian Crustacea. In: M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Authur (eds.) *Diseases in Asian Aquaculture 1*. Fish Health Section, Asian Fisheries Soc, 165-172.
- Palomec-Antonio M.A. 2010. Evaluación del papel de la fagocitosis y apoptosis como parte del sistema de defensa del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuesto al Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.(CIAD). Unidad Mazatlán. 147 pp.
- Pangastuti A., Suwanto A., Lestari Y., Tennawijaya S.M. 2010. Bacterial communities associated with shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at early developmental stages. *Biodiversity*, 11(2), 65-68.
- Patterson, J.A., Burkholder, K.M., 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 82, 627–631.
- Payne M.S., Hall M.R., Sly L., Bourne D.G. 2007. Microbial diversity within early-stage cultured *Panulirus ornatus* phyllosomas. *Appl Environ Microbiol* 73:1940–1951
- Perez C., Suarez C., Castro G.R. 1993. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. *Folia Microbiol* 38:25–28
- Persson M., Vey A., Söderhäll K. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Res.* 247, 409–415.
- Prayitno S. B., y Latchford. J. W. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132:105–112.
- Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S., Menasaveta P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191, 271-288.

- Rengpipat S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S., Menasveta P., Sirirat, R., Wannipa P., Somkiat P. Piamsak M. 1998. Effects of a probiotic bacterium on blacktiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.
- Ringo E., Strom E. y Tabachek J.A. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquac Res* 26,773-789.
- Ringo E., Birkbeck T.H. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquac Res* 30:73–93
- Ringo E., Sperstad S., Myklebust R., Mayhew T.M., Olsen R.E. 2006. The effect dietary inulin on aerobic bacteria associated with the hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquac Res* 37, 891-897.
- Rojas M., Ascencio F., Conway P.L. 2002. Purification and Characterization of a Surface Protein from *Lactobacillus fermentum* 104R That Binds to Porcine Small intestinal mucus and Gastric mucin. *Applied and environmental microbiology* 68(5):2330–2336.
- Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A., 2003. Spore formers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* 2, 101–110.
- Schwiger F., Tebbe C.C. 1998. A new approach to utilize PCR-single strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64:4870–4876
- Segade F., Claudio E., Hurle B., Romos S., Lazo P.S. 1996. Differential regulation of the marine ribosomal protein L26 gene in macrophage activation. *Life Sci*, 58, 277–285.
- Simser J.A., Mulenga A., Macaluso K.R., Azad A.F. 2004. Immuneresponsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. *Insect Biochem Mol Biol*, 34:1235–46.
- Srinivas S. P., Abdulaziz A., Natamai S. J., Prabhakaran P., Balachandran S., Radhakrishnan P., Rosamma P., Ambat M., Bright I.S.S. 2009. *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by pre-emptive treatment of a

- rearing system with antagonistic or non-antagonistic bacterial probiotics. *Aquac Res* 1-14.
- Stanton C., Ross P., Fitzgerald F.G., Van Sinderen D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (2), 198-203.
- Sung H.H., Li H.C., Tsai, F.M., Ting, Y.Y., Chao, W.L. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J Exp Mar Biol Ecol* 239, 261–271.
- Supungul P., Klinbunga S., Pichyangkura R., Jitrapakdee S., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon, A. 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Marine Biotechnology*, 4: 487–494
- Tannock G. W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. En: Mackie, R. I., Withe, B. A., Isaacson, R. E. (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 2, *Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, 434-465 pp.
- Thornqvist P.-O., Johansson M.W., Soderhall K. 1994. Opsonic activity of cell adhesion protein and system. *Aquaculture* 117, 205–213.
- Toranzo A.E., Barreiro S., Casal J.F., Figueras A., Magariños B., Barja J.L. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream, *Sparus aurata*: First report in Spain. *Aquaculture*, 99, 1–15.
- Truscott R., White K.N. 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Funct Ecol*, 4:455–61.
- Uno K., Chaweeapack T., Ruangpan L., 2010. Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in vannamei shrimp (*Penaeus vannamei*) and the effect of processing on the residues in muscle and shell. *Aquacult Int* 18, 1003-1015.
- Vadstein O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155, 401–417.

- Vandenbergh J., Y. Li L., Verdonck J. Li, H. S. Xu, y J. Swings. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae and post-larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169:121–132.
- Vandenbergh J., Verdonck L., Robles-Arozarena R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., et al. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* 65:2592–7.
- Vargas-Albores F. 1995. Sistemas de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia* 46, 33–45.
- Vargas-Albores F., Jimenez-Vega F. y Soderhall K. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by  $\beta$ -1,3-glucan *Dev Comp Immunol* 20, 299-306.
- Vaseeharan B. y Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Let Appl Microbiol* 36, 83–87.
- Vaughan E.E., de Vries M.C., Zoetendal E.G., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. 2002. The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 341–352.
- Venkat H.K., Sahu N.P. Jain K.K., 2004. Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac Res* 35, 501–507.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671.
- Villegas C.T. Kanazawa A. 1979. Relationship between diet composition and growth of zoal and mysis stages of *Penaeus japonicus* (Bate). *Fish Res J Philippines* 4, 32–40.
- Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H., Baxter J., Hecht T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.* 27, 319–326.

- Wang Y.-chi, Chang P.-shing, y Chen H.-yung. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 23. doi:10.1016/j.fsi.2007.04.004
- Wang K. C. H.-ching, Tseng C.-wei, Lin H.-you, Chen I.-tung, Chen Y.-hui, Chen Y.-min, Chen T.-yueh, et al. 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene ( LvToll ) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Immunology*, 34, 49-58. doi:10.1016/j.dci.2009.08.003
- Watanabe T. 1998. Isolation of cDNA encoding a homologue of ribosomal protein L26 in the decapod crustacean *Penaeus japonicus*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7, 259–262.
- Yilmaz M., Soran H., Beyatli Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp.strains isolated from the soil. *Microbiol Res* 161, 127–131.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7, 203–214
- Zhou Z., He S., Liu, Y., Cao Y., Meng K., Yao B., Ringo E., Yoon I. 2011. Gut microbial status induced by antibiotic growth promoter alters the prebiotic effects of dietary DVAQUA on *Aeromonas hydrophila*-infected tilapia: Production, intestinal bacterial community and non-specific immunity. *Vet Microbiol*, 149, 399-405.
- Ziaei N.S., Rezaei M.H., Takami G.A., Lovett D.L., Mirvaghefi A.R., 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