



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A
Crassostrea gigas, *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea*
sikamea y SU VARIACIÓN SEGÚN ETAPA DE
CRECIMIENTO Y SITIO DE CULTIVO DEL OSTIÓN

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

NATALIA TRABAL FERNÁNDEZ

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 15 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:

Composición de la microbiota asociada a *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea sikamea* y su variación según etapa de crecimiento y sitio de cultivo del ostión.

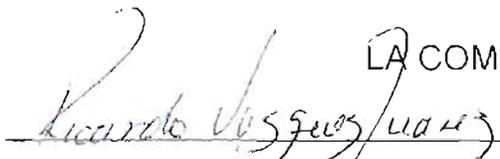
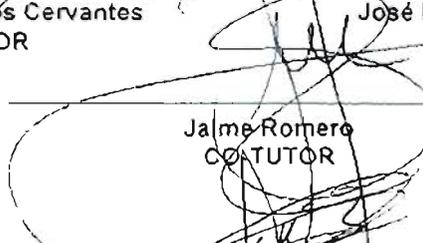
Presentada por el alumno:

Natalia Trabal Fernández

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

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

 Ricardo Vázquez Juárez CO-DIRECTOR DE TESIS	 Felipe Ascencio Valle CO-DIRECTOR DE TESIS
 Thelma Castellanos Cervantes CO-TUTOR	 José Manuel Mazon Suástegui CO-TUTOR
 Jaime Romero CO-TUTOR	
 DRA. ELISA SERRIERE ZARAGOZA, DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO	

Comité Tutorial

Dr. Ricardo Vázquez Juárez (CIBNOR). Co-Director de Tesis

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

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

Dr. José Manuel Mazón Sáustegui (CIBNOR). Co-Tutor

Dr. Jaime Romero Ormazábal. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).
Universidad de Chile. Co-Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Felipe Ascencio Valle

Dra. Thelma Castellanos Cervantes

Dr. José Manuel Mazón Sáustegui

Dr. Jaime Romero Ormazábal.

Jurado del Examen de Grado

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Felipe Ascencio Valle

Dra. Thelma Castellanos Cervantes

Dr. José Manuel Mazón Sáustegui

Dr. Jaime Romero Ormazábal.

Dr. Pedro Cruz Hernández (CIBNOR). Suplente

Dr. Angel Campa Córdova (CIBNOR). Suplente

RESUMEN

La microbiota asociada a moluscos ostreidos importantes en la producción acuícola de México es prácticamente desconocida. Sin embargo, es muy importante para la salud y la nutrición de los ostiones porque cumple, entre otros, una función primordial como barrera protectora contra la colonización por patógenos. La generación de nuevo conocimiento sobre la microbiota es substancial para el desarrollo económicamente rentable y ambientalmente sostenible de la ostricultura. En la presente investigación se determinó la composición de la microbiota procariota asociada a *Crassostrea corteziensis*, *C. sikamea* y *C. gigas*. Se estudió su variación en semillas producidas en laboratorio (ambiente controlado) y una vez trasplantadas para su engorda en campo, se estudiaron los cambios de la microbiota asociada a juveniles y adultos cultivados en dos sitios diferentes. Se extrajo el ADN del tracto gastrointestinal (TGI) de organismos sanos (depurados y no depurados), se amplificó por PCR el gen *16S ARNr* y se estudió la variación de la comunidad bacteriana asociada por comparación de los perfiles de la Longitud de Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP). La comunidad bacteriana y arquea se determinó mediante pirosecuenciación del gen *16S ARNr* (PyroS) y análisis estadístico de Componentes Principales (PCA). Mediante RFLP, PyroS y PCA, se estableció la composición de la microbiota en las semillas de las tres especies de ostión presenta una gran similitud en cuanto a composición bacteriana y es más diversa que en adultos. Una vez que la semilla fue trasplantada, su microbiota asociada sufrió alteraciones. Los resultados de RFLP y PCA indican que la microbiota presentó variaciones entre juveniles y adultos y se observaron claras diferencias en la comunidad bacteriana asociada a *C. corteziensis* y *C. sikamea*, cuando fueron engordadas en sitios distintos. Mediante la PyroS se detectaron 11 Phylum, de los cuales, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes son los principales componentes en las tres especies de ostreidos. Se detectaron 77 géneros bacterianos y arqueas de los géneros *Haloarcula* y *Halobacterium*. A pesar de las diferencias encontradas, existen bacterias simbiotas como *Burkholderia* y *Escherichia/Shigella*, que colonizan en etapas tempranas del desarrollo (larvas, semillas), y se mantienen fuertemente asociadas al TGI en etapas posteriores (juvenil y adulto), la cual no se ve afectada por las condiciones ambientales o de manejo en el sitio de engorda.

PALABRAS CLAVES: Ostreidos, microbiota gastrointestinal, relación bacteria-hospedero.

ABSTRACT

The microbiota associated with oyster important in the commercial production of Mexico is largely unknown. However, it is very important to the health and nutrition of oysters because it meets, among others, a major role as a protective barrier against colonization by pathogens. New knowledge generation on the microbiota is substantial for developing economically viable and environmentally sustainable oyster culture. In the present study we determined the composition of the prokaryotic microbiota associated with *Crassostrea corteziensis*, *C. sikamea* and *C. gigas*. We studied the variation in seed produced in the hatchery (controlled environment) and once transplanted for grow-out in the field, we studied the changes of the microbiota associated with juvenile and adults at two different grow-out sites. DNA was extracted from the gastrointestinal tract (GIT) of healthy organisms (depurated and not depurated) was amplified by PCR and *16S rRNA* gene was studied variation associated bacterial community by comparing the profiles of Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP). The bacterial community and arch was determined by *16S rRNA gene* pyrosequencing (Pyro) and principal component statistical analysis (PCA). By RFLP, Pyros and PCA, the microbiota in the seeds of the three species of oyster had great similarity in bacterial composition and was more diverse than in adults. Once the seed was transplanted, their associated microbiota was altered. The results of RFLP and PCA indicate that the microbiota showed variations between juvenile and adult and observed clear differences in the bacterial community associated with *C. corteziensis* and *C. sikamea* when grow-out at different sites. By Pyros, 11 Phylum were detected, of which, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes are the main components in the three species of oysters. We detected 77 bacterial genera and two Achaea genera: *Haloarcula* and *Halobacterium*. Despite the differences, there were bacterial symbionts as *Burkholderia* and *Escherichia / Shigella*, which colonize in early developmental stages (larvae, seeds), and remain strongly associated with TGI at later stages (juvenile and adult), which is not affected by environmental conditions or management in the grow-out cultivation site.

Key words: Oyster, gastrointestinal microbiota, bacteria-host relationship.

DEDICATORIA

A mami

Beatriz Fernández Maggio (Homenaje póstumo: 23/08/1948-1/6/2011).

Hay personas que brillan con luz propia y mi madre fue una de ellas...

*Mujer libre, luchadora, de gran fortaleza, sentimientos nobles, principios firmes,
corazón infinito y amor incondicional.*

A Fito, mi amado compañero, esposo y amigo.

*Aquí y allá aprendemos cautamente, a vivir glorias o a morir de pena,
en el rumbo mejor o a la deriva, no está mal ser humilde por las dudas y dejar el
fulgor para otro día, aprender es un rito, una costumbre, no le hace mal a nadie ni
se olvida, aprende quien asciende hasta la cresta, pero también quien busca entre
las ruinas, aprender es abrirse a los afanes y ¿por qué no? también a la utopía, la
enseñanza es enjambre y sus gaviotas se posan en el alma sorprendida, sabemos que
aprender tiene su riesgo y puede convertirnos en ceniza...pero no importa / hay que
aventurarse, hay que saber del tiempo/ hora por hora porque vivir no es una lotería,
dame esa mano que me enseña siempre y vayámonos juntos por la vida*

....Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

A ti Fito, compañero y complemento. Gracias por tu apoyo incondicional, consejos, comprensión y muchísima paciencia. Me encanta que este largo recorrido, con muchos tropiezos por cierto, pudiéramos caminarlo juntos a la par como siempre. Fue un esfuerzo luchado y compartido, que hoy gracias al amor que nos tenemos, ha llegado a buen puerto....

De manera muy especial y con todo cariño, quiero agradecer a mi madre, compañera de mil batallas, que sin lugar a dudas con todos sus esfuerzos, consejos, críticas y sobre todo cariño incondicional, me impulsó y apoyó en todos los caminos que he recorrido en mi vida. Gracias por estar siempre presente, trasmitirme tu fuerza y optimismo, aún en los momentos más difíciles. Sé que estarás compartiendo y disfrutando este momento, con tus ojos brillantes de felicidad y tu sonrisa cálida y extrañada como ninguna....

A mis Queridos Hermanos, Andrés y Miguel, mis compinches... Hemos enfrentado juntos los momentos buenos y malos, son mis mejores hinchas, quienes han sabido como ningún otro, dar aliento, cariño y confianza....Gracias por estar acompañando a pesar de la distancia.

A mi familia, a mis sobrinos quienes alegran mi vida. Particularmente, a Nadia, mi prima querida, por estar presente siempre, con gran cariño y apoyo constante.

A mis queridos amigos de la vida, los que nunca fallan, los que me dan su apoyo y cariño sin importar circunstancia, tiempo y espacio: Samira Yarwa, Macarena Gelman, Susana "Chica" Giglio, Ale Crosa, Cesar Fagúndez, Paula Celis, Luarita Ramos, Susana Pineda, Daniel Ibáñez y familia (gracias por aguantarme en su hogar), Andrés Milessi, Seba Sauco y Luis "Chamo" Huckstadt.

A los "guardianes de la palapa" Coynta Green (Cocorita), Miguel Jácome (Flaquito), Rosa María Morelos (Rosi); David Vega, Ro Nogales, Cristian (Guate) Estrada, Toñito

Estrada, Lalo Toyes y Melissa Fragoso, Píndaro Álvarez, Lia Aguilar y Karlita Nuño (hermanita oveja negra). Gracias por hacer de familia aquí en La Paz, por su amistad, cariño inmenso, risas, charlas, juegos, discusiones, fiestas, días de playa, por entender que “no soy normal”, aguantar mis “puteadas” que fueron sin lugar a dudas muchas!. Gracias a todos por los momentos compartidos.

Especialmente, quiero agradecerte a vos Coy (y a tu familia también); sin tu gran amistad, apoyo, cariño y aguante a mi locura galopante de verdad amiga, este doctorado no hubiera sido posible. Gracias por estar de forma incondicional.

A Hever Latisnere (Embajador), gracias por tu amistad, asilo, colaboración técnica, por las largas charlas, por siempre estar de “acuerdo conmigo” y porque ya sabes, lo que no “sabes lo inventas”. Fuiste de gran ayuda en todo este proceso.

A los amigos de La Paz, que han sido familia: especialmente a Cyro Calderón (mi querido vecino) por las charlas e inolvidables risas. A Mario Pardo y Geraldine Busquets, Rebeca Sánchez y Luis Salcido, gracias por los geniales e importantes momentos compartidos, esos que son esenciales para hacer nuestras vidas más bonitas. A Emilio Beier y su esposa Rebeca, gracias por considerarnos a Fito y a mí como parte de su familia, por su apoyo y gran cariño, las navidades y paseos compartidos.

A los compañeros del Tocho, que me dejaron golpear, descargar y rezongar, aunque nunca aprendía a jugar. Gracias por sus risas y amistad, especialmente a Ariel Cruz (largas charlas y risas que me ayudaron tanto, gracias por tus porras), March Vélez por su cariño especial, a Amaury Cordero, Oswaldo, Rafa Cabral, Fausto Valenzuela, Luisito Lyva, Manuel Moreno, Erick Núñez y Julio Hernández y si alguno se me olvidó, ojalá sepa disculpar.

A la comunidad uruguaya, pedacito del paisito, a Gastón el “coto” quien supo dar apoyo y amistad cuando recién pisaba La Paz, a la Estancia uruguaya, Alejandra Salles, Gerardo y Familia. A Paula Costa y Rafa Álvarez (por traerme a la “muchacha”).

A la Familia del “Salsi”, primeros cariños recibidos en México, gracias a Carmen y Rafa Rodríguez, por los bonitos momentos compartidos.

A las compañeras de Laboratorio, Oney Román, Carolina Garciglia y Patty Parilla, gracias por su ayuda y hacer mis días “experimentales” tan amenos.

Al personal del laboratorio de Cultivo de Moluscos (CIBNOR), particularmente a Pablo Ormart, por su buena disposición, amabilidad y colaboración en el trabajo con los ostiones.

A los técnicos Ángel Carrillo por sus invaluable “prestamos”, apoyo incondicional y colaboración. A Carmen Rodríguez (Histología y su personal) y Neftalí Gutiérrez por su apoyo en procesamiento de muestras y colaboración con reactivos.

Un agradecimiento particular a Miguel Robles, por su buena disposición y buena onda, por su colaboración en la recolección de muestras. A él y el personal de la Acuacultura Robles y Cuate Machado, cuya colaboración fue indispensable para la realización de esta tesis. A Trinidad por su trabajo en campo.

A todo el personal del CIBNOR (choferes, guardias, personal de limpieza) que de una manera u otro ha sabido colaborar con el buen término de este doctorado. Especialmente a Horacio Sandoval, por su enorme paciencia, excelente disposición, jamás un “no” por respuesta, su inagotable colaboración y buena vibra. A La Dra. Elisa Serviere, quien supo resistir mis peores momentos y colaboró con el buen término de este doctorado. A oficina de postgrado Osvelia Ibarra, Leticia Rubio, Tania Valdez. Con especial cariño quiero agradecer por su preocupación y apoyo, a Claudia Olachea, Guadalupe Sánchez, Betty Galvéz y Manuel

(Laboratorio de Cómputos). A los choferes, que nunca me dejaron tirada y con su gran amabilidad me trajeron sana y salva al CIB, Heraclio De la Peña, Beto Salgado, Benjamín Bareño y Pilar Lucero.

A los Investigadores, Pedro Cruz, Humberto Mejía, Ángel Campa y Dariel Tovar, que prestando reactivos o apoyando con conocimientos colaboraron con la realización de esta tesis. Un cariñoso agradecimiento a Enrique Morales Bojórquez, quien me regaló horas de su descanso enseñándome estadística y colaboró de manera incondicional al buen término de este doctorado.

A Ricardo Vásquez (en especial por las largas charlas intentando mejorar al mundo) y Felipe Ascencio, a ambos por aguantarme, por aceptar ser mis directores de tesis en un momento tan complicado. A ellos y Thelma Castellanos, por su buena disposición, enorme comprensión y colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A Jaime Romero, un cariñoso agradecimiento, por su gran apoyo incondicional, por recibirme en Chile, por aceptarme sin conocerme, por sus incontables y valiosos aportes académicos y profesionales. Aprovechando quiero agradecer también, a los compañeros del laboratorio de Biotecnología del INTA (Universidad de Chile), por hacerme un lugarcito y por su compañía. Especialmente, quiero agradecer a Victoria Urzúa por el cariño inmenso y ayuda inigualable. También a Alejandra Givovich, Claudia Henríquez, Gastón Higuera, Rafael Torres y Rafael Opazo, Felipe Ortuzar, Fernanda Jiménez, Carolina Ilabaca y Carolina Ramírez.

Por último, quiero agradecer de forma muy especial y con mucho cariño a José Manuel Mazón-Suástegui y su hermosa familia. Gracias Manolito, por tu incomparable apoyo en todo este proceso, por ser mi “sicólogo”, por tu cariño inagotable, por aguantar los innumerables

llantos, por saber conversar y dar buenos consejos, por ayudarme a no abandonar y por tu apoyo académico. Por todo ello, este logro es compartido.

Al programa de estudios de Postgrado del CIBNOR, por apoyar mi formación académica y al personal del centro por todas las facilidades e infraestructura. Al Consejo de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por otorgarme una beca (106887) y apoyo económico mediante el Proyecto SEP-CONACYT 129025, lo que permitió realizar este estudio de postgrado.

Finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas que de una manera u otra colaboraron en el desarrollo de este proceso y que sin intención he olvidado mencionar.

Con todo cariño, GRACIAS...

“El buen andariego sabe que el gran viaje es el de la vida y requiere compañeros”

Helder Cámara

CONTENIDO

Introducción	1
Antecedentes	3
Ostreidos importantes para la Acuicultura en México.....	3
Microbiota Bacteriana en Moluscos Bivalvos: Definición e Importancia.....	5
Composición de la microbiota y su dependencia con el ambiente.....	9
Microbiota Arquea asociada a Ostreidos.....	13
Justificación	14
Objetivos	16
Hipótesis	16
Materiales y Métodos	17
Diseño experimental, producción y recolección de muestras.....	18
Características de los sitios de cultivo utilizados para la engorda de los ostiones.....	22
Temperatura y salinidad en los sitios de cultivo.....	23
Preparación y depuración de las muestras.....	23
Disección.....	25
Extracción de ADN.....	26
Análisis <i>in silico</i> de los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR la región variable del gen <i>16S ARNr</i>	26
Amplificación por PCR del gen <i>16S ARNr</i> Bacteriano.....	27
Determinación de la Variación de la Microbiota Bacteriana Residente, mediante análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) – PCR <i>16S ARNr</i>	27
Análisis de Similitud de la Microbiota Bacteriana según los perfiles obtenidos por RFLP-PCR <i>16S ARNr</i>	28
Análisis estadístico de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR <i>16S ARNr</i> Bacteriano.....	29
Identificación de la Microbiota Bacteriana mediante Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE) y Secuenciación.....	30
Determinación de la Composición y Diversidad de la Microbiota Procariota asociada a Ostreidos mediante Pirosecuenciación del gen <i>16S ARNr</i>	31
Diversidad de la Microbiota Asociada.....	38

Resultados	41
Características de las muestras analizadas y condiciones de los sitios cultivo.....	41
Calidad de la extracción de ADN.....	43
Elección del par de iniciadores utilizados para amplificar el gen <i>16S ARNr</i>	48
Comparación de la microbiota bacteriana según estado de desarrollo y sitio de cultivo mediante el análisis de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR <i>16S ARNr</i>	53
Análisis de similitud entre la microbiota bacteriana asociada a las semillas de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> según los perfiles obtenidos por RFLP-PCR <i>16S ARNr</i>	54
Variación de la microbiota bacteriana entre juveniles y adultos de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> en los diferentes sitios de cultivo según los perfiles obtenidos por RFLP-PCR <i>16S ARNr</i>	58
Análisis de la estabilidad de la microbiota asociada a las semillas de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> cuando son trasplantadas a los sitios de engorda.....	62
Determinación de la composición de la comunidad bacteriana asociada a <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> mediante TGGE-PCR <i>16S ARNr</i>	64
Estimación de la composición y diversidad de la comunidad bacteriana y arquea asociada a <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. sikamea</i> y <i>C. corteziensis</i> mediante pirosecuenciación del gen <i>16S ARNr</i>	69
Preparación de la librería de amplicones de Bacteria y Arquea.....	69
Eficiencia y calidad de la pirosecuenciación de la librería de amplicones bacteriano.....	72
Estimación del esfuerzo de muestreo para los resultados de pirosecuenciación de la librería genética <i>16S ARNr</i> de bacterias.....	76
Composición y diversidad de la comunidad bacteriana asociada a <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	79
Eficiencia y calidad de la pirosecuenciación de la librería de amplicones de	105

Arqueas	
Composición de la comunidad Arquea asociada a <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	108
Discusión	110
Consideraciones metodológicas.....	110
Similitud de la microbiota bacteriana asociada a semillas de Ostreidos.....	116
Variación de la microbiota bacteriana asociada a Ostreidos una vez incorporada la semilla en los diferentes sitios de cultivo.....	118
Variabilidad intraespecífica de la microbiota bacteriana asociada a <i>Crassostrea</i> <i>gigas</i>	121
Descripción de de la microbiota bacteriana asociada al tracto gastrointestinal de ostreidos y diferencias encontradas según etapa de crecimiento y sitio de cultivo. ..	121
Diferencias entre la microbiota bacteriana asociada a organismos depurados y no depurados: descripción de la posible microbiota residente y transiente.....	132
Bacterias patógenas asociadas a la microbiota residente de los Ostreidos.....	135
Composición de la comunidad Arquea asociada a ostreidos.....	138
Consideraciones finales: Posible rol de la microbiota residente asociada a estos ostreidos y perspectivas futuras.	139
Conclusiones	147
Bibliografía	149
Anexo I. Artículo publicado	171
Anexo II. Artículo Sometido	189

LISTA DE FIGURAS

1. Resumen de la metodología general empleada en esta investigación.....	17
2. Ubicación geográfica del laboratorio y sitios de cultivo de donde fueron recolectadas las muestras de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	18
3. Sistemas de cultivo utilizados para la engorda de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	21
4. Parámetros biométricos utilizados en Ostreidos.....	23
5. Proceso de depuración de <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	24
6. Detalle de la anatomía interna de Ostreidos.....	25
7. Esquema general del diseño experimental para realizar la pirosecuenciación de las librerías <i>16S ARNr</i> de Bacteria y Arquea.....	33
8. Diseño de los <i>primers</i> de fusión utilizados para la pirosecuenciación.....	34
9. Temperatura superficial del mar (TSM) registrada en los sitios de cultivo durante el período de engorda de juveniles y adultos de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. sikamea</i> y <i>C. corteziensis</i>	42
10. Apariencia externa e interna de los ostreidos recolectados.....	45
11. Determinación de la integridad del ADN extraído desde Ostreidos, utilizando tres procedimientos diferentes: Sweijd <i>et al.</i> , 1998; QIAmp (Qiagen) y Sambrook <i>et al.</i> , 1989.....	46
12. Determinación por <i>PCR</i> múltiple (genes <i>28S ADNr</i> ostreidos y <i>16S ADNr</i> Bacteria) de la ausencia de inhibidores para la amplificación del ADN extraído desde juveniles de <i>Crassostrea corteziensis</i> y <i>C. gigas</i>	47
13. Análisis <i>in silico</i> que muestra el alineamiento cruzado del primer 907R con genes de Ostreidos.....	51
14. Amplificación por <i>PCR</i> de la región variable V3-V6 <i>16S ARNr</i> bacteriano a partir del ADN total extraído de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i>	53
15. Perfiles obtenidos mediante RFLP- <i>PCR</i> <i>16S ARNr</i> bacteriano a partir ADN proveniente de semillas de <i>Crassostrea corteziensis</i>	54
16. Dendograma representado la similitud (Cs (%)) observada a partir de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP- <i>PCR</i> <i>16S ARNr</i> bacteriano para SEMILLAS de <i>Crassostrea corteziensis</i> y <i>C. gigas</i>	56

17. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la comparación de los perfiles RFLP del gen <i>16S ARNr</i> de semillas de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i>	57
18. Dendograma representado la similitud (Cs (%)) observada a partir de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR <i>16S ARNr</i> bacteriano en juveniles de <i>Crassostrea corteziensis</i>	59
19. Dendograma representado la similitud (Cs (%)) observada a partir de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR <i>16S ARNr</i> bacteriano en juveniles de <i>Crassostrea giga</i>	60
20. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la comparación de los perfiles RFLP del gen <i>16S ARNr</i> entre juveniles y adultos de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> en dos sitios de cultivo diferente.....	61
21. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la comparación de los perfiles RFLP del gen <i>16S ARNr</i> de semillas vs juveniles en un mismo sitio de cultivo.....	63
22. Elaboración del estándar utilizado como referencia en los ensayos de TGGE...	64
23. Perfiles obtenidos por TGGE-PCR <i>16SADNr</i> a partir de semillas de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i>	65
24. Perfiles de restricción obtenidos con enzima <i>AluI</i> , para bandas cortadas desde los geles de TGGE	66
25. Composición bacteriana (%) de la microbiota asociada a ostreidos obtenida a partir de las bandas del TGGE y secuenciación de la región V3-V6 <i>16S ARNr</i>	68
26. Amplificación por PCR de los genes <i>16S ARNr</i> de Bacteria y Arquea para muestras de ADN de adultos de <i>Crassostrea gigas</i> engordados en Bahía Topolobampo (MID 8).....	70
27. Amplificación por PCR utilizando los <i>primers</i> de fusión para pirosecuenciación de los genes <i>16S ARNr</i> para muestras de ADN de adultos de <i>Crassostrea corteziensis</i> , depurados y engordados en Bahía Magdalena (MID 2).	71
28. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la librería de amplicones para el gen <i>16S ARNr</i> de Arquea y Bacteria.....	72
29. Cuantificación por fluorescencia y remoción de fragmentos cortos de ADN del pool de amplicones del gen <i>16S ARNr</i> de Bacteria presentes en <i>Crassostrea gigas</i> ,	73

<i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	
30. Resultado de la corrida de pirosecuenciación para la librería de amplicones del gen <i>16S ARNr</i> Bacteriano de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	74
31. Eficiencia en la asignación taxonómica de las lecturas obtenidas por pirosecuenciación de la librería <i>16S ARNr</i> de Bacteria asociadas a la microbiota de Ostreidos.....	76
32. Curva de rarefacción de los resultados de la pirosecuenciación de la librería <i>16S ARNr</i> Bacteria para <i>Crassostrea corteziensis</i>	77
33. Curva de rarefacción de los resultados de la pirosecuenciación de la librería <i>16S ARNr</i> Bacteria para <i>Crassostrea gigas</i>	78
34. Curva de rarefacción de los resultados de la pirosecuenciación de la librería <i>16S ARNr</i> Bacteria para <i>Crassostrea sikamea</i>	78
35. Curva de Acumulación de Géneros identificados mediante pirosecuenciación de librería <i>16S ARNr</i> Bacteria de Ostreidos.....	79
36. Abundancia Relativa de Phylum bacterianos encontrados en semillas de Ostreidos.....	81
37. Abundancia Relativa de Phylum bacterianos encontrados en ostiones adultos en diferentes sitios de engorda.....	82
38. Abundancia Relativa de Phylum bacterianos encontrados en ostiones adultos depurados y no depurados cultivados en Bahía Magdalena.....	83
39. Abundancia Relativa de las Clases de Proteobacterias, identificadas mediante pirosecuenciación de la librería de genes <i>16S ARNr</i> , para las tres especies de Ostreidos depurados.....	85
40. Abundancia Relativa de las Clases de Proteobacterias, identificadas mediante pirosecuenciación de la librería de genes <i>16S ARNr</i> , para las tres especies de Ostreidos depurados vs No depurados engordados en Bahía Magdalena.....	86
41. Géneros de Proteobacterias componentes de la Microbiota residente asociada a semillas de <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	92
42. Géneros de Proteobacterias componentes de la Microbiota residente asociada a adultos de <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i> en dos sitios de engorda.....	93
43. Comparación de los Géneros de Proteobacterias componentes de la Microbiota	94

asociada a ADULTOS de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* en muestras depuradas y no depuradas engordados en Bahía Magdalena

44. Géneros de Actinobacteria componentes de la Microbiota residente asociada a <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	95
45. Comparación de los Géneros de Actinobacteria componentes de la Microbiota asociada de muestras depuradas y no depuradas de <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i> cultivados en Bahía Magdalena.....	96
46. Géneros de Bacteroidetes componentes de la Microbiota residente asociada Semillas de <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	97
47. Géneros de Cyanobacterias encontrados en la Microbiota asociada a <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i> de organismos no depurados.....	98
48. Diagrama de Venn que resume los géneros bacterianos detectados en organismos Depurados (D) y en los No Depurados (NOD) en adultos de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i> cultivadas en Bahía Magdalena...	99
49. Diagrama de Venn que resume los componentes bacterianos principales asociados a la microbiota residente de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	100
50. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la microbiota asociada a <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	103
51. Cuantificación por fluorescencia del pool de amplicones del gen <i>16S ARNr</i> de Arqueas presentes en <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	105
52. Resultado de la corrida de pirosecuenciación para la librería de amplicones del gen <i>16S ARNr</i> Arquea de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	106
53. Resultado de la amplificación cruzada para el gen <i>18S ARNr</i> de Ostreidos identificado mediante la pirosecuenciación de la librería del gen <i>16S ARNr</i> Arquea de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. corteziensis</i> y <i>C. sikamea</i>	107

LISTA DE TABLAS

I. Listado de los <i>primers</i> usados para generar el pool de amplicones de Arquea y Bacteria.....	37
II. Biometría, lugar de procedencia y número de muestras recolectadas	41
III. Comparación de la concentración y pureza promedio del ADN extraído desde tejido de ostión utilizando tres protocolos diferentes.....	46
IV. Alineamiento <i>in silico</i> para determinar el primer específico óptimo para amplificación de la región variable del gen <i>16S ARNr</i> Bacteriano.....	50
V. Alineamiento <i>in silico</i> para determinar el mejor <i>primer</i> específico para amplificación del gen <i>16S ARNr</i> Arquea a usar en esta investigación.....	52
VI. Resumen de los Coeficiente de similitud (Cs, %) obtenido de los perfiles del RFLP de la microbiota asociada a <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> cuando se comparan etapa de crecimiento y sitio de cultivo.....	55
VII. Resumen de los Coeficiente de similitud (Cs, %) obtenido de los perfiles del RFLP de la microbiota asociada a semillas vs los juveniles de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> en un mismo sitio de cultivo.....	63
VIII. Identificación de las secuencias de la obtenidas a partir de las bandas cortadas del TGGE-PCR <i>16SARNr</i> bacteriano utilizando la base de datos de RDPII.....	67
IX. Rendimiento de la pirosecuenciación de la librería de amplicones <i>16S ARNr</i> bacteriano obtenida de <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	75
X. Abundancia Total de Phylum Bacterianos identificados mediante pirosecuenciación de la librería de amplicones <i>16S ARNr</i> de Ostreidos.....	80
XI. Abundancia Total de Géneros bacterianos asociados a la microbiota residente en semillas de Ostreidos.....	88
XII. Abundancia Total de Géneros bacterianos asociados a la microbiota residente en adultos de Ostreidos.....	90
XIII. Abundancia Total de Géneros bacterianos asociados a la microbiota en adultos depurados y no depurados de Ostreidos cultivados en Bahía Magdalena...	91
XIV. Análisis de Diversidad de la microbiota bacteriana asociada a Ostreidos.....	102
XV. Potenciales patógenos bacterianos asociados a la microbiota residentes de	104

Crassostrea gigas, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.....

XVI. Rendimiento de la pirosecuenciación de la librería de amplicones <i>16S ARNr</i> Arquea obtenida de <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	108
XVII. Composición de la comunidad Arquea asociada a Ostreidos.....	109
XVIII. Comparación de la microbiota asociada a Ostreidos respecto a antecedentes publicados	142

INTRODUCCIÓN

Los ostreidos, son los moluscos bivalvos de mayor producción acuícola a nivel mundial (FAO, 2009). Son animales ideales para la acuicultura porque requieren un manejo mínimo y no necesitan más alimento que las microalgas que se encuentran de forma natural en el agua de mar (Helm *et al.*, 2006). Su cultivo se ha extendido por todo el mundo gracias a que se conoce su biología y se han aprovechado dos de sus características fundamentales: alto índice de fecundidad y capacidad de sobrevivir fuera del agua, lo que hace posible su transporte en seco a grandes distancias (Helm *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008). Se tiene dominado el ciclo de vida completo de varias especies de ostiones, a través de su reproducción artificial y la producción intensiva de larvas y semilla en ambiente controlado de laboratorio (Loosanoff & Davis, 1963; Martin & Hall, 2006). Sin embargo, uno de los problemas principales en la ostricultura, son los episodios repetitivos de mortalidad que reducen seriamente la producción. Estos brotes infecciosos afectan en la fase de larva y post larva (semillas) en los criaderos y también afecta a juveniles y adultos cultivados en el medio ambiente natural. En algunos casos, los estudios han demostrado enfermedades de etiología bacteriana, como nocardosis, vibriosis y las infecciones por *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Rickettsia* (Bower & McGladdery, 2003; Lafferty *et al.*, 2004; Paillard *et al.*, 2004; Renault & Cochenec, 1995; Romalde & Barja, 2010; Thompson *et al.*, 2005).

Los ostreidos son animales sedentarios y de régimen alimentario exclusivamente filtrador, sus branquias cubiertas de mucus y cilios vibrátiles, además de cumplir con la función respiratoria, retienen las partículas en suspensión, entre ellas, bacterias y virus (Di Girolamo *et al.*, 1977; Beuret *et al.*, 2003). La presencia constante de bacterias en los tejidos de moluscos bivalvos se considera un fenómeno natural debido a su capacidad de filtrar diferentes partículas y por ello concentran en sus órganos una mayor carga de microorganismos en comparación con otros animales marinos (Harris, 1993; Prieur *et al.*, 1990; Araya *et al.*, 1999). Debido a que los ostiones pueden concentrar microorganismos patógenos, su microbiota se ha examinado, principalmente, en lo que respecta a salud pública y se han centrado en el estudio sobre la contaminación fecal, patógenos entéricos y especies patógenas de *Vibrio* (Depaola *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2001; Lafferty *et al.*,

2004; Najiah *et al.*, 2008; Rippey, 1994; Thompson *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2004a y 2004b). Se ha visto, que gran parte de los brotes epidémicos causados por intoxicación o infección alimentaria provienen de consumir moluscos bivalvos contaminados con virus y/o bacterias patógenas (Metcalf *et al.*, 1979, Rippey, 1994). Esta particularidad, aunada a que estos organismos son generalmente consumidos crudos o parcialmente cocidos, aumenta la probabilidad de infección (Lafferty *et al.*, 2004; Rippey, 1994).

Por estas razones, se ha prestado poca atención a la microbiota asociada a estos organismos en ausencia de infección y de su potencial rol benéfico. Se conoce muy poco sobre la composición de la microbiota en ostreidos y la función que puedan cumplir en su asociación con estos animales. Se sabe poco de su variación según etapa de crecimiento del ostión, o de los cambios relacionados con el hábitat donde estos moluscos se desarrollan. La microbiota cumple una función primordial como barrera protectora contra la colonización por potenciales patógenos, es muy importante para la salud y la nutrición de los animales, por lo que conocer su composición es substancial para el desarrollo sostenible de la ostricultura.

ANTECEDENTES

Ostreidos importantes para la Acuicultura en México

Actualmente se tiene dominado el ciclo de vida de los ostreidos a través de la producción artificial de larvas y semilla y de la reproducción y mantenimiento de reproductores (Loosanoff & Davis, 1963; Martin y Hall, 2006) que permiten compensar las deficiencias en la colección natural (Martin & Hall, 2006). El desarrollo de técnicas para el transporte de larvas y la colección de semilla en charolas de cría permitió incrementar aún más la independencia con respecto a los desoves naturales a nivel mundial (Martin & Hall, 2006).

En México, el cultivo de ostreidos ha tenido un desarrollo creciente en los últimos 30 años, y se han identificado varios ostiones de importancia comercial o con potencial desarrollo mediante su cultivo. Entre ellas destacan: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) conocida vulgarmente como ostra del pacífico u ostión japonés que juega un papel determinante en la producción acuícola en México, *Crassostrea sikamea* (Anemiyama, 1928) ostión importante de producción en Baja California Sur, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) u ostión del placer y *Crassostrea virginica* en el golfo de México. La especie marina más cultivada en el mundo es *C. gigas* de origen asiático y constituye por lo tanto un modelo con importancia económica y de estudio científico representativo de la clase Bivalvia. En México, esta especie fue introducida en Baja California Sur a principios de la década de los 70's, y desde entonces se cultiva en algunos estados del noroeste de la República como Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa. Se han desarrollado efectivamente los sistemas de producción de semilla en laboratorio, y los sistemas de engorda más utilizados son los cultivos en suspensión en línea madre y balsas, los cultivos de fondo en costales sobre "estantes", y camas flotantes (Robles & Salinas, 1993; Mazón, 1996). *Crassostrea sikamea*, conocido a nivel mundial como ostión Kumamoto tiene su origen en el mar de Ariake ubicado en Kyushu, Japón. Se diferencia de *C. gigas* por poseer menor crecimiento, menor tamaño, una válvula izquierda profundamente ahuecada y una concha más arrugada y surcada, sin embargo presenta mejor sabor que el ostión del pacífico y por ello es más apetecible en el mercado (Camara *et al.*, 2008). La introducción del ostión

Kumamoto en México, ocurrió en 1975 para su cultivo a pequeña escala en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa con semilla proveniente de Estados Unidos de América (SAGARPA, 2010), posteriormente se establecieron las condiciones para producción de semilla en laboratorio (Robles & Salinas, 1993).

Recientemente, la especie regional *C. corteziensis*, ha sido objeto de intensivos estudios por su potencial desarrollo en la ostricultura mexicana, principalmente en los estados de Sinaloa y Nayarit (Maeda-Martínez, 2008; Mazón-Suástegui *et al.*, 2008 & 2009; Pérez-Enríquez *et al.*, 2008). Al ser una especie autóctona posee cualidades en cuanto a condiciones de cultivo, adaptabilidad al medio, mayores velocidades de crecimiento y menor susceptibilidad a enfermedades infecciosas locales, que la hacen una alternativa viable, para la ostricultura a nivel regional (Chávez-Villalba *et al.*, 2005; Mazón-Suástegui *et al.*, 2009). Por estas razones, la ostra del placer, ha sido estudiada intensivamente, entre los que destacan investigaciones sobre mejoramiento de dietas suministradas (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008) y factores de crecimiento y supervivencia (Campa-Córdova *et al.*, 2009; Chávez-Villalba *et al.*, 2005).

A pesar de todos los avances realizados en el cultivo eficiente de ostreidos en México, un factor limitante del desarrollo sustentable de la acuicultura es la presencia de enfermedades bacterianas provocadas por patógenos que causan mortandades masivas (Maeda, 2008). A partir de 1997, se comenzaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva de ostión, principalmente de *C. gigas*, que incluían semillas, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur (Cáceres & Vázquez, 2003; Vázquez-Yomans *et al.*, 2004). O como el caso del cultivo de *C. corteziensis* en el estado de Sonora, que en el año 2002 sufrió un colapso en su producción por mortandades masivas, causada probablemente por una bacteria o virus que hasta hoy, sigue sin ser identificado (Maeda, 2008).

Esto además, ocasiona desconfianza en el consumidor por el estado sanitario de estos moluscos, que pueden transmitir importantes enfermedades infecciosas. La falta de conocimiento sobre la interacción bacteria-huésped para el control del crecimiento y estado nutricional de estos animales y del conocimiento de potenciales patógenos en especies

nativas o cultivadas en México, es evidente, y se refleja en los altos índices de mortandades o deficiencias en el crecimiento de larvas, postlarvas y juveniles producidos en *hatchery*. A excepción del trabajo realizado por Hernández & Olmos, 2006 en *Crassostrea gigas*, el desconocimiento de la composición de microbiota asociada a ostreidos importantes en la acuicultura mexicana es completo.

Microbiota Bacteriana en Moluscos Bivalvos: Definición e Importancia

Los animales marinos portan una gran cantidad de microorganismos que puedan llegar a formar complejas comunidades, especialmente en el tracto intestinal. Se conoce como microbiota normal, a aquella población de microorganismos que no causa daños al hospedero a pesar de estar en continuo contacto con sus tejidos. Debido a que los ostiones son filtradores, sus branquias cubiertas con moco y cilios que facilitan la respiración simultáneamente atrapan partículas suspendidas, incluyendo bacterias y virus (Prieur *et al.*, 1990). Esta característica, hace que en los moluscos bivalvos, puedan describirse dos categorías de microbiota bacteriana normal: (1) microbiota autóctona o residente, donde la comunidad bacteriana permanece relativamente estable en el tiempo y no cambia con las bacterias ingeridas por el huésped, está compuesta de tipos relativamente fijos de microorganismos y si se les perturba, tienden espontáneamente a recuperarse con rapidez, y (2) la microbiota transitoria o no autóctona, está formada por microorganismos potencialmente patógenos que se ingieren con los alimentos, sobreviven el paso por el intestino (posiblemente puedan proliferar allí) y se eliminan con las heces (Berg, 1996; Harris, 1993; Moriarty 1990 y 1997). La microbiota residente, permanentemente ocupa el intestino del hospedador, pocas veces es eliminada por las heces, presumiblemente porque posee atributos como la adhesión a la pared del intestino. La microbiota transiente es ingerida con el alimento, sobrevive su paso por el intestino, probablemente prolifere allí, pero luego es expulsada por las heces. Adicionalmente, otros autores han sugerido que la microbiota autóctona es aquellas integradas por poblaciones naturales, bacterias residentes y las ingeridas con la dieta y la alóctona, que normalmente no se establecen en el hospedero a excepción de situaciones bajo perturbaciones y a menudo estar representada por microorganismos patógenos (Harris, 1993, Romero *et al.*, 2003). La naturaleza de la

relación entre los bivalvos y su microbiota aún no está clara. La disputa principal es identificar si las bacterias son residentes (simbióticas) o transitorias (adquiridas por su hábito alimenticio) (Grizzle & Brunner 2009) y la mayoría de las veces, al estudiar la microbiota en estos organismos marinos esta distinción no se realiza (Harris, 1993). Garland *et al.*, 1982, informaron de que los microorganismos no se adherieron al moco o la superficie epitelial en las branquias de adultos sanos de *Crassostrea gigas*, aún cuando estas fueron alimentadas con bacterias (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas*, *Alteromonas macleodii*). Las imágenes de microscopía electrónica revelaron que únicamente se detectaron bacterias en el intestino medio y ciego donde las bacterias eran residentes mientras que en los cilios y epitelio la comunidad bacteriana era transitoria. Es claro, por tanto, que la microbiota intestinal no siempre puede ser tratada como una única comunidad, en particular, diferentes tipos de asociación tienen distintas consecuencias para el hospedero. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos en los que las bacterias han sido reportadas en los intestinos de los invertebrados acuáticos, la naturaleza del estudio no permite determinar qué tipo de asociación existente entre los microbios y el anfitrión (Harris, 1993). Esta distinción entre microbiota transiente o residente en ostreidos, aún se mantiene sin resolver y las funciones de cada una de ellas rara vez se investigan.

La investigación en invertebrados acuáticos ha sugerido una variedad de funciones benéficas de la microbiota: (1) aumento en la capacidad de digerir el alimento, (2) fuente de vitaminas, enzimas y ácidos grasos esenciales para el huésped, (3) colonización del sistema digestivo donde compiten con microorganismos patógenos por nutrientes y espacio, (4) remoción de algunos desechos tóxicos, (5) provisión de factores de crecimiento en larvas, (6) estimulación del sistema inmune y (7) producción de sustancias inhibidoras de agentes patógenos (Austin, 2006; Erasmus *et al.*, 1997; Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil, 2000; Harris, 1993; Marques *et al.*, 2006; Moriarty, 1990; Nayak, 2010; Prieur *et al.*, 1990; Rawls *et al.*, 2004; Ringo & Birkbeck, 1999; Savage, 1977). Un aumento de la susceptibilidad a las infecciones, puede estar relacionado con la falta de la barrera proporcionada por la microbiota que compite con los microorganismos patógenos por los nutrientes y el espacio

en el tracto intestinal (Avedaño *et al.*, 2001b; Marques *et al.*, 2006; Moriarty, 1991 y 1997) o por producir sustancias que inhiben los patógenos (Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Playne, 1995).

Un experimento muy interesante sobre el posible rol de la microbiota, fue realizado por Douillet y Langdon (1993), quienes examinaron los efectos de la adición de 21 cepas diferentes de bacterias marinas a cultivos axénicos de *Crassostrea gigas*. Las cepas habían sido aisladas de diferentes sitios en una incubadora, incluyendo los alimentos y microbiota asociada a las larvas y adultos. Los autores informaron que cultivos de larvas de *C. gigas* experimentaron un aumento en la tasa de crecimiento y sobrevivencia, cuando se adicionó las bacterias al cultivo, en comparación con las tasas de crecimiento de larvas en condiciones axénicas.

Durante el periodo de desarrollo larvario, parte de la microbiota transitoria se vuelve rápidamente en la constituyente de la microbiota residente (Brown, 1973; Kue y Chang, 1985; Jorquera *et al.*, 2002; Moriarty 1990 & 1997; Prieur *et al.*, 1990). Diversos estudios han demostrado la importancia de los microorganismos en el desarrollo de larvas. Por ejemplo, previo al asentamiento de las larvas a un sustrato, se requiere de bacterias que estimulen e inducen dicho asentamiento (Maki *et al.*, 1990; Pearce & Bourget 1996). Experiencias realizadas en larvas de bivalvos han demostrado que las bacterias participan en procesos de digestión de las microalgas mediante la producción de enzimas extracelulares como proteasas y lipasas (Brown, 1973; Prieur *et al.*, 1990). También la digestión de algunas bacterias aumentan la tasa de crecimiento de larvas y post-larvas (Brown *et al.*, 1996; Riquelme, 1997).

No obstante, existe muy escaso conocimiento sobre la dinámica y la estabilidad de la microbiota en juveniles y adultos, aunque es reconocido que la madurez en la fisiología del organismo marino puede influir en la composición de la microbiota intestinal (Harris, 1993; Prieur *et al.*, 1990). En los moluscos bivalvos, las bacterias se han reportado en el sistema gastrointestinal (Harris, 1993; Kue & Chang, 1985; Moriarty, 1990; Prieur *et al.*, 1990). Algunos estudios han establecido su presencia, en el estilo (Margulis *et al.*, 1991), la

glándula de Deshayes (Imam *et al.*, 1990), esófago (Payne *et al.*, 1970 en Harris, 1993), el estómago (Prieur, 1981) y el intestino (Prieur, 1981). Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de los estudios, principalmente los más recientes, han reportado la composición de la microbiota realizando un homogenado tisular del ostión completo sin depurar y usando técnicas cultivo dependiente (Harris, 1993; LaValley *et al.*, 2009; Pujalte *et al.*, 1999). Esto no ha permitido establecer la localización o región donde colonizan los componentes de la microbiota residente y tampoco diferenciarlas de aquellas bacterias que solo están de paso (microbiota transitoria) (Harris, 1993).

La acumulación de microorganismos en el sistema digestivo de moluscos ostreidos es muy difícil de evitar, aún durante los procesos de limpieza o depuración. Se ha visto que gran parte de los brotes epidémicos en humanos, son causados por intoxicación o infección alimentaria provienen de consumir moluscos bivalvos contaminados con virus y/o bacterias entéricas debido a que las aguas en las cuales crecen estos animales, pueden encontrarse expuestas al aporte de efluentes con materia fecal (Rippey, 1994; Scott, 1994; Brands *et al.*, 2005). Esta particularidad, aunada a que estos organismos son consumidos crudos o parcialmente cocidos, aumenta la probabilidad de infección (Rippey, 1994; Lafferty *et al.*, 2004). No solo estas condiciones implican un riesgo para la salud humana, sino que también constituyen un riesgo potencial considerable para el desarrollo eficiente del cultivo de moluscos, aunque el impacto de los patógenos es variable y depende en gran medida de la edad de los animales. La mayoría de las enfermedades causadas por protozoarios afectan a animales adultos mientras que las enfermedades de etiología viral o bacteriana afectan esencialmente, a larvas y juveniles. La vigilancia zoonosológica de las reservas de semilla, reproductores y organismos a ser comercializados es indispensable para reducir los riesgos de mortalidad masiva (Martínez & Montoya, 2003). Resulta indispensable distinguir claramente a los patógenos de humanos que son transmitidos por estos moluscos, de los microorganismos que afectan directa y específicamente a las poblaciones naturales o cultivadas de moluscos bivalvos (Jahncke *et al.*, 2002). Las infecciones causadas por consumo de alimentos contaminados son la mayor causa de hospitalización y morbilidad a nivel mundial y los ostiones son los que ocupan el primer lugar como organismos

transmisores de agentes infecciosos (Thompson *et al.*, 2005). Los brotes epidémicos causados por el consumo de ostiones, no solo afectan y causan mortalidad a niños y adultos de todo el mundo, sino que también generan cuantiosas pérdidas económicas en la ostricultura (Rippey, 1994; Wittman & Flick, 1995; Boettcher *et al.*, 2000; Lafferty *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005).

Por otro lado, en los últimos años, se ha incorporado a la acuicultura, el uso de cepas bacterianas antagonistas (probióticos) para controlar las altas concentraciones de microorganismos potencialmente patógenos por exclusión competitiva. Esto ha ayudado a disminuir y prevenir brotes epidémicos en varias especies marinas (Vanbelle *et al.*, 1990; Moriarty, 1997; Riquelme *et al.*, 1997, 2000, 2001; Gibson *et al.*, 1998; Hansen & Olfasen, 1999; Gómez-Gil, 2000; Devaraja *et al.*, 2002). No obstante, muchas veces el fracaso de la utilización de probióticos se debe al desconocimiento del tipo de interacción que tienen con la microbiota autóctona y por otro lado ocurre que estas últimas terminan desplazando a la cepa con actividad probiótica (Playne, 1995; Moriarty, 1997; Gibson *et al.*, 1998). Derivado de lo anterior, se considera crucial la necesidad de conocer la composición de la diversidad bacteriana presente en los organismos y las complejas interacciones entre ellos, para poder utilizar de manera más eficiente los probióticos en la acuicultura.

Composición de la microbiota y su dependencia con el ambiente

La composición de la microbiota en un determinado hospedero, probablemente depende de las propiedades del hospedero, su historial de contactos con bacterias colonizadoras, su dieta y las condiciones ambientales que prevalecen en su hábitat (Harris, 1993; Gatesoupe, 1999; Savage, 1977). Diversos estudios, señalan que la colonización por parte de algunas bacterias a nivel gastrointestinal, especialmente en moluscos filtradores, tiene una particular dependencia del medio externo, situación que está relacionada con el flujo de agua que pasa por el tracto digestivo de estos organismos (Gatesoupe, 1999; Harris, 1993; LaValley *et al.*, 2009; Prieur *et al.*, 1990; Pujalte *et al.*, 1999). Al mismo tiempo existe evidencia de que muchos invertebrados acuáticos presentan una microbiota permanente y consistente, que difiere de la encontrada en el ambiente donde este se desarrolla, o de la asociada al alimento

que éste ingiere (Harris, 1993), no obstante en Ostreidos no está clara esta evidencia. Teniendo en cuenta, que se ha demostrado que las condiciones ambientales y la estacionalidad pueden alterar la composición de la microbiota bacteriana en algunos invertebrados acuáticos, es probable que el tipo de hábitat influya en la composición de la microbiota intestinal (Gatesoupe, 1999; Harris, 1993; Prieur *et al.*, 1990). En el proceso de cultivo de organismos marinos, varios parámetros ambientales, como la salinidad, temperatura, cantidad de nutrientes y radiación solar pueden influir en la supervivencia y la proliferación de diferentes microorganismos y algunos de ellos pueden afectar directamente su crecimiento (Thompson *et al.*, 2005). Se ha demostrado, que la disminución de la supervivencia de las bacterias enteropatógenas en organismos marinos, está influenciada por la elevada incidencia de luz solar (Hughes, 2003; Rozen & Belkin, 2001), la alta salinidad y el aumento de la temperatura (Anderson *et al.*, 1979; Faust *et al.*, 1975). Lo contrario ocurre con bacterias nativas, como *Aeromonas* donde las bajas temperaturas favorecen su crecimiento. Los nutrientes han demostrado promover la supervivencia de coliformes fecales y bacterias nativas en ostreidos (Thompson *et al.*, 2005). A pesar de esta condición, son escasos los estudios referentes a demostrar los cambios en la microbiota bajo diferentes condiciones ambientales o de cultivo (LaValley *et al.*, 2009; Prieur *et al.*, 1990; Pujalte *et al.*, 1999).

Uno de los pasos más críticos en el cultivo de ostiones, es el traspaso (siembra) de las post larvas (semillas) producidas en laboratorio a los sitios de engorda en el ambiente natural, donde durante este proceso puede un gran número de semillas morir (Bower & McGladdery, 2003; Castillo-Durán *et al.*, 2010; Eckmaye, 1983; Romalde & Barja, 2010). Adicionalmente, a altas densidades de siembra en el campo, la identificación la microbiota residente es importante porque puede ser perturbada y los microorganismos transitorios pueden colonizar, proliferar y producir enfermedades (Moriarty, 1990 & 1997; DePaola *et al.*, 2000). En la ostricultura la presencia de enfermedades bacterianas generadas principalmente, por bacterias oportunistas asociadas a la microbiota causan enormes pérdidas en la producción. Cuando los organismos de cultivo están expuestos a un estrés provocado por: malas condiciones de calidad ambiental, altas densidades de siembra,

alimentación inadecuada o malas técnicas de gestión se generan un desequilibrio fisiológico y ecológico en los animales, causando mortalidades masivas (Ruangpan & Kitao, 1991; Lafferty *et al.*, 2004). Por esta razón, el tracto gastrointestinal de las ostras es el hábitat natural de una gran diversidad de organismos y un amplio rango de ellos están relacionados con bacterias patógenas (Schulze *et al.*, 2006). Organismos comúnmente patógenos entéricos (Grimes *et al.*, 1986), miembros el género *Vibrio*, *Aeromonas* (Dumontet *et al.*, 2000), *Clostridia* (Huss, 1980) y *Listeria* (Colburn *et al.*, 1990), se han encontrado albergados en estos animales. Algunas especies consideradas como contaminación urbana de origen fecal (ej., *Campylobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, y *Yersinia*) han sido reconocidas como contaminantes de estos animales marinos y como una importante causa de los brotes infecciosos asociados al consumo de alimentos (Feldhusen, 2000). Sin embargo, algunas especies como *Salmonella* (Asakura *et al.*, 2002), y *Campylobacter* (Cappelier *et al.*, 1999), han sido detectadas en ambientes donde no existe actividad ni contaminación humana, por lo que han sido consideradas como parte de la microbiota normal. Tradicionalmente, especies de *Vibrios* (Colwell & Liston, 1960; Kelly *et al.*, 1991; Alcina & Anicet, 1994; Colwell & Huq, 1994) y *Pseudomonas* spp. (Murchelano & Brown, 1968; Kueh & Chan, 1985), son los géneros bacterianos predominantes en los aislamientos por cultivo bacteriano (técnicas cultivo dependientes) de tejido de ostiones y considerados como parte de la estructura fundamental de la microbiota bacteriana. En ostiones, la mayor parte de la información disponible, sobre bacterias asociadas, fue realizada usando técnicas cultivo dependiente, a pesar de que una de las características más importantes de las bacterias marinas es ausencia de medios de cultivo que permitan aislarlas (Harris, 1993; Prieur, 1985; Prieur *et al.*, 1990; Pujalte *et al.*, 1999). La mayoría de las investigaciones determinan que el principal grupo bacteriano asociado a los ostreidos son las Proteobacterias (Hernández-Zárate & Olmos-Soto, 2006; LaValley *et al.*, 2009; Prieur *et al.*, 1990; Pujalte *et al.*, 1999). No obstante, en los últimos años los avances de las técnicas de biología molecular basados en el estudio del gen 16S *ARNr* (o técnicas cultivo-independientes) han demostrado que la realidad es un poco diferente (Romero *et al.*, 2002; Hernández-Zárate & Olmos-Soto, 2006), y que lo observado

mediante técnicas tradicionales no refleja a la comunidad bacteriana “real” (Ward *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1993; Schulze *et al.*, 2006). A modo de ejemplo, en un estudio de la microbiota asociada a una especie de ostión chilena, Romero *et al.* 2002, demostraron que ninguna de las dos especies bacterianas que se encuentran en abundancia en dichos ostiones y que fueron detectadas por técnicas moleculares, fueron recuperadas en el cultivo de los macerados en condiciones aerobias, anaerobias o microaerófilicas, ya que solo el 0.01% de ellas fueron aisladas (Romero & Espejo, 2001).

En años recientes, se han realizado algunos estudios sobre la microbiota bacteriana asociada a diferentes ostreidos entre los que se encuentran: *Crassostrea gigas* (Hernández & Olmos, 2006), *Crassostrea virginica* (LaValley *et al.*, 2009), *Saccostrea glomerata* (Green & Barnes, 2010), *Ostrea chilensis* (Romero *et al.*, 2002), *Crassostrea iredalei* (Najiah *et al.*, 2008), *Chama pacífica* (Zurel *et al.*, 2011). En especies de ostras cultivadas en México, se encuentran el trabajo de Hernández y Olmos 2006, que trata de la identificación mediante FISH, de la comunidad bacteriana general en especímenes adultos de *C. gigas* procedentes de una granja de la bahía de Todos Santos en BCS, México. Los resultados de este estudio muestran, que en branquias, glándulas digestivas y gónadas, más del 50% de los microorganismos detectados pertenecían a γ -Proteobacterias y bacterias Gram positivas de bajo contenido en GC mientras que *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* y bacterias Gram + de alto contenido en GC, representaron el porcentaje restante. Sin embargo, a excepción del estudio de Romero *et al.*, 2002, estos informes no distinguen entre las bacterias residentes y las transitorias, lo que puede generar una sobreestimación de la diversidad bacteriana que compone a la microbiota. En organismos marinos y particularmente en aquellos que se encuentran en los cultivos, esta distinción entre la microbiota residente y la transitoria es crucial porque son organismos sujetos a continuas fluctuaciones de su entorno y debido a su forma de alimentación constantemente están acumulando microorganismos que no necesariamente se asientan en sus tejidos (Moriarty 1990; Jorquera *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2002; DePaola *et al.*, 2003).

Microbiota Arquea asociada a Ostreidos

En todos los estudios desarrollados sobre microbiota asociada a moluscos, el dominio Archaea se excluye de la investigación y no existen reportes en la literatura sobre la asociación de estos microorganismos a los ostreidos. Esto puede deberse a tres razones principales: (1) por lo general, se asocia a estos procariontes como organismos ambientales extremófilos y no como parte de la microbiota normal (Lange *et al.*, 2005). (2) porque no existe una clara asociación entre arqueas y estos organismos marinos o algún tipo de rol benéfico. (3) No se dispone aún de métodos que permitan cultivar a la mayoría de la Arqueas (Eckburg *et al.*, 2003).

En los últimos años se ha determinado que las arqueas son parte importante del ecosistema marino, particularmente a nivel costero y en sedimentos marinos (Fuhrman y Ouverney, 1998; DeLong *et al.*, 1999; Pernthale *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2004; Knittel *et al.*, 2005; Kendall *et al.*, 2007; Dong, 2008). Los Grupos marinos I del phylum *Crenarchaeota*, que incluye especies termófilas extremas y el Grupo marino II de las *Euryarchaeota* que incluye termófilos, microorganismos que metabolizan azufre y todos los metanógenos conocidos (DeLong, 2003), son los predominantes en el mar, incluso en mayor diversidad que las bacterias.

En años recientes, gracias al uso de técnicas moleculares, las arqueas se han asociado como parte de la microbiota del tracto digestivo de peces (Van Deer Maarel *et al.*, 1998), de esponjas (Margot *et al.*, 2002, Pape *et al.*, 2006) y langostinos (Shao *et al.*, 2004).

Si las arqueas forman parte importante del ambiente marino y los ostiones son animales filtradores, cabe preguntarse, serán entonces estos microorganismos parte de la microbiota asociada a ostreidos?

JUSTIFICACIÓN

Se cree que la microbiota natural cumple un rol muy importante en cuanto a la protección contra organismos patógenos y estado nutricional de estos organismos marinos. No obstante, poco se sabe de su composición y en el caso de especies de importancia comercial en México como *C. sikamea* y *C. corteziensis* se desconoce por completo. El entendimiento de la diversidad de estos microorganismos asociados a los ostiones, ayudaría a comprender el probable rol de las bacterias en procesos como la digestión o protección contra patógenos y puede ayudar a mejorar los procedimientos del cultivo, aumentando además su productividad y la inocuidad alimenticia para el consumo humano.

La comunidad bacteriana se fija en estadios larvales y se cree que puede variar en las diferentes etapas del desarrollo del ostión, sin embargo, pocos son los estudios que permiten hacer un seguimiento de estos cambios. Conocer estas variaciones podría ayudar a explicar porque algunos de los agentes etiológicos son capaces de afectar a los ostiones en cualquier etapa de su ciclo de desarrollo o solo en alguna en particular. Cuando las semillas son traspasadas al sitio de cultivo y durante el proceso de engorda, los ostiones están expuestos a varias alteraciones provocado por cambios en las condiciones de cultivo, mala calidad ambiental (contaminación, temperaturas extremas, cambios en la salinidad), altas densidades de siembra, alimentación inadecuada (exceso o escases) o malas técnicas de gestión (mala manipulación de los animales por ejemplo no realizar limpiezas periódicas), que inducen estrés en estos organismos. Pese a ello, no se ha estudiado cómo las diferencias entre los sitios usados para la engorda, o como la incorporación de la semilla en un sitio de cultivo en el ambiente natural, repercute sobre la composición de la microbiota asociada.

En este trabajo de investigación se obtendrá información sobre la composición y diversidad de la comunidad procariota utilizando como modelo biológico, las especies *Crassostrea gigas*, *C. sikamea* y *C. corteziensis*, moluscos bivalvos de importancia comercial en México. Se usará una estrategia independiente del cultivo de los microorganismos y la identificación de las poblaciones bacterianas se hará fundamentalmente analizando las secuencias del gen *16S ARNr*. Asumiendo que una vez depurados los ostiones la microbiota

transiente será eliminada, se podrá establecer la composición de la microbiota residente y sus diferencias con la transitoria. Se investigará si existen variaciones en la composición de la comunidad bacteriana y arquea en diferentes etapas de crecimiento del ostión durante el proceso de producción comercial. Una vez producida la semilla y estudiada la composición de su microbiota asociada, éstas semillas serán trasplantadas a dos sitios de engorda con diferentes condiciones ambientales (temperatura, contaminación, etc.) y de manejo del cultivo, para establecer como la microbiota se ve afectada durante el crecimiento del ostión y bajo distintas circunstancias de engorda.

OBJETIVOS

General

Determinar la composición de la microbiota procariota asociada a tres especies de ostión (*Crassostrea gigas*, *C. sikamea* y *C. corteziensis*) importantes en la ostricultura de México y estudiar su variación según etapa de crecimiento y sitio de cultivo en el ambiente natural.

Específicos

1. Determinar los cambios relacionados a la composición de la microbiota una vez incorporada la semilla en el ambiente natural y su variación según características del sitio de cultivo usado para su engorda.
2. Establecer las diferencias entre la microbiota procariota residente y transitoria de *Crassostrea gigas*, *C. sikamea* y *C. corteziensis*.
3. Identificar la composición y diversidad de la comunidad bacteriana y arquea asociada a semillas, juveniles y adultos de las tres diferentes especies de Ostreidos.

HIPÓTESIS

Asumiendo que la colonización bacteriana a nivel gastrointestinal en moluscos filtradores depende del medio externo y que su fijación se lleva a cabo durante los estadios tempranos del desarrollo (larvas y semillas), entonces la composición de la microbiota asociada a *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* presentará variaciones entre las etapas de crecimiento semilla, juvenil y adulto y cuando son engordados en sitios diferentes.

Dado que las Arqueas son importantes componentes de los sedimentos marinos, y aguas costeras y que los ostreidos son animales filtradores, es de esperar que las arqueas formen parte de la microbiota asociada a *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 1, se muestra un resumen general de la metodología utilizada para el desarrollo de esta investigación, la cual se detallará a continuación.

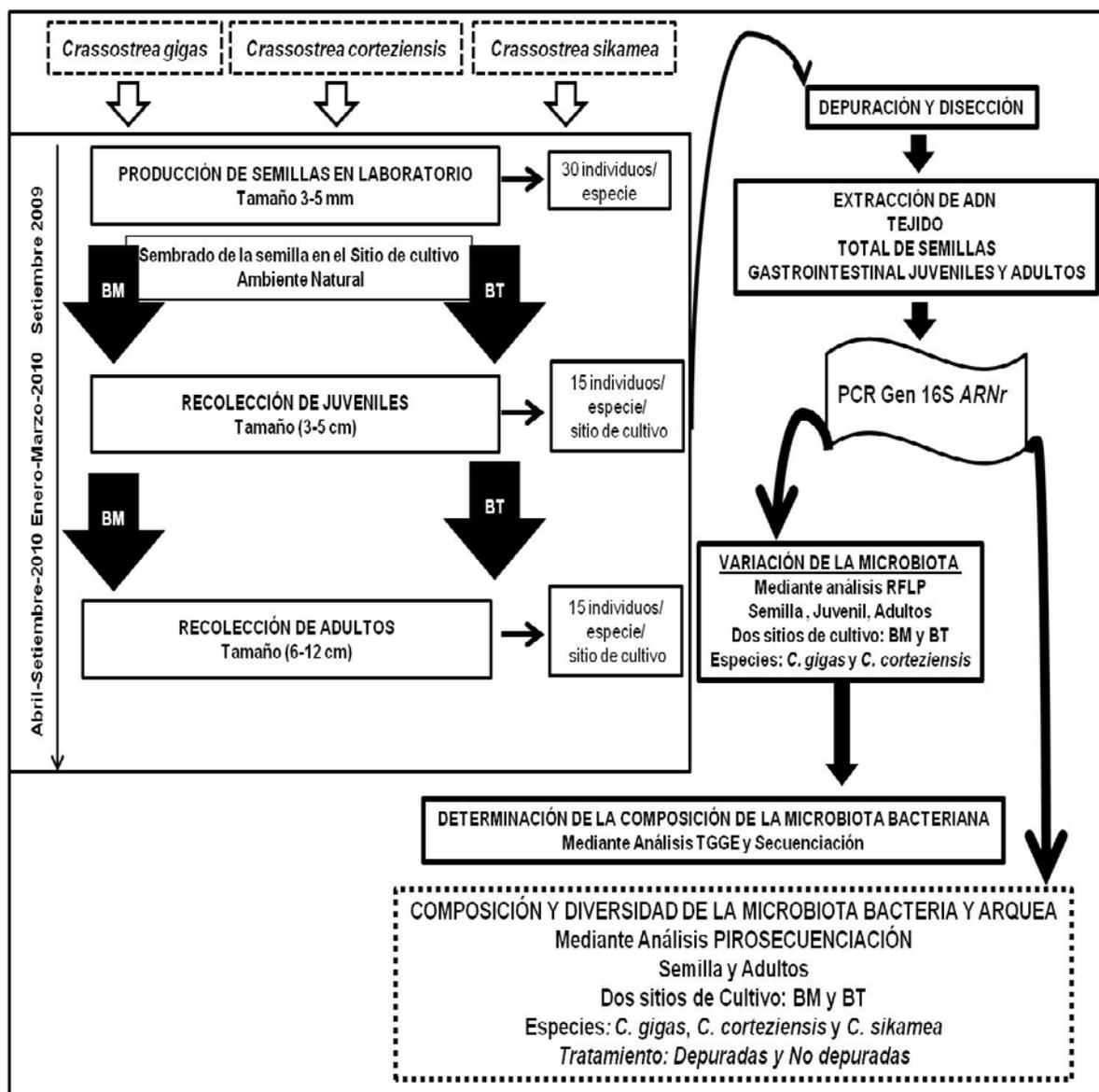


FIGURA 1. Resumen de la metodología general empleada en esta investigación.

BM: Sitio de Cultivo en Bahía Magdalena; BT: Sitio de Cultivo en Bahía Topolobampo.

Diseño experimental, producción y recolección de muestras

Se trabajó con semillas de *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea sikamea* producidas en laboratorio (ambiente controlado) y con los juveniles y adultos resultantes de su siembra y cultivo en granjas ostricultoras de engorde (ambiente natural) localizadas en las costas de Sinaloa (Golfo de California) y Baja California Sur (Océano Pacífico), México. El número de ejemplares establecido en esta investigación fué de 30 individuos por especie y estado de desarrollo (semilla, juvenil y adulto) según lo recomendado por Ossiander y Wedemeyer, 1973 (en Código Sanitario para Animales Acuáticos, Oficina Internacional de Epizootias, OIE, 2008). Las semillas de las tres especies de ostión fueron producidas en laboratorio de la empresa Acuacultura Robles S.A. localizado en Playa Eréndira (PE) (24 ° 14'09" N, 110 ° 18'24" W), Bahía de La Paz, Baja California Sur (Fig.2), siguiendo la metodología descrita por Mazón-Suástegui *et al.* (2008).

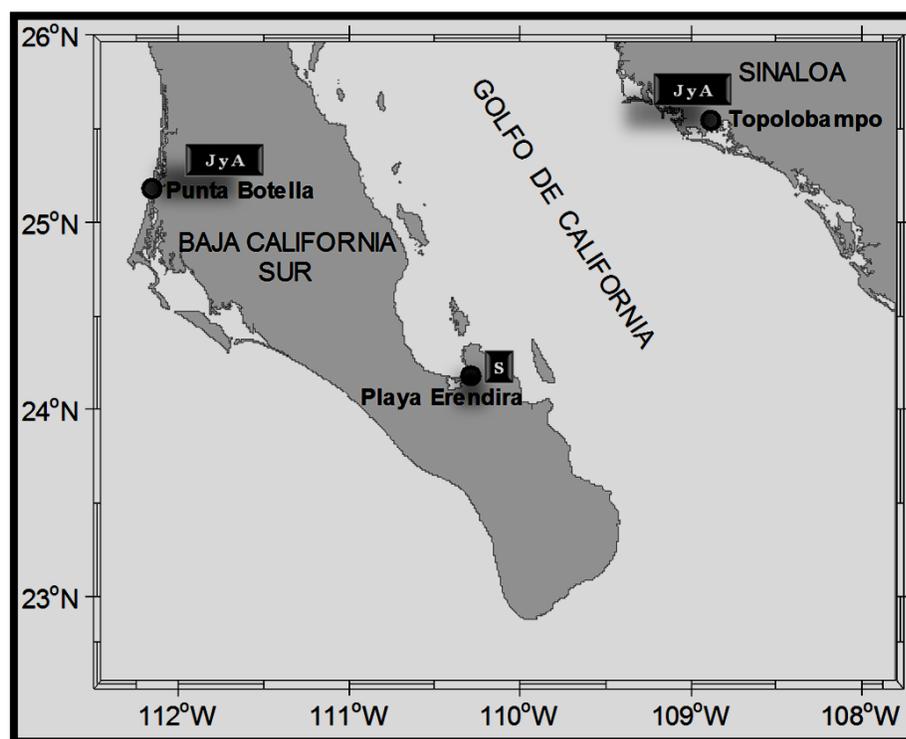


FIGURA 2. Ubicación geográfica del laboratorio y sitios de cultivo de donde fueron recolectadas las muestras de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. S: Semilla; J: Juveniles; A: Adultos

Las semillas fueron producidas a partir de reproductores certificados en el laboratorio de sanidad acreditado del instituto de Sanidad Acuícola A. C. y siguiendo los procedimientos establecidos por la Organización Internacional de Epizootias (OIE). Los reproductores fueron acondicionados para su maduración sexual bajo condiciones controladas de temperatura y suministro de alimento e inducidos a desovar mediante choque térmico. Las larvas producidas fueron cultivadas en tanques de fibra de vidrio a densidad inicial y final de 10 y de 1 larva/mL, respectivamente, utilizando como alimento una mezcla 1:1 de cultivos mono-específicos de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* a una concentración inicial y final de 30,000 y de 60,000 cel/mL, respectivamente. Los tanques de cultivo fueron drenados cada tercer día para limpieza, tamizado selectivo de larvas, cambio de agua y suministro de alimento. La fijación larvaria se llevó a cabo en charolas de fibra de vidrio con un falso fondo de malla Nyltex® 180µm en las que se colocó a manera de sustrato de fijación, una fina capa de concha de ostión a 180-300 µm, a fin de obtener semilla suelta o individual. Estas post-larvas ya fijadas y completada su metamorfosis, se conocen como “fijaciones” o “pre-semillas” y tienen una talla de 400-500 micras porque incluyen una post-larva y un grano de sustrato. Las fijaciones fueron cosechadas mediante tamizado selectivo y transferidas a unidades de pre engorda con cilindros de falso fondo con malla Nyltex® de 300 a 2,300µm con flujo re-circulante de agua de mar y suministro continuo de alimento. La etapa de pre engorda tiene una duración media de 6 semanas, durante las cuales se proporciona *ad-libitum* la dieta 1:1 de *I. galbana* y *Ch. calcitrans*, y se realiza limpieza diaria y tamizado selectivo semanal para mantener por separado grupos de talla uniforme. Al concluir la etapa de pre engorda en el laboratorio, se cosecharon las semillas de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* de 4-5 mm utilizadas para el desarrollo de la investigación (Mazón-Suástegui, 2008 y 2009) Del mismo lote de producción de semilla, en Setiembre de 2009 se tomaron 30 individuos para realizar extracción de ADN y el restante set de semillas, fue trasladado para su siembra y engorda en dos sitios de cultivo diferentes en el ambiente natural: Punta Botella (PB, 25 ° 18'14 .52" N, 112 ° 04'35" W) en Bahía Magdalena, estado de Baja California Sur y Bahía de Topolobampo (BT, 25 ° 54'N, 108 ° 33'O), estado de Sinaloa (Fig. 2). Inicialmente, en cada sitio de cultivo se realizó una pre-engorda y ambientación de las semillas y crecimiento a

talla de ostrilla (2-3 cm) en canastas de plástico tipo NestierTM suspendidas de una larga línea de flotación (cultivo en suspensión). Posteriormente, las ostras fueron transferidas a costales ostrícolas montados sobre estructuras rígidas (camas) colocadas en la línea de marea (cultivo en fondo) donde se engordaron hasta alcanzar su estado juvenil (Fig.3) Entre Enero y Marzo de 2010, después de pasados 4-6 meses de la siembra, fueron recolectados 30 individuos que alcanzaron el tamaño de juveniles (3-5 cm de altura de concha) (Fig.1). Finalmente, los juveniles fueron transferidos a la parte inferior de las camas para mejorar la estabilidad y el suministro de alimento. Luego de 7 a 12 meses desde su siembra, los ostiones alcanzaron el tamaño de adulto (6-12 cm de altura de concha), por lo que, entre Abril y Setiembre de 2010 se recolectaron 30 individuos de cada especie en cada sitio de cultivo (Fig.1). Al momento de su recolección no se observó maduración de las gónadas.



FIGURA 3. Sistemas de cultivo utilizados para la engorda de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. Imagen tomada en Punta Botella, Bahía Magdalena, Acuícola Robles S. A.

Todas las muestras fueron transportadas en hielo al laboratorio de moluscos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y en un plazo menor a 24 h para minimizar los cambios en la microbiota asociada.

Características de los sitios de cultivo utilizados para la engorda de los ostiones

La localidad Punta de Botella forma parte de la zona de canales del sistema lagunar de Bahía Magdalena uno de los ecosistemas con mayor biodiversidad y atractivo eco-turístico en el Estado de Baja California Sur. La Zona de Canales presenta una geomorfología irregular, conformada por numerosos esteros y canales someros bordeados por bosques de mangle (Acosta & Ruíz, 2007). Las zonas de manglar contribuyen de forma importante, en la producción de materia orgánica depositada en los sedimentos y constituyen un hábitat de refugio y alimentación para diversas comunidades integradas por un gran número de vertebrados e invertebrados, muchos de ellos de valor comercial y ecológico (Chávez, 2006). Por las características geográficas y ecológicas del sitio de cultivo ubicado en Bahía Magdalena, éste sufre muy poco impacto de contaminantes o actividad antropogénica. Como los canales del sistema lagunar tienen conexión con el océano pacífico es una zona fuertemente influenciada por las condiciones oceanográficas.

La Bahía de Topolobampo está conformada por lagunas con bocas relativamente amplias y permanentes, con temperaturas y salinidades relativamente estables y flujos que permiten buen soporte para actividades como la ostricultura. No obstante, estos cuerpos de agua se encuentran impactados por contaminantes ya que reciben las aguas residuales con los nutrientes y plaguicidas provenientes de la principal área agrícola del estado de Sinaloa. La acuicultura es una de las alternativas productivas y económicas más promisorias para el litoral de la región, aunque los estanques acuícolas han producido múltiples problemas de contaminación por el aporte de grandes volúmenes de agua con residuos de alimentos balanceados, antibióticos y otras sustancias (Montaño *et al.*, 2007; Páez *et al.*, 2002; Osuna & Riva, 2002).

Temperatura y salinidad en los sitios de cultivo

Los datos de temperatura superficial del mar (TSM) de los dos sitios de cultivo durante el periodo donde se realizó la engorda de los animales (2009-2010), se calculó a partir del análisis de imágenes satelitales usando el programa Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer-Aqua (MODIS-Aqua). Las imágenes fueron descargadas del sitio web National Aeronautics and Space Administration (<http://modis.gsfc.nasa.gov/data/>). Los valores de TSM mensual, se calcularon a partir de una línea recta trazada en y para cada localidad de estudio.

Los valores de salinidad durante todo el proceso de engorda de los animales, fue proporcionado por los técnicos de las acuícolas de ambos sitios de cultivo. Dichos valores se mantuvieron entre los 35-40 ups con promedios de 37 ups.

Preparación y depuración de las muestras

Todas las muestras (semillas, juveniles y adultos) recolectadas directamente desde las áreas de producción fueron transportadas al laboratorio, donde se les midió el largo y la altura de concha, según lo establecido por Palacios-Fest *et al.*, 1988 (Fig.4). Para comparar los tamaños entre especies y su variación según sitio de cultivo, se realizó un análisis de t-student utilizando el programa Statistica 10 (Stat Soft, USA).



FIGURA 4. Parámetros biométricos utilizados en Ostreídos. Imagen modificada de Palacios-Fest *et al.*, 1988).

Luego la superficie de las conchas de los ostiones fueron lavadas con agua de mar natural filtrada ($0,2 \mu\text{m}$) y esterilizada por UV y en autoclave. Manualmente se eliminó toda la epifauna acompañante adheridas a las conchas.

El proceso de depuración se efectuó siguiendo las recomendaciones del programa de Sanidad de moluscos (1992) con el fin de reducir al máximo la microbiota transitoria (Son & Fleet, 1980; Lee *et al.* 2008). La depuración de semillas, juveniles y adultos se realizó durante 72 hs recambiando todos los días (al menos dos veces) el agua de mar natural estéril y manteniendo a los ostiones con aireación automática constante (Fig.5).

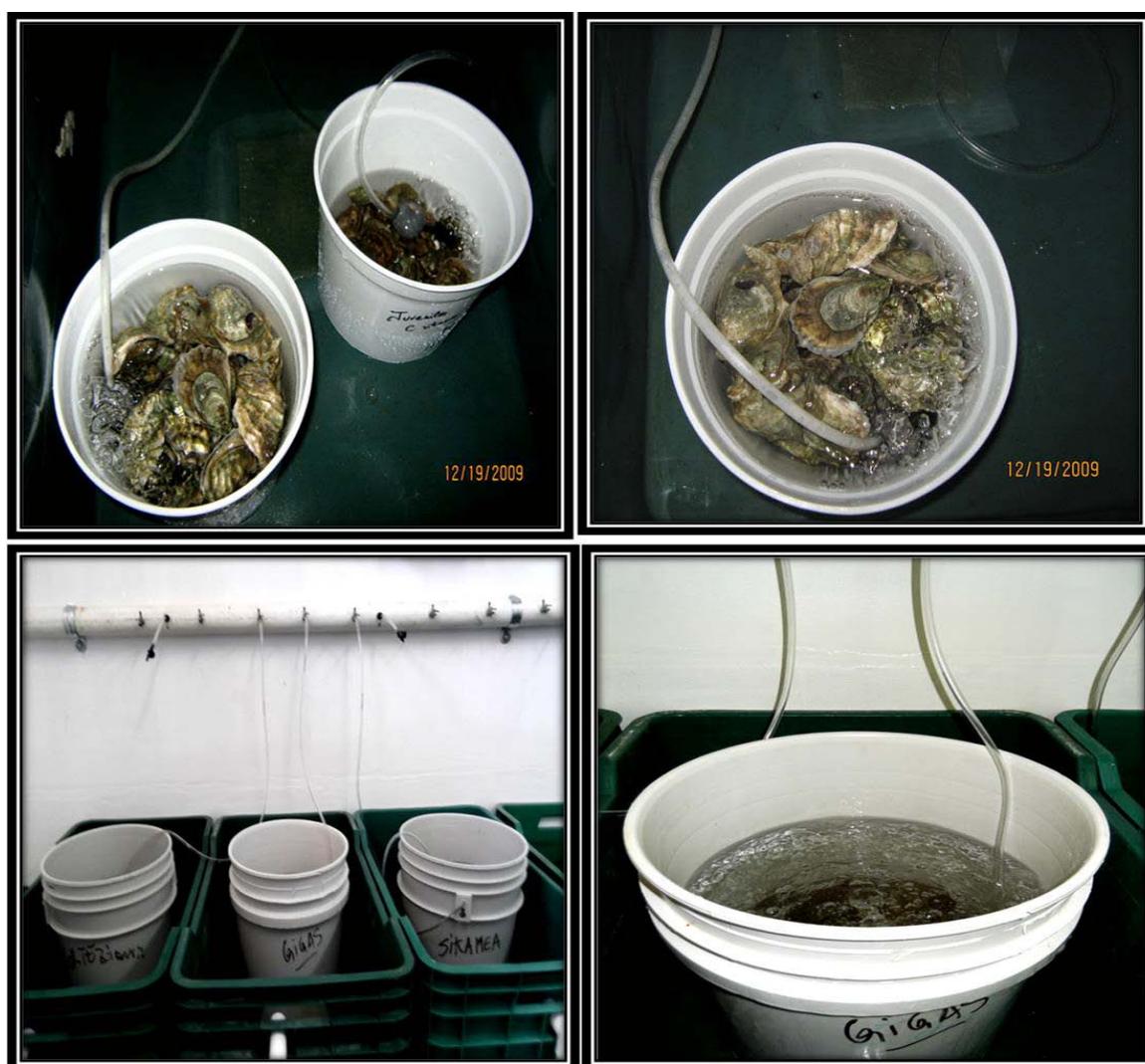


FIGURA 5. Proceso de depuración de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*.

Disección

Una vez finalizada la depuración, se lavaron las conchas exteriormente con etanol al 70% (en agua destilada estéril) y se procedió a la apertura de los organismos para su disección. En todos los casos, al momento de diseccionar los organismos, éstos se encontraban vivos y la apariencia de su cuerpo blando era normal sin evidencia de infección. Dado el tamaño pequeño de las semillas, solo se eliminó el líquido intervalvar y músculo, y el organismo completo fue fijado en etanol al 96% y guardado a -20°C . En el caso de organismos juveniles y adultos, se descartó el líquido intervalvar y músculo y se colocó cada individuo sobre placa de Petri estéril. Utilizando pinzas y una hoja de bisturí estéril para cada ostión, se separaron las branquias, manto y tracto gastrointestinal completo (glándula digestiva, intestino y recto) (ver anatomía interna de ostión Fig. 6). Finalmente, cada tejido fue fijado en etanol al 96% y guardado a -20°C .

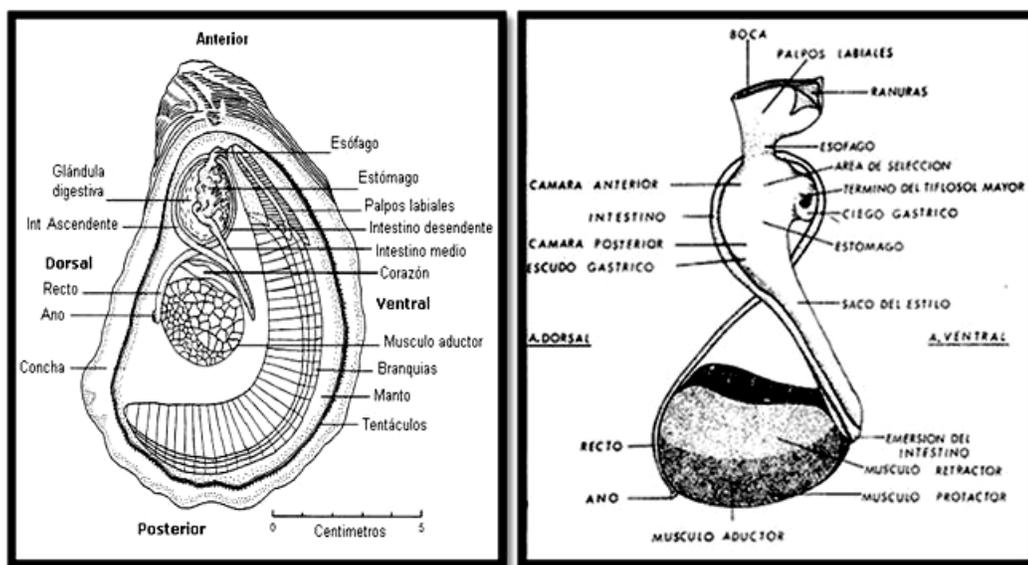


FIGURA 6. Detalle de la anatomía interna y tracto gastrointestinal de Ostreidos. Figura modificada de Helm *et al.*, (2006).

Extracción de ADN

Los tejidos provenientes de semillas, juveniles y adultos de ostiones fueron cortados en los casos que fue necesario, en porciones de 30 mg, lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos de alcohol y transferido a un tubo eppendorf con 400 μ l de tampón de lisis (NaCl 100mM, Tris 50mM, EDTA 100mM, pH8, SDS 1%) y 20 μ l de proteinasa K (20 mg. ml^{-1}) e incubados 12 hs a 65°C. Luego se añadió 200 μ l de NaCl 6M, se agitó e incubó por 10 min en hielo. Finalmente, para los tejidos provenientes de las semillas se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Sambrook *et al.*, 1989, mientras que para organismos juveniles y adultos se utilizó el Kit comercial QIAmp® DNA MINI (QIAGEN, Valencia, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se estableció la calidad del ADN, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,5% con tampón TAE 1X (0.04 M Tris base, 0.02 M acetato de sodio, 1.0 mM EDTA; pH 7.4) a 100 voltios por 30 minutos y posterior tinción con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). Paralelamente, se determinó por triplicado, la concentración de ADN midiendo la absorbancia a 260nm con un nanofotómetro (Implen). La pureza con respecto a presencia de proteínas y polifenoles se determinó por la relación de absorbancia 260/280 y 260/230, respectivamente.

Para determinar la ausencia de inhibidores de PCR y presencia de ADN bacteriano se realizó un PCR múltiple para el gen *O28S ARNr* específico para ostreidos utilizando los cebadores O28SF 5-AAGGGCAGGAAAAGAACTAAC-3 y O28SR 5-TTTCCCTCTAAGGGTTTCAC-3 y gen *16S ARNr* bacteriano con los cebadores 341F (Muyzer *et al.*, 1993) y 907R (Casamayor *et al.*, 2002).

Análisis *in silico* de los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR la región variable del gen *16S ARNr*

Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación específica de la región variable o SSU *16S ARNr* de bacterias y arqueas fueron seleccionados de la literatura internacional y elegidos luego de realizar una alineación *in silico*, mediante el uso del Sequence Match software, con secuencias de referencia de la base de datos Ribosomal Database Project 10

(RDP10, <http://rdp.cme.msu.edu/>). Los cebadores para regiones del gen *16S ARNr* bacteriano analizados fueron: 341F (Muyzer *et al.*, 1993), 788R (Magne *et al.*, 2006), 907R (Casamayor *et al.*, 2002) y 939R (Rudi *et al.*, 1997). Los cebadores para el gen *16S ARNr* de arqueas utilizados para el análisis *in silico* fueron los siguientes: 4F (Vetriani *et al.*, 1999) y 958R (DeLong *et al.*, 1992); A571F y UA1204R (Baker *et al.*, 2003); 344F y 915R (Casamayor *et al.*, 2002).

Amplificación por PCR del gen *16S ARNr* Bacteriano

Cada mezcla de reacción de PCR (30 μ l) estuvo compuesto por: 0.05 U/ml de Taq (Invitrogen, San Diego, CA, USA); MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM; 1 pmol/ μ l de cada cebador (347F y 939R) en tampón de PCR 1 X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH: 9,0), 0,1% Tritón X-100) y 3 μ l de ADN (10 ng) proveniente de semillas, juveniles y adultos de *C. gigas* y *C. corteziensis*. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: denaturación inicial a 94°C por 10 min, denaturación 97°C por 1 min, alineamiento 54°C 1 min, elongación 72°C por 1 min 30 s (30 ciclos) y una elongación final de 72°C por 10 min. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% (PAGE) en TBE 1X a 200 V por 20 min. El ADN fue visualizado mediante tinción de nitrato de plata (Benbouza *et al.*, 2006), fotografiado y documentado. Los productos obtenidos de la amplificación fueron posteriormente utilizados para ensayos de RFLP y TGGE.

Determinación de la Variación de la Microbiota Bacteriana Residente, mediante análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) – PCR *16S ARNr*

Es importante destacar que la parte experimental referente al RFLP y TGGE fue realizada en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile. En el momento que dicha estancia de investigación debía ser realizada, sólo se contaba con al ADN extraído de las especies *C. gigas* y *C. corteziensis* de muestras depuradas. Por esta razón, en estas etapas experimentales solo se analizó la microbiota residente asociada a estas dos especies de Ostreidos y no fueron incluidas muestras de *C. sikamea*.

Como forma de determinar si existen diferencias o similitudes entre las comunidades bacterianas asociadas según la especie de ostión, el estado de desarrollo y el sitio donde se realizó la engorda de juveniles y adultos, se realizaron análisis de los perfiles de restricción del amplicón 16S ARNr. Todos los productos de amplificación fueron digeridos con 1.5 U de la endonucleasa de restricción *AluI* (Invitrogen, Brasil) durante 2 h a 37°C. La reacción fue detenida utilizando proteinasa K (20 mg/μl) durante 1 h a 37°C. Finalmente, los fragmentos resultantes de la digestión fueron visualizados mediante electroforesis PAGE/nitrato, al 7% (PAGE) en TBE 1X a 130 V por 53 min. A todas las muestras de ostreidos, se les realizó un RFLP bajo las mismas condiciones de corrida, usando los mismos controles y marcadores de peso molecular en ambos extremos, para poder comparar perfiles y realizar las agrupaciones según el índice de similitud DICE.

Análisis de Similitud de la Microbiota Bacteriana según los perfiles obtenidos por RFLP-PCR 16S ARNr

Una vez obtenidos los diferentes perfiles de bandas mediante RFLP, se digitalizaron los geles y se procesaron las imágenes con la ayuda del software GELCOMPARE II® 5.2 (Applied Maths, Austin, TX) permitiéndonos asignar un patrón de bandas (carril cargado en el gel) a cada una de las muestras de ostión (individuo y especie involucrada) según lugar de procedencia y estado de desarrollo (semilla, juvenil y adulto). Cabe destacar que las imágenes de mala resolución o con perfiles difusos no fueron incluidas en el análisis. Para calcular los índices de tolerancia y optimización del análisis se utilizaron marcadores de peso molecular en los dos extremos (Mpb: 100pb, Biotech, Promega) y como control de la digestión con *AluI* y perfiles correspondientes el amplicón de *Listonella pelagia* ATCC 25916. Los agrupamientos se realizaron utilizando el coeficiente de similitud Dice (Cs) (1) de los perfiles de bandas obtenidos por RFLP y se representaron sus porcentajes de similitud como agrupamientos en un dendograma, utilizando el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*). Los criterios utilizados para la comparación entre los perfiles de bandas del RFLP fueron: el número de bandas obtenidas para cada una de las sub-muestras y la separación relativa de cada una de ellas con respecto a bandas de referencias (estándar) colocadas en carriles individuales dentro del gel (Fromin

et al., 2002; Gavin *et al.*, 2005, Valley *et al.*, 2009). El Cs (1) es un índice de similitud que se utilizó para comparar la variación de la microbiota basándose en la presencia o ausencia de bandas en cada carril del gel (muestras correspondiente a un ostión) (McCracken *et al.*, 2001). Por lo tanto, dos perfiles idénticos del RFLP presentan un valor de Cs de 100%, mientras que perfiles completamente diferentes tienen un valor de 0%.

(1)

Dice (Cs) = $2NAB / (NA + NB - NAB)$

Donde: Cs, Coeficiente de Similitud DICE; NAB = número de bandas en común entre ambos perfiles de bandas; NA= número de bandas del perfil de bandas A; NB= número de bandas del perfil de bandas B.

Análisis estadístico de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR *16S ARNr* Bacteriano

Usando funciones ortogonales empíricas, se analizó estadísticamente la variación entre las comunidades bacterianas asociadas a *C. gigas* y *C. corteziensis* en las tres etapas de crecimiento y los dos sitios de cultivo utilizados para engorde. Las diferencias se estimaron utilizando un análisis multivariado, específicamente el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). El PCA permite clasificar y simplificar los datos XJ en una nueva variable, llamada componente principal y determinar la variación de esos datos con unos pocos componentes principales (cargas factoriales ≥ 0.7). En este estudio, sólo se consideraron aquellos componentes principales estadísticamente significativos, es decir los que presentaron eigenvalores (λ) >1.0 (Krzanowski, 2000). El PCA, se realizó a partir de matrices de correlación DICE, las cuales fueron creadas usando el software PAST (Hammer *et al.*, 2001) a partir de una matriz binaria generada en base a la presencia o ausencia de bandas en cada uno de los geles (Fromin *et al.*, 2002). Finalmente, el análisis estadístico (PCA) se llevó a cabo utilizando el paquete de software, Statistica 10.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA).

Identificación de la Microbiota Bacteriana mediante Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE) y Secuenciación

Como forma de identificar los componentes más representativos de la microbiota bacteriana asociada a ostreidos en cada grupo analizado, según estado de desarrollo: semilla, juveniles y adulto de *C. gigas* y *C. corteziensis* y en los dos sitios de cultivo, se realizó un TGGE- 16S ARNr Bacteria a las mismas muestras a las que anteriormente se les realizó el RFLP. Para ello se realizó la amplificación por PCR anidado del ADN de ostreidos previamente extraído, utilizando como primer par de cebadores: 27F 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 y 1492R 5-GTTACCTTGTTACGACTT-3 (DeLong, 1992), con el siguiente programa: 95°C por 3 min, 1 ciclo 95°C 1min 30 s, 55°C 6 min, 72°C 1min 30seg; 15 ciclos 95°C 1min 30 s, 55°C 1min 30 s, 72°C 30 s, elongación final 72°C por 6 min. Posteriormente 1 µl del producto obtenido, fue diluido (1/100) y re-amplificado utilizando los cebadores 341F con cola de 40 pb GC y 939R bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Los productos resultantes fueron purificados utilizando el Kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Madison, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estos productos purificados fueron separados mediante TGGE en geles de poliacrilamida (Urea 7M, Acrilamida/bisacrilamida al 8%) buffer TAE 1X (Tris 0.04 M, acetato 0.002 M, EDTA 0.001 M, pH 8.5), con un gradiente de temperatura de 66°C a 70°C. La corrida de electroforesis se realizó durante 18 h y 30 min a 65 V en un equipo a D-Code System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Para realizar el TGGE, fue necesario desarrollar un estándar en base al porcentaje de contenido GC presente en ADNs obtenidos de cepas bacterianas puras, que permitan hacer las comparaciones necesarias y definir los OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales). Todas las cepas bacterianas probadas para realizar el estándar fueron elegidas de un conjunto de bacterias aisladas inicialmente desde organismos marinos y disponibles en el cepario del laboratorio, se descartaron aquellas que mostraron baja resolución del porcentaje de GC en el gel o donde se observó más de una banda producto de contaminación. En todos los casos se colocó en ambos extremos del gel el estándar desarrollado, compuesto por una mezcla de ADN puro de *Pseudomona aeruginosa* P1

(colección Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA, Chile), con 51.8 porcentaje de GC; *Vibrio harveyi* ATCC 14126 53.1 % GC y *Bacillus subtilis* B4 54.6 % GC (colección Balcázar, Instituto de Investigaciones Marinas, Vigo; España). Finalmente los geles fueron teñidos durante 30 min por incubación con SybrGreen (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Para el análisis, cada banda que presentó una migración diferente en el gel (% GC) fue considerada un OTU y cada uno de los carriles del gel TGGE, correspondió al patrón de bandeo de un ostión individual.

Las bandas más intensas y frecuentes fueron cortadas y eluidas en 50 µl de agua MilliQ durante 12 h a 25°C. Luego se re-amplificó 1 µl de ese producto, bajo las mismas condiciones de PCR, anteriormente mencionadas. Todas las bandas fueron digeridas con la enzima *AluI*, para comprobar si se trata del mismo amplicón y/o heterodupletes. Finalmente, el producto de ADN obtenido de la re-amplificación fue enviado a la empresa *Macrogen* (USA) para su secuenciación utilizando el equipo de secuenciación Applied Biosystems ABI3730XL (Carlsbad, CA).

Una vez obtenida la información, se procedió a su identificación por similitud de secuencias disponibles en el banco de datos GenBank, por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [<http://ncbi.nlm.nih.gov>] y con el software Sequence Match de la base de datos RDP II [<http://rdp.cme.msu.edu/>]. Todas las secuencias seleccionadas fueron depositadas en GenBank.

Determinación de la Composición y Diversidad de la Microbiota Procariota asociada a Ostreidos mediante Pirosecuenciación del gen *16S ARNr*

En general, las técnicas de RFLP y TGGE no mostraron idénticos resultados, pero sí fueron complementarias y entregaron la información necesaria para tener un panorama general de la microbiota asociada a *C. gigas* y *C. corteziensis* y responder algunas interrogantes planteadas. Sin embargo, la baja reproducibilidad y resolución del TGGE, los inconvenientes relacionados a los artefactos generados (heterodupletes y quimeras) y la imposibilidad de secuenciar OTUs encontrados, nos hicieron re diseñar el protocolo de investigación e incorporar la técnica de pirosecuenciación. Dicha técnica molecular, permitió tener una aproximación más adecuada y entregó información complementaria

importante sobre la diversidad de la microbiota procarionte (bacterias y arqueas) asociadas a los moluscos ostreidos. En esta etapa experimental se incluyeron muestras de ADN provenientes de semillas y adultos de *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* previamente depurados y sin depurar cultivados en Bahía Magdalena (BCS) y Bahía Topolobampo (Sinaloa). La intención de incluir estas muestras, fue establecer las diferencias entre la comunidad bacteriana y arquea asociada a dichas especies de ostión y sus diferencias dependiendo del sitio de cultivo. Determinar además, los cambios que ocurren en la microbiota asociada cuando la semilla es sembrada en el sitio de cultivo para su engorda hasta la talla comercial. Por último, establecer las diferencias entre la microbiota procarionte residente (muestras de ostión depuradas) y la transitoria (muestras de ostiones sin depurar).

Protocolo general

Se utilizó la estrategia de secuenciación de una sola línea 454 Roche usando el equipo FLX-Junior (Roche, 2010). Esta técnica consiste principalmente, en amplificar el ADN extraído de cada muestra de ostión, utilizando cebadores específicos para la amplificación de la región variable del gen 16S ARNr de bacterias y arqueas, para la identificación de filotipos individuales u OTUs, mediante secuencias masivas paralelas (Huber *et al.*, 2007). El protocolo general utilizado en este trabajo para la pirosecuenciación se puede observar en la figura 7.

Librería de Amplicones

Inicialmente, se preparó las librerías denominadas como A, la correspondiente a un pool de amplicones del gen *16S ARNr* de Arqueas y la B, que contiene el pool de amplicones del gen *16S ARNr* de Bacterias de 10 individuos de cada clase de ostión y especie analizada (*C. corteziensis*; *C. gigas* y *C. sikamea*): semillas, adultos de Bahía Magdalena (BM) ostiones depurados y no depurados, Adultos de Bahía Topolobampo (BT). Para preparar el pool de amplicones se realizó la amplificación por PCR de las muestras de ADN previamente extraído, utilizando los cebadores de fusión específicos para pirosecuenciación que generaran un amplicón de aproximadamente 600 pb de la región variable V3-V6 *16S ARNr*.

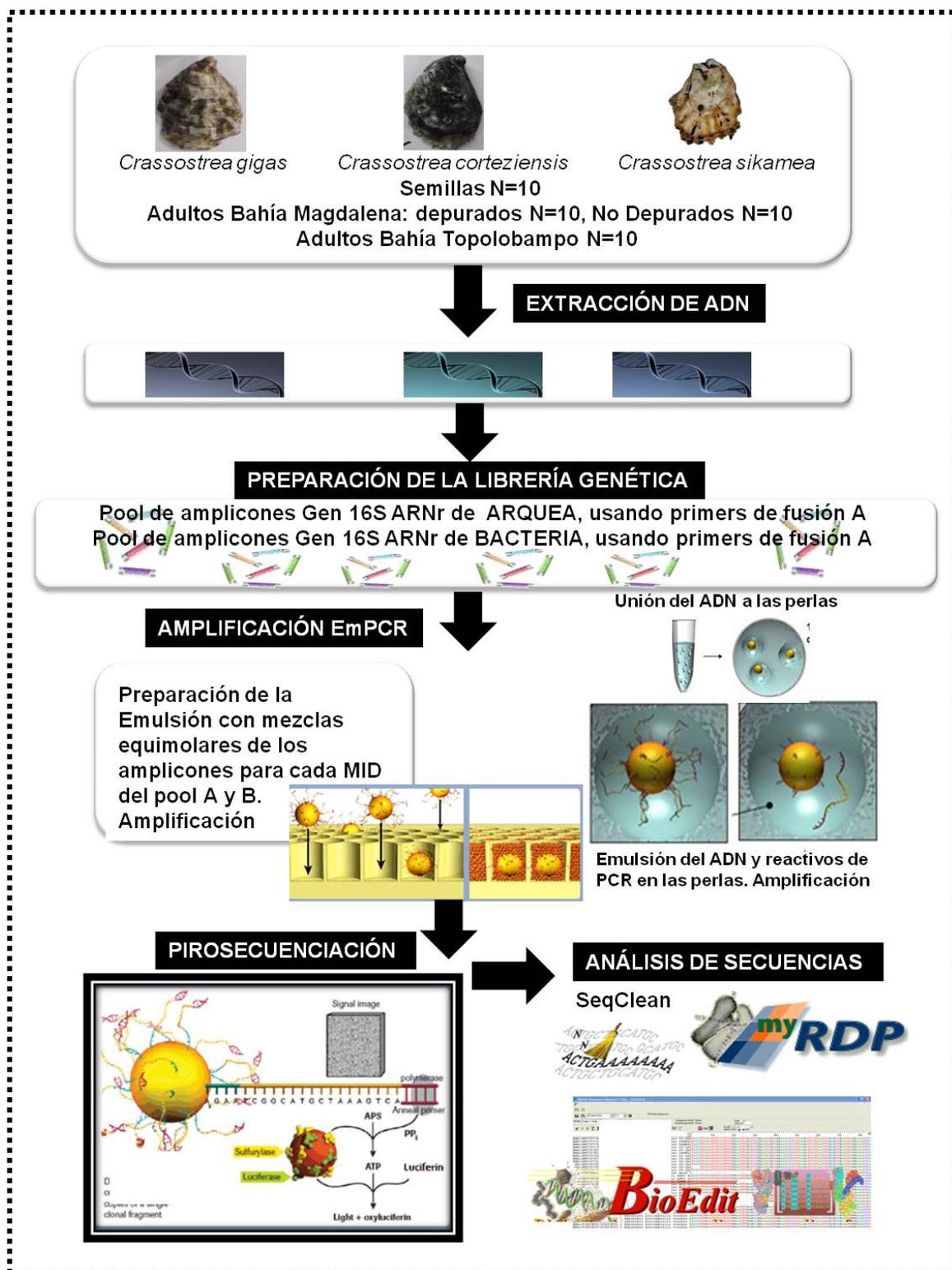


FIGURA 7. Esquema general del diseño experimental utilizado en la pirosecuenciación de las librerías de amplicones *16S ARNr* de Bacteria y Arquea.

En la figura 8, se puede observar el diseño de los cebadores (*primers*) donde la porción 5' (marcada con letras en celeste, Adaptadores) es una secuencia que está determinada por los requisitos del sistema de secuenciación 454 Roche para la unión de las perlas Lib-L y deben terminar con la clave indicada en rojo (Key), utilizada para la secuenciación del amplicón durante la pirosecuenciación. En verde y azul se indica el cebador universal específico para el gen *16S ARNr*, que va dirigido específicamente a amplificar el ADN “blanco” presente en la muestra. El MID: indicador multiplex (indicado en naranja) se utilizó como etiqueta para identificar cada tipo de muestra (Fig. 8). En la tabla 1, se puede observar el diseño específico de los cebadores de fusión utilizados en este estudio con sus correspondientes etiquetas que identifican cada una de las muestras analizadas.

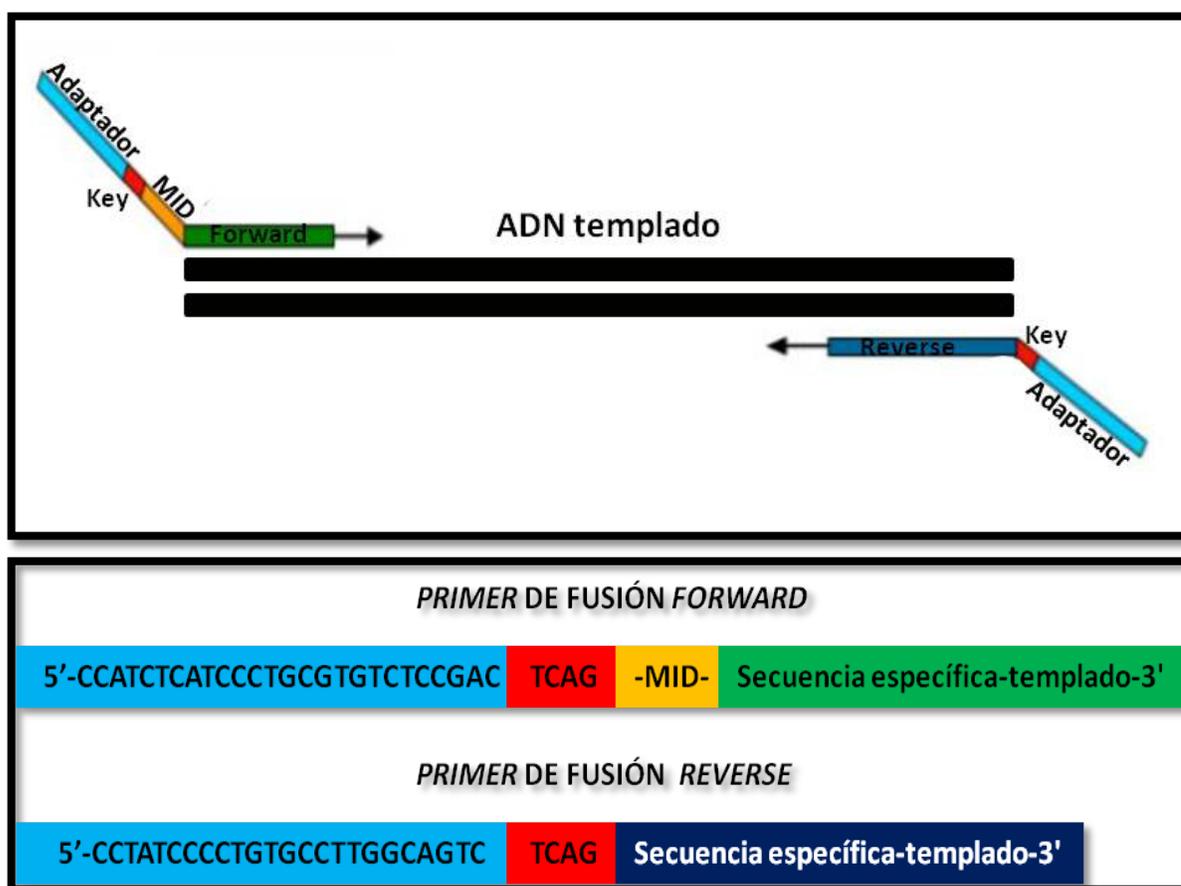


FIGURA 8. Diseño de los *primers* de fusión utilizados para la pirosecuenciación.

Los amplicones fueron preparados a partir de 10 muestras de ADN (10 ng/μl) para cada tipo de muestra, de este modo se generaron pool de amplicones de PCR para cada MID (Tabla I) lo que representa genotecas diferentes para cada especie de ostión, estado de desarrollo y sitio de cultivo. Para minimizar errores por artefactos de la amplificación por PCR se trabajó con una polimerasa de alta fidelidad y se realizó una amplificación de 23 ciclos iniciales seguidos por una re-amplificación de 10 ciclos con Taq polimerasa fresca. Para la amplificación se utilizó Taq polimerasa 1U de AccuPrime Pfx ADN polimerasa, enzima de alta fidelidad recombinante de *Thermococcus* (Invitrogene, CA), 1X de buffer de reacción (incluye MgSO₄ y dNTP), 0,6 μM de cada cebador y 3 μl de ADN genómico en un volumen de 30 μl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min; 23 y 10 ciclos posteriores de 95°C 1 min, 61°C (para bacterias) y 52°C (para arqueas) por 1 min y 68°C 1 min; y una extensión final de 9 min a 68°C. Una vez obtenido cada amplicón individual de una concentración 100 ng/μl se mezclaron en partes iguales mezclando 100 μl de cada MID individual (MID1 a MID12) de Arqueas y el correspondiente para Bacterias, generando así el pool de amplicones, o librería genética. Posteriormente, cada pool de amplicones fue purificado utilizando el kit comercial Wizard, Gene Clean Up, PROMEGA, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego se leyó al menos 6 veces, la densidad óptica (DO), usando un Nanofotómetro (Implen) y se corrió además una electroforesis en gel de Agarosa al 0.5 % (100 Voltios, 30 min en búfer TAE 5X), para estimar la concentración y pureza de los productos obtenidos. Diez microgramos de cada librería genética (A y B) conteniendo la mezcla de amplicones de ADN de concentración 50 ng/μl y D260/280 ≥2.0, fue enviada al laboratorio de servicios Genómicos CINVESTAV-Langebio, para su correspondiente análisis.

Proceso de pirosecuenciación

Como se observaron fragmentos pequeños en las genotecas generadas se procedió a realizar una remoción de los fragmentos no deseados, utilizando el Kit Agilent High Sensitivity DNA y siguiendo las recomendaciones del boletín TCB0-11007-Short Fragment Removal Procedure, 454-Roche. Luego los fragmentos en las genotecas de amplicones fueron unidos

a esferas y emulsionados en una mezcla de EmPCR y así se generaron alrededor de 10 millones de copias de un único templado de ADN. Inmediatamente después de la ruptura de la emulsión, las hebras de ADN serán desnaturalizadas, y las esferas que llevaban clones de ADN fueron depositadas en pocillos sobre un PicoTiter-Plate (454 Life-Sciences) para pirosecuenciación, sobre un sistema Genome Sequencer FLX Junior (Roche, Basilea, Suiza) en 454 Life Sciences (Branford, CT).

Análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación del pool de amplicones de bacterias y arqueas

Las lecturas obtenidas para los 12 MID, fueron procesadas utilizando el programa SeqClean, *software pipeline* (The Institute for Genomic Research, USA) para eliminar o descartar secuencias que pudieran generar errores en el proceso de análisis. Los criterios utilizados para eliminar secuencias fueron: baja complejidad, baja calidad, secuencias ricas en Ns (bases indeterminadas o ambiguas), presencia de quimeras, las que no coincidan con los *primers* usados en la PCR al inicio de la lectura y secuencias de tamaños menores a 524.37 pb. Para clasificar secuencias según MID y tamaño de la lectura se usaron los programas BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences, CA) y MEGA (Tamura *et al.*, 2011)

La asignación o clasificación de cada secuencia fue realizada utilizando una de las herramientas más ampliamente usadas denominada *naïve Bayes classifier* (Wang *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2012) y la base de datos de genes *16S ARNr* del *Ribosomal Data Project*, RDP (Cole *et al.*, 2009). En los casos en donde existió alguna duda de clasificación se consultaron las bases de datos del *16S ARNr*: SILVA (Pruesse *et al.*, 2007) y *GreenGenes* (DeSantis *et al.*, 2006)

TABLA I. Listado de los *primers* usados para generar el pool de amplicones de Arquea y Bacteria.

Etiqueta	Ostión	Estado Crecimiento	Sitio de Cultivo	Característica	Grupo	Secuencia* 5' - 3'
MID01	Corteziensis	Semilla	Laboratorio Bahía de La Paz	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGGTGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGGTACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID02	Corteziensis	Adulto	Bahía Magdalena	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACAGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACAACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID03	Corteziensis	Adulto	Bahía Magdalena	No Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGAGCGCACTGCCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGAGCGCACTACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID04	Corteziensis	Adulto	Bahía Topolobampo	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGAGCACTGATAGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGAGCACTGATACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID05	Gigas	Semilla	Laboratorio Bahía de La Paz	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGATCAGACAGCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGATCAGACAGCACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID06	Gigas	Adulto	Bahía Magdalena	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGATATCCGAGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGATATCCGAGACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID07	Gigas	Adulto	Bahía Magdalena	No Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGCGTGTCTTACGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGCGTGTCTTACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID08	Gigas	Adulto	Bahía Topolobampo	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGCTCCGCTGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGCTCCGCTGCACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID09	Sikamea	Semilla	Laboratorio Bahía de La Paz	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGTAGTATCAGCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGTAGTATCAGCACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID10	Sikamea	Adulto	Bahía Magdalena	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGTCTATCGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGTCTATCGCACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID11	Sikamea	Adulto	Bahía Topolobampo	Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGTGATACGCTGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGTGATACGCTACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
MID12	Sikamea	Adulto	Bahía Magdalena	No Depurada	Bacteria	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGCATAGTAGTGCCTACGGGAGGCAGCAG-3
					Arquea	5-CCATCTCATCCCTGCCGTGTCTCCGACTCAGCATAGTAGTACGGGGYGCAGCAGGCCGGA-3
REVERSE					Bacteria	5-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCTTGTGCGGGCCCCCTCAATC
REVERSE					Arquea	5-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGGTGCTCCCCGCCAATTCCT

* El color de las letras indica el Adaptador en azul, la key en rojo y las etiquetas o MIDs en verde. Oligonucleótido 16S ARNr en negro

Asignación taxonómica de filotipos a partir de resultados de la pirosecuenciación

Para definir los filotipos u OTUs, se utilizaron los criterios de asignación de secuencias más rigurosos (Clarridge, 2004; Janda & Abbott, 2007; Pruesse *et al.*, 2007) donde se considera como de un mismo Phylum todas aquellas lecturas que presentaron un valor igual o mayor al 80 % de similitud de secuencia, como de la misma Clase las que tuvieron $\geq 85\%$ de similitud, para Orden $\geq 90\%$, Familia $\geq 95\%$, Género $\geq 97\%$ y Especie $\geq 99\%$. En este estudio, cuando se analizó la cantidad de géneros encontrados en cada una de las muestras se observó que existían muchas secuencias que estaban representadas una sola vez, haciendo que el total de géneros encontrados fuera de más de 350. Por ello, para realizar la asignación de secuencias y los estudios de diversidad, se definió un criterio más representativo en cada uno de los muestreos realizados (MIDs). Dicho criterio consistió en considerar únicamente todas aquellas lecturas que permitieron identificar géneros en al menos 10 secuencias, el equivalente a los 10 ostiones incluidos a en cada muestra, es decir para cada MID.

Diversidad de la Microbiota Asociada

Todos los análisis de biodiversidad se realizaron utilizando los datos de géneros, esto porque la similitud de las lecturas encontradas a nivel de especie, hizo muy difícil asignar o definir ha dicho nivel.

Una vez definidos los filotipos u OTUs, y antes de proceder a realizar los análisis de diversidad, se determinó si el número de secuencias analizadas (esfuerzo de muestreo) permitía estimar adecuadamente la diversidad bacteriana y arquea. Para ello y siguiendo las recomendaciones de Hughes *et al.*, 2001, se realizaron las curvas de rarefacción usando los programa EstimateS 6.0 (Colwell, 2005), PAST y Primer6 (Primer-E Ltd., USA) (2) (Magurran, 1998; Heck *et al.*, 1975) para cada uno de los muestreos (MID) y una curva de acumulación de géneros utilizando el índice no paramétrico *Chao1* (3) (Chao & Lee, 1992; Chao, 1984). Para realizar una curva de rarefacción se deben considerar los siguientes criterios: 1. Las muestras a ser comparadas deben ser consistentes desde el punto de vista taxonómico; 2. El diseño de muestreo puede diferir en la intensidad del muestreo pero no

en el método de colecta; 3. Los tipos de hábitat de donde se obtuvieron las muestras deben ser similares (Krebs, 1989).

(2) Rarefacción

$$E(S) = \frac{\sum 1 - (N - N_i)/n}{N/n}$$

Donde E(S) = número esperado de géneros, N= número total de individuos en la muestra, N_i= número de individuos del iésimo género, n= tamaño de la muestra estandarizado.

(3) Índice Chao 1

$$Chao\ 1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

Donde S= número de géneros en una muestra, a= número de géneros que está representado una sola vez en esa muestra y b= número de géneros que está representado exactamente en dos individuos de esa muestra.

Para estimar la diversidad α (riqueza de géneros dentro de la comunidad para cada muestra), se calculó el índice de riqueza específica (S= número de géneros) y tomando en cuenta el número total de secuencias obtenidas para cada muestra, se calculó la abundancia relativa de los diferentes filotipos. La abundancia proporcional o equidad de especies se calculó utilizando los índice de equidad de Shannon-Wiener (4) y de Pielou (5), y el de dominancia de Simpson (6) (Magurran, 1988). Todos estos análisis se realizaron con la ayuda de los programas PRIMER6 (Primer-E Ltd., USA) y PAST (Hammer & Harper, 2006).

(4) Índice diversidad Shannon-Wiener

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Donde, S= riqueza de géneros, p_i = proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa del género i : $\frac{n_i}{N}$, n_i = número de individuos del género i , N= número de todos los individuos de todos los géneros.

(5) Equidad de Pielou

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

$$H'_{\max} = \ln(S)$$

Donde H'= diversidad Shannon-Wiener, $H'_{\max} = \ln(S)$

(6) Índice de Simpson

$$1 - \lambda' = 1 - \sum \frac{N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde N_i = número de individuos en el i ésimo género; N= número total de individuos en la muestra.

Para determinar la diversidad β (cambios en la composición de géneros entre las diferentes comunidades, entre muestras o MIDs) se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). Para ello se generó una matriz de presencia-ausencia en base a los 77 géneros encontrados. Con la ayuda del programa PAST (Hammer y Harper, 2006), se procedió a transformar dicha matriz en una matriz binaria, en base al índice de correlación DICE. El PCA, se ejecutó usando el programa Statistica 10.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA), usando aquellos componentes principales estadísticamente significativos, es decir los que presentaron eigenvalores (λ) >1.0 (Krzanowski, 2000).

RESULTADOS

Características de las muestras analizadas y condiciones de los sitios cultivo

En este estudio se incluyeron 270 muestras de Ostreidos que fueron depurados, de las cuales 90 organismos correspondieron a la especie *C. gigas*, 90 a *C. sikamea* y 90 a *C. corteziensis*. Se incluyeron también, 45 muestras de ostiones que no fueron depuradas, 15 de cada especie de ostreido. En la tabla II se detallan el número de muestras recolectadas según estado de crecimiento y sitio de cultivo.

TABLA II. Biometría, lugar de procedencia y número de muestras recolectadas.

Especie	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Crassostrea corteziensis</i>	<i>Crassostrea sikamea</i>			
Etapa Crecimiento	Biometría (cm) ^b	Biometría (cm) ^b	Biometría (cm) ^b	Procedencia	Nº Muestras ^a	TOTAL
Semilla	A: 1.5 ±0.3; L: 1.3±0.3	A: 1.9 ±0.2; L: 1.5±0.2	A: 1.5 ±0.3; L: 1.2±0.2	L-BP	30	90
Juvenil	A: 6.5± 0.7; L: 3.6 ±0.3	A:3.4± 0.5; L: 2.3 ±0.3	A:4.1± 0.4; L: 2.6 ±0.3	BM	15	45
Juvenil	A: 6.1± 0.5; L: 2.1 ±0.2	A:4.6± 0.4; L: 3.7 ±0.4	A:5.6± 0.5; L: 3.8 ±0.5	BT	15	45
Adulto	A: 11.6±0.9; L: 5.4±0.4	A:5.9± 0.5; L: 4.4 ±0.4	A:6.1± 0.4; L: 4.0 ±0.4	BM	15	45
Adulto	A: 7.5±0.8; L: 4.7±0.8	A: 7.3±0.6; L: 5.1±0.5	A: 6.8±0.5; L: 4.0±0.4	BT	15	45
Adulto NOD*	A: 12.6±0.8; L: 5.4±0.4	A:5.9± 0.4; L: 4.3 ±0.4	A:6.1± 0.3; L: 3.9 ±0.4	BM		315

A: Altura, L: Longitud, ^b: Promedio y desviación estándar; ^a: por Cada /especie analizada. L-BP: Laboratorio producción de semilla Bahía de La Paz; BM: Sitio de Cultivo Bahía Magdalena; BT: Sitio de Cultivo Bahía de Topolobampo. N: Número de individuos por muestra.*: NOD, organismos No Depurados.

En Septiembre del 2009, se obtuvieron las semillas en el laboratorio de producción de Acuícola Robles SA. Las larvas fueron mantenidas con una salinidad de 35-36 ups y una temperatura de 28 ± 1 C. Una vez alcanzado el tamaño comercial de semilla, los organismos fueron transportados en ambiente húmedo-frío y sembrados en campo para su pre-engorda en canastas ostrícolas suspendidas en una línea larga flotante en dos sitios de cultivo diferente donde alcanzaron el tamaño juvenil de “ostrilla”. Las ostrillas fueron posteriormente engordadas en costales ostrícolas dispuestos sobre estructuras metálicas o “camas”, en la zona intermareal, hasta alcanzar el tamaño de talla comercial. Entre los

meses de Enero a Marzo de 2010, fueron recolectados en campo los organismos de talla considerada como juvenil y entre Abril y Setiembre del 2010 se obtuvieron los adultos. Debido al régimen térmico imperante durante esas fechas en el los sitios de cultivo, estos organismos no mostraron maduración de las gónadas. Los valores registrados de la temperatura superficial del mar (TSM) durante los meses de engorda en los dos sitios de cultivo, muestran que para Bahía Topolobampo (BT) se registraron temperaturas de aguas tropicales, mientras que para Bahía Magdalena (BM) se observaron temperaturas de ambiente subtropical. En ambos sitios de cultivo se presentaron valores máximos durante el mes de Septiembre y se notó el descenso de temperatura al inicio del invierno (Fig. 9).

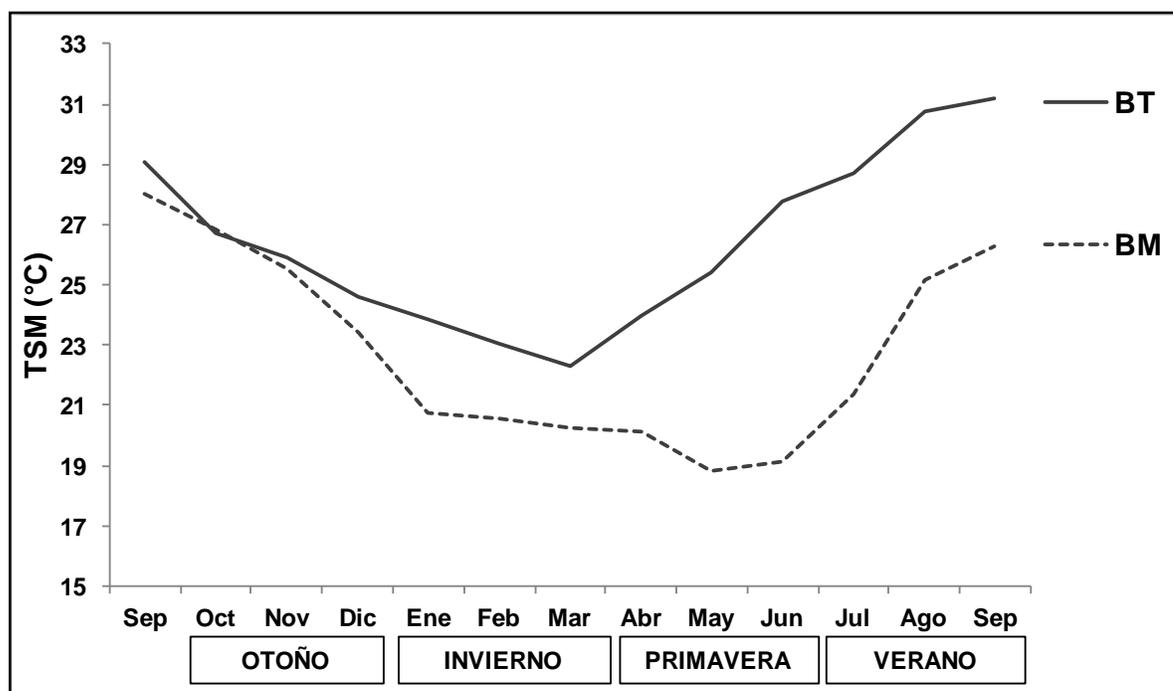


FIGURA 9. Temperatura superficial del mar (TSM) registrada en los sitios de cultivo durante el período de engorda de juveniles y adultos de *C. gigas*, *C. sikamea* y *C. corteziensis*. BM: sitio de cultivo en Bahía Magdalena; BT: sitio de cultivo en Bahía Topolobampo.

La salinidad registrada en ambos sitios de cultivo se mantuvo entre 35 y 40 ups, con un promedio de 37 ups.

En la tabla II, se muestran los tamaños promedio determinados para cada uno de las etapas de crecimiento según especie de ostión y sitio de cultivo. Se estableció que existen

diferencias significativas entre las tallas (crecimiento) de los ejemplares juveniles ($t=2.22$, $p<0.05$) y adultos ($t= 15.91$, $p<0.05$) de *C. gigas* provenientes de ambos sitios de cultivo, siendo el crecimiento promedio mayor en Bahía Magdalena que en Bahía Topolobampo. También se encontraron diferencias significativas al comparar los tamaños entre juveniles ($t=16.12$, $p<0.05$) y adultos ($t=4.65$, $p<0.05$) de *C. corteziensis* engordados en ambas localidades, sin embargo, en esta especie el mayor tamaño se observó en los organismos engordados en Bahía Topolobampo, lo mismo sucedió con *C. sikamea* (Tabla II).

Los ostiones engordados en Bahía Magdalena no evidenciaron la presencia externa de epibiontes (poliquetos y cirripedios), mientras que en aquellos provenientes de Bahía Topolobampo se encontraron algunos poliquetos y lapas asociados a sus valvas. En todos los casos, al momento de disecar los organismos se encontraban vivos y la apariencia de su cuerpo blando era normal, sin mostrar evidencia alguna de infección. En la figura 10, se pueden observar las diferencias entre las distintas especies de Ostreidos analizadas y su apariencia al momento de ser muestreadas.

Calidad de la extracción de ADN

Las 90 semillas colectadas fueron procesadas y se obtuvo una extracción eficiente del ADN total mediante el uso del protocolo inicialmente propuesto en el diseño experimental de Sambrook *et al.*, 1989. Sin embargo, cuando el mismo protocolo se aplicó para la extracción de ADN de la porción gastrointestinal de juveniles y adultos, no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que debimos probar técnicas adicionales (kit comercial QIAmp DNA MINI KIT y Swejíd *et al.*, 1998). En la figura 11 y tabla III se muestran los resultados obtenidos con los tres protocolos ensayados, observándose diferencias en cuanto al tipo de muestra utilizada, concentración y calidad del ADN obtenido. El protocolo de Swejíd *et al.* (1998), presentó en general mayores concentraciones que el de QIAmp, aunque ambos presentaron purezas buenas ($D260/280 = 2,00$ en promedio), por lo que se logró eliminar, en gran parte, el contenido de proteínas contaminantes. Sin embargo, al comparar el cociente 260/230 (indicativo de contaminación de hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos, entre otros) se observaron diferencias importantes entre ambos métodos. El kit QIAmp presentó una mayor eficiencia para

eliminar dichos contaminantes, ya que se obtuvieron cocientes cercanos a 2,2, valor que refleja la mayor pureza (Tabla III). El protocolo de Sambrook *et al.*, (1989) fue adecuado para realizar la extracción de ADN desde semillas de ostión, se obtuvieron buenos rendimientos en cuanto a concentración y pureza del ADN obtenido y además fue posible detectar los genes *16S ARNr* que son los de interés principal para esta investigación (Fig.11, 12 y Tabla III). La diferencia más relevante entre ambos protocolos para extracción de ADN de ostiones juveniles y adultos, fue evidente cuando se procedió a la detección de los genes *28S ARNr* de Ostreidos y *16S ARNr* bacteriano. Se probaron diferentes diluciones del ADN extraído usando el protocolo Sweijd *et al.* (1998) como forma de establecer si la falta de amplicones se debía a un exceso de templado o inhibidores de la PCR, pero no fue posible obtener resultados positivos.

El protocolo de Sweijd *et al.* (1998) no permitió la recuperación de ADNs de pequeño tamaño, ya que no se logró detectar los genes *16S ARNr* bacteriano objetivo de este estudio (Fig. 12). Mediante amplificación simultánea de los genes *28S ADNr* de ostreidos con un tamaño de amplicón de 382 pb y *16S ADNr* bacteriano (600 pb, aproximadamente) se comprobó la ausencia de inhibidores de PCR para muestras de ADN obtenido utilizando los diferentes métodos de extracción mencionados anteriormente.

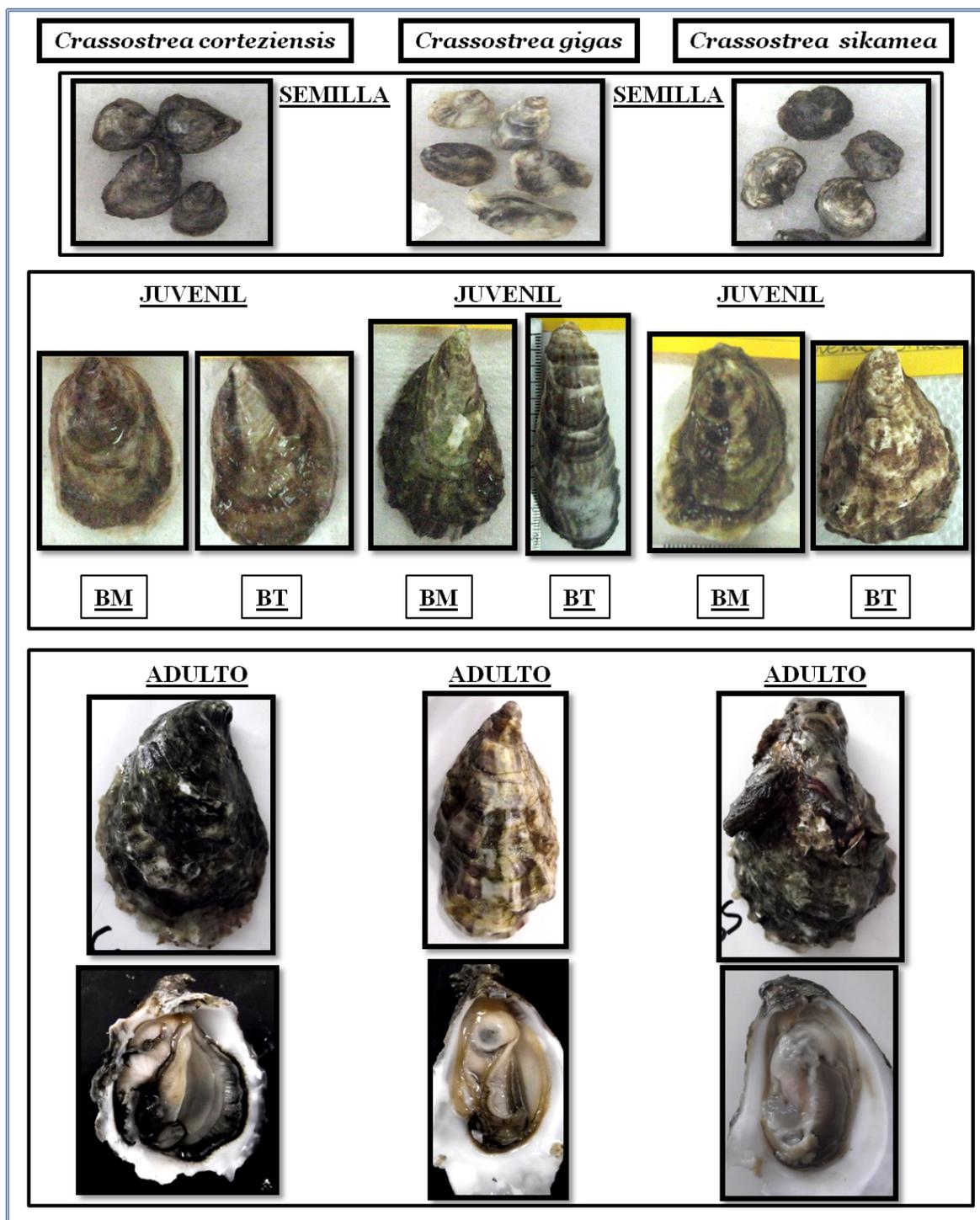


FIGURA 10. Apariencia externa e interna de los ostreidos recolectados.

BM: Sitio de Cultivo Bahía Magdalena; BT: Sitio de cultivo Bahía de Topolobampo.

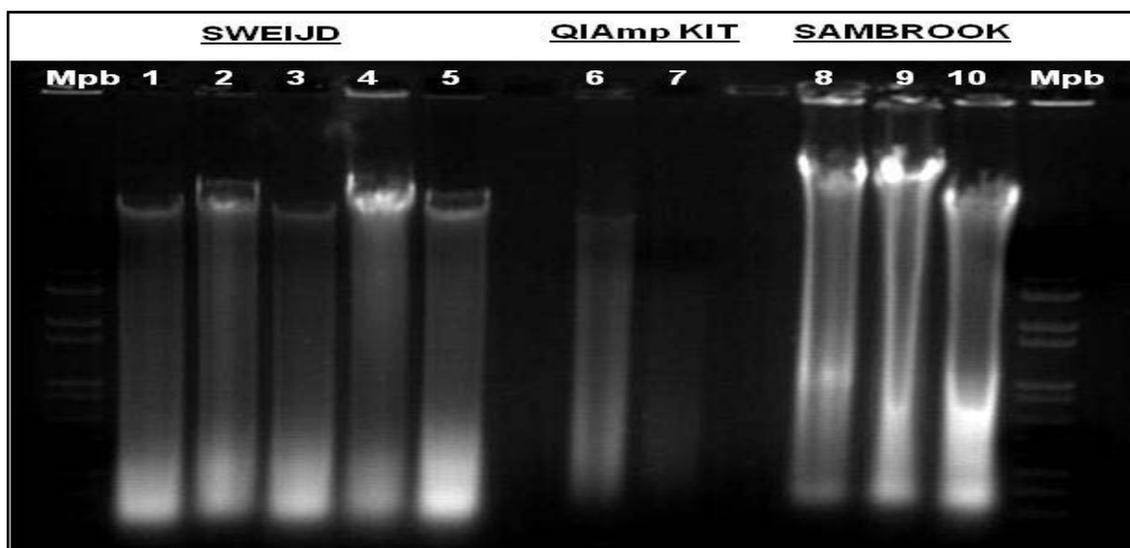


FIGURA 11. Determinación de la integridad del ADN extraído desde ostreidos, utilizando tres procedimientos diferentes: Sweijd *et al.*, (1998); QIAmp (Qiagen) y Sambrook *et al.*, (1989). Electroforesis en gel de Agarosa: carriles 1: JC16, 2: JC18, 3: JG15, 4: JG19, 5: AC1, 6: JC16, 7: JG15, 8: SG, 9: SC, 10: SC. Mpb: Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). S: Semilla, J: Juveniles, C: *Crassostrea corteziensis*, G: *Crassostrea gigas*.

TABLA III. Comparación de la concentración y pureza promedio del ADN extraído desde tejido de ostión utilizando tres protocolos diferentes.

Muestra *	Método	dsDNA ng/μl	A260/280 (D.O) ^a	A260/230 (D.O) ^a
JC	Sweijd	629	2,04	0,648
AC	Sweijd	882	2,02	1,132
JG	Sweijd	711	1,88	0,808
AG	Sweijd	504	2,00	0,825
SC	Sweijd	1223	2,00	0,894
JC	QIAmp	453	2,00	2,092
JG	QIAmp	175	2,03	2,400
AC	QIAmp	450	2,09	2,089
AG	QIAmp	265	2,06	2,094
SG	Sambrook	1733	1,98	1,700
SC	Sambrook	2949	1,9	1,700
SK	Sambrook	1524	1,8	1,500

*S-Semilla, J- Juveniles, C: *Crassostrea corteziensis*, G: *Crassostrea gigas*. K: *Crassostrea sikamea*.

En cada caso se ensayaron un total de 15 muestras ^a: D.O: Densidad óptica, absorbancia en nm.

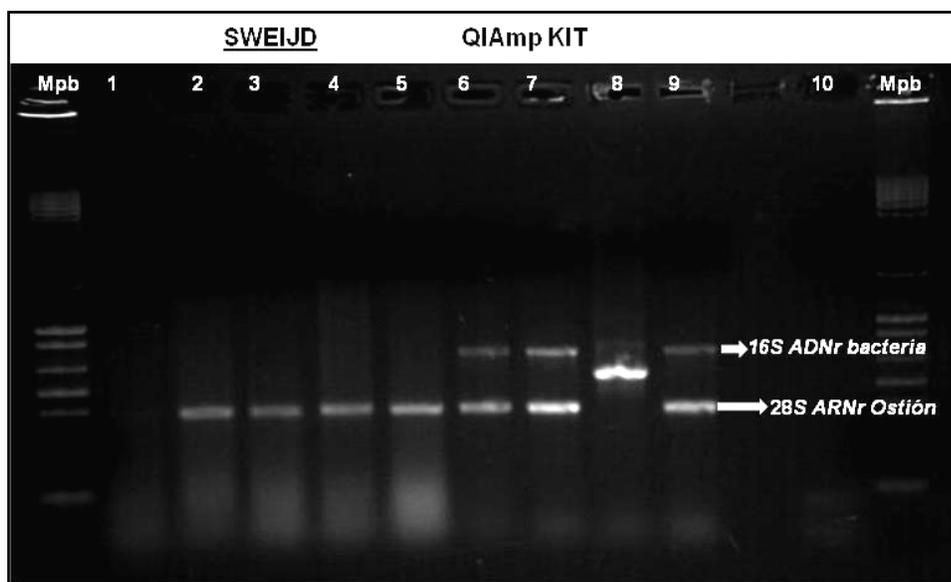


FIGURA 12. Determinación por PCR múltiple (genes 28S ADNr ostreidos y 16S ADNr Bacteria) de la ausencia de inhibidores para la amplificación del ADN extraído desde juveniles de *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas*. Electroforesis en gel de Agarosa. 1-5: ADN extraído desde juveniles de *C. corteziensis*, método Sweijid *et al.*, (1998); 7 y 8: ADN extraído desde juveniles de *C. corteziensis*, método QIAmp; 9: ADN de *Vibrio harveyi* ATCC 14126; 10: control de experimento. Mpb: Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Elección del par de iniciadores utilizados para amplificar el gen *16S ARNr*

Para elegir el cebador más eficiente a utilizar en este estudio se realizó un análisis *in silico* de diferentes *primers* comúnmente usados para amplificar los genes *16S ARNr* de bacterias y arqueas. Para determinar el cebador más adecuado para amplificar la región variable de Bacterias se establecieron los siguientes criterios: mayor cantidad (número) de alineamientos con secuencias del dominio bacteria y específicamente el grupo Proteobacteria (el más importante a analizar en este estudio), ausencia de alineamiento con secuencias del dominio arquea y ausencia de alineamiento cruzado con el genoma del ostión. Los resultados obtenidos para el gen *16S ARNr* bacteriano se muestran en la tabla IV, cabe destacar que solo se muestran en dicha tabla solo los resultados para los phylum considerados más relevantes para esta investigación y los grados de libertad corresponden a la posibilidad que 1, 2, o 3 bases nucleotídicas no aliñen perfectamente. El *primer* 341F presentó un 81 % de las secuencias disponibles para el dominio bacteriano, para el phylum Proteobacteria, existió un alineamiento que va desde un 73%-76%, dependiendo si se permite alineamiento completo o un alineamiento con variante en 3 nucleótidos. En el caso del cebador 939R se encontró un porcentaje de alineamiento que va desde un 35 % con 0 grado de libertad hasta un 60 % con 3 grados de libertad para el dominio bacteria y phylum Proteobacterias. El cebador 907R presentó un alineamiento de 48,4% con 0 grado de libertad hasta un 63,5% con 3 grados de libertad para el dominio Bacteria y un 33,4% a 60,8% para el grupo Proteobacteria. A pesar de que porcentaje de alineamiento con los grupos de interés para los cebadores 939 y 907 fueron muy similares este último fue descartado por no ser específico ya que tiene alineamiento cruzado del 68% con 3 grados de libertad para el dominio Arquea y además presenta alineamiento cruzado con genes presentes en Ostreidos, específicamente con la región del gen *18S ARNr* (Fig. 13). En el caso del cebador 788R presentó un porcentaje de alineamiento de 60,7% (0 grado de libertad) a 72,3% (2 grados de libertad) para el dominio bacteria y de 62,5 % a 68,9% para Proteobacterias. Este iniciador fue descartado por presentar alineamiento cruzado con el 84% (2 grados de libertad) de las secuencias disponibles para el dominio Arquea.

Dados los resultados obtenidos en el alineamiento de las secuencias disponibles en RPD, con los grupos a analizar y especificidad de alineamiento, se utilizaron en este estudio los oligonucleótidos 341F: 5-CCTACGGGAGGCAGCAG-3 (Muyzer *et al.*, 1993) y 939R: 5-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC-3 (Rudi *et al.*, 1997) que generan un amplicón de 600pb de la región hipervariable V3-V6 de la SSU (subunidad pequeña) del ARNr bacteriano.

En la Tabla V, se muestran los resultados obtenidos del análisis *in silico* para elegir el mejor *primer* para la amplificación del gen *16S ARNr* de Arqueas. En este caso, se prefirieron aquellos cebadores que presentaron el mayor número de alineamientos para el dominio arquea, principalmente con el phylum Crenarchaeota (filo más abundante en el ambiente marino), ausencia de alineamiento con el dominio bacteria y de alineamiento cruzado con genoma de ostión. El par de *primers* que cumplió con todos los criterios considerados, y por tanto fue el utilizado en este estudio, fue el forward 344F y reverse 915R (Casamayor *et al.*, 2002), que amplifica para una porción de aproximadamente, 600pb de la región variable V3-V6 de la SSU (subunidad pequeña) del ARNr Arquea.

TABLA IV. Alineamiento *in silico* para determinar el primer específico óptimo para amplificación de la región variable del gen *16S ARNr* Bacteriano.

PRIMER ♣	GL*	DOMINIO										DOMINIO
		Bacteria	Acidobacteria	Firmicutes	Bacteroidetes	Actinobacteria	Chlamydiae	Fusobacteria	Proteobacteria	Spirochaetes	Cyanobacteria	
341F	0	75	71	84	78	85	1	76	73	81	58	0
	1	79	77	88	80	88	28	79	76	85	61	1
	2	81	77	89	81	89	29	80	76	86	62	48
788R	0	61	34	66	71	78	51	58	63	55	0	0
	1	69	61	75	76	81	54	61	68	68	2	76
	2	72	62	76	76	81	54	62	69	77	55	84
907R	0	48	36	61	57	67	1	44	33	64	48	0
	1	62	41	65	63	75	51	47	59	72	51	1
	2	63	42	66	64	75	52	47	60	72	52	62
	3	64	42	66	65	75	52	47	61	72	52	68
939R	0	35	28	30	51	45	34	2	35	51	44	0
	1	56	34	61	57	72	51	43	54	64	48	0
	2	59	35	64	60	73	51	45	57	65	49	0
	3	60	35	64	60	73	51	46	57	71	49	0

♣: Primer Forward: 341F (Muyzer *et al.*, 1993), primers reverse: 788R (Magne *et al.*, 2006), 907R (Casamayor *et al.*, 2002) y 939R (Rudi *et al.*, 1997).

*GL: Grados de Libertad. No se muestran los resultados para el alineamiento del dominio Bacteria porque en todos los casos fue igual a 0.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AM182263.1	Crassostrea gigas partial 18S rRNA gene	32.2	32.2	100%	0.016	95%	
AB064942.1	Crassostrea gigas gene for 18S rRNA, complete sequence	32.2	32.2	100%	0.016	95%	
X60315.1	C. virginica small subunit ribosomal RNA gene	32.2	32.2	100%	0.016	95%	
AF276252.1	Crassostrea virginica clone Cvi-11 microsatellite sequence	26.3	26.3	65%	1.0	100%	
GU324325.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba57G5, complete sequence	24.3	1442	100%	4.0	100%	
GU207460.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba96P24, complete sequence	24.3	1056	100%	4.0	100%	
GU207450.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba8F15, complete sequence	24.3	1177	100%	4.0	100%	
GU207448.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba107F17, complete sequence	24.3	1038	100%	4.0	100%	
GU207424.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba183L3, complete sequence	24.3	1210	100%	4.0	100%	
GU207420.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba171O9, complete sequence	24.3	1126	100%	4.0	100%	
AJ543432.1	Crassostrea gigas Tld gene for Tollid-like protein, exons 1-18	24.3	130	95%	4.0	100%	
AJ547617.1	Crassostrea gigas partial mRNA for ribosomal protein L32 protein	24.3	57.0	60%	4.0	100%	
JF919378.1	Crassostrea arkansensis clone Ca83 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial	22.3	22.3	55%	16	100%	
HM461257.1	Crassostrea hongkongensis isolate CHK36 clone Ch324 microsatellite sequence	22.3	22.3	55%	16	100%	
HM461250.1	Crassostrea hongkongensis isolate CHK36 clone Ch317 microsatellite sequence	22.3	22.3	55%	16	100%	
GG825422.1	Crassostrea hongkongensis clone CHK125 microsatellite sequence	22.3	22.3	55%	16	100%	
GU852824.1	Crassostrea hongkongensis clone Ch304 microsatellite sequence	22.3	22.3	55%	16	100%	
GU852822.1	Crassostrea hongkongensis clone Ch302 microsatellite sequence	22.3	22.3	55%	16	100%	
GU207462.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba80D21, complete sequence	22.3	916	95%	16	100%	
GU207459.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba177C12, complete sequence	22.3	959	100%	16	100%	
GU207458.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba118P9, complete sequence	22.3	1257	95%	16	100%	
GU207457.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba136N15, complete sequence	22.3	1412	100%	16	100%	
GU207456.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba158K9, complete sequence	22.3	844	100%	16	100%	
GU207455.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba45B21, complete sequence	22.3	1005	100%	16	100%	
GU207454.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba3D14, complete sequence	22.3	1476	100%	16	100%	
GU207445.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba172M23, complete sequence	22.3	912	95%	16	100%	
GU207442.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba151B13, complete sequence	22.3	1286	100%	16	100%	
GU207439.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba30A15, complete sequence	22.3	1077	100%	16	100%	
GU207438.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba89P3, complete sequence	22.3	1300	100%	16	100%	
GU207437.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba108I1, complete sequence	22.3	1324	100%	16	100%	
GU207436.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba95I10, complete sequence	22.3	1049	100%	16	100%	
GU207435.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba18M12, complete sequence	22.3	1369	100%	16	100%	
GU207434.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba118I16, complete sequence	22.3	894	100%	16	100%	
GU207430.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba133A21, complete sequence	22.3	1402	100%	16	100%	
GU207426.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba17L12, complete sequence	22.3	918	100%	16	100%	
GU207418.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba127F5, complete sequence	22.3	1149	100%	16	100%	
GU207415.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba78P23, complete sequence	22.3	1249	100%	16	100%	
GU207414.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba106K14, complete sequence	22.3	1376	100%	16	100%	
GU207412.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba50P9, complete sequence	22.3	704	100%	16	100%	
GU207411.1	Crassostrea gigas clone CG_Ba18I16, complete sequence	22.3	1441	100%	16	100%	

FIGURA 13. Análisis *in silico* que muestra el alineamiento cruzado del primer 907R con genes de Ostreidos. La imagen corresponde a los resultados obtenidos del alineamiento BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

TABLA V. Alineamiento *in silico* para determinar el mejor *primer* específico para amplificación del gen *16S ARNr* Arquea a usar en esta investigación.

<i>Primer</i> ♣	GL*	DOMINIO		PHYLUM		
		Archaea	Crenarchaeota	Euryarchaeota	Korarchaeota	Nanoarchaeota
344F	0	41.6	11.8	63.4	12.3	0.0
	1	62.1	58.7	72.5	80.2	0.0
	2	77.5	73.6	76.6	85.4	35.8
915R	0	53.7	57.4	57.2	1.4	0.0
	1	63.3	70.1	64.3	1.9	3.8
	2	66.3	73.7	65.9	82.5	30.2
A571F	0	0.4	1.6	0.0	0	0.0
	1	27.0	59.6	1.1	0.5	1.9
	2	44.5	74.5	22.9	87.7	3.8
UA1204R	0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
	1	2.1	27.6	21.5	0.5	0.0
	2	28.4	36.2	30.6	75.5	3.8
4F	0	13.2	17.5	8.4	13.2	0.0
	1	20.9	26.3	14.1	15.6	0.0
	2	24.0	30.1	16.9	17.5	22.6
958R	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1	21.4	27.2	22.8	0.9	0.0
	2	38.8	47.3	40.4	79.7	3.8

♣: Primer Forward: 4F (Vetriani *et al.*, 1999) y Reverse: 958R (DeLong *et al.*, 1992); Forward A571F y Reverse UA1204R (Baker *et al.*, 2003); Forward 344F y Reverse 915R (Casamayor *et al.*, 2002). *GL: Grados de Libertad.

Comparación de la microbiota bacteriana según estado de desarrollo y sitio de cultivo mediante el análisis de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR *16S ARNr*

Para cada muestra de ADN extraído desde semillas, juveniles y adultos de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* se logró amplificar eficientemente la región variable V3-V6 *16S ARNr* bacteriana. Como resultado de dicha amplificación se obtuvieron productos limpios de 600pb que correspondieron con el tamaño esperado según análisis *in silico* y con el obtenido por el control positivo (Fig. 14). En la figura 15, se muestra una fotografía representativa, de una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE/Nitrato) de los perfiles tipo obtenidos desde muestras de ostiones, a partir de los productos de amplificación digeridos con la enzima *AluI*. Los resultados obtenidos del cálculo del coeficiente de similitud DICE (Cs), mostrados como porcentajes y realizados a partir de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR *16S ARNr* para *C. gigas* y *C. corteziensis* en cada uno de los estados de crecimiento y sitio de cultivo, son representados como dendogramas según agrupación UPGMA. Los resultados obtenidos fueron confirmados estadísticamente por PCA, utilizando los perfiles del RFLP para las mismas muestras.

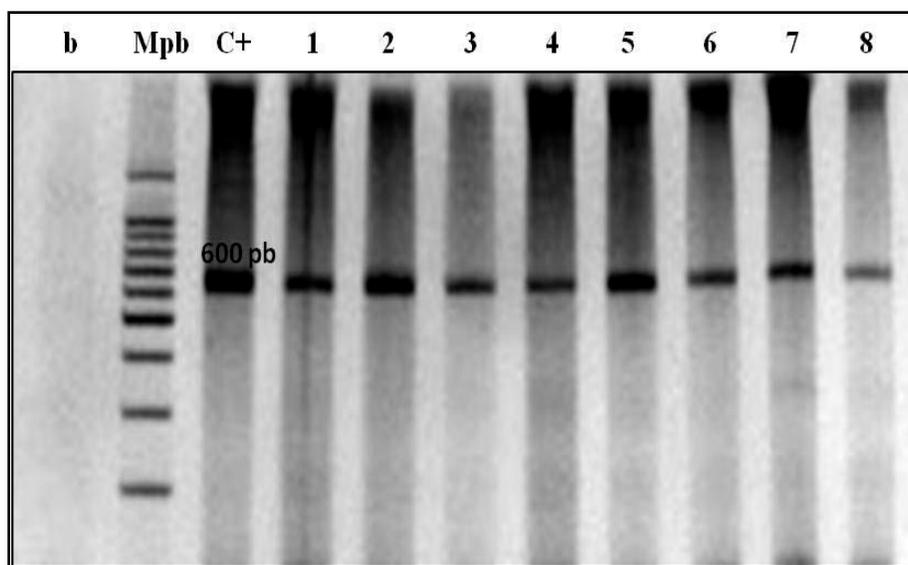


FIGURA 14. Amplificación por PCR de la región variable V3-V6 *16S ARNr* bacteriano a partir del ADN total extraído de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis*. Electroforesis en gel PAGE/NITRATO. b: control de contaminación; Mpb: Marcador de peso molecular 100

pb (BenchTop 100 pb DNA ladder, PROMEGA); C+: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802; carriles : 1-3: Semillas; 4-6: Juveniles 7-9: adultos.

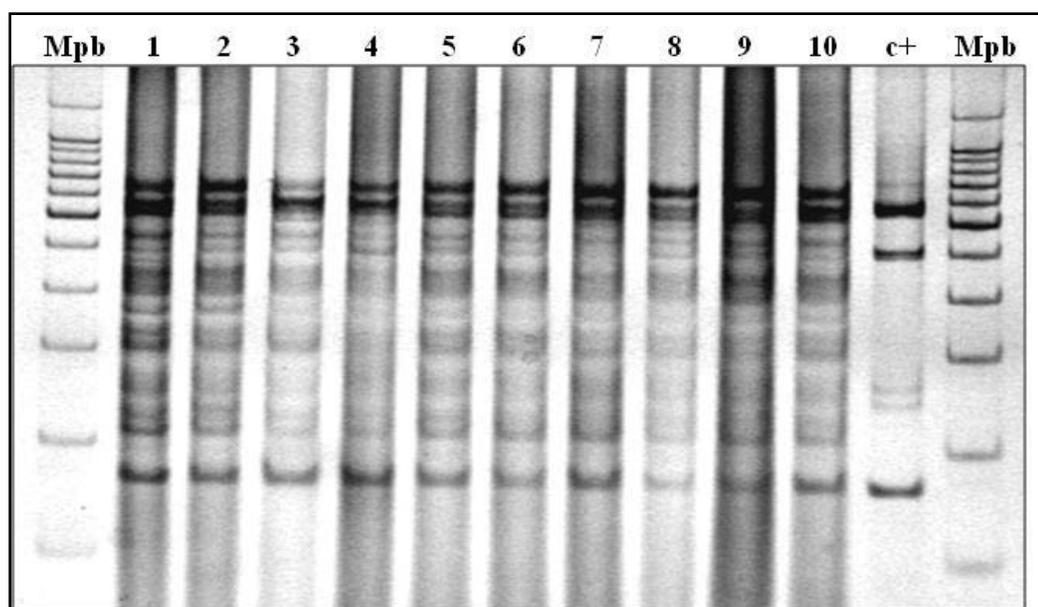


FIGURA 15. Perfiles obtenidos mediante RFLP-PCR 16S ARNr bacteriano a partir ADN proveniente de semillas de *Crassostrea corteziensis*. PAGE/Nitrato de la digestión con *AluI* del amplicón 16SADNr bacteriano. Mpb: marcador de peso molecular 100 pb Biotech (Promega); carriles 1-10: RFLP-16SADNr bacteriano obtenido desde semillas; c+: *Listonella pelagia* ATCC 25916. Imagen: Electroforesis en gel PAGE/NITRATO.

Análisis de similitud entre la microbiota bacteriana asociada a las semillas de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* según los perfiles obtenidos por RFLP-PCR 16S ARNr

Los perfiles obtenidos para el grupo de semillas de *C. corteziensis* (n=15) fueron muy similares, lo que revela que existe una gran homología en cuanto a la microbiota bacteriana asociada a la población ya que presentaron una similitud $C_s > 92\%$ (Tabla VI, Figura 16). Cuando se analizaron los perfiles de cada individuo se observaron dos agrupaciones de 6 muestras cada una, con perfiles idénticos. Las semillas de *C. gigas* mostraron una similitud $C_s > 72\%$, menor a la que presentó *C. corteziensis* y con mayor diferencias si las comparamos a nivel individual (Tabla VI, Figura 16). Al comparar los perfiles obtenidos

entre semillas de ambas especies se observó que 18 muestras (n total=24) presentaron una uniformidad en cuanto a la composición de la microbiota generando una sola agrupación (Grupo 1), con similitud alta (Cs > 88%) aunque existe una agrupación minoritaria de 6 semillas que forman un grupo aparte (Grupo II), con una Cs > 84% y que correspondió únicamente a ejemplares de *C. gigas* (Tabla VI, Figura 16).

TABLA VI. Resumen de los Coeficiente de similitud (Cs, %) obtenido de los perfiles del RFLP de la microbiota asociada a *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* cuando se comparan etapa de crecimiento y sitio de cultivo.

Especie Ostreido	Etapas Crecimiento	L-BL	BM	BT
<i>Crassostrea corteziensis</i>	Semilla	92		
	Juvenil		87	81
	Adulto		75	55
<i>Crassostrea gigas</i>	Semilla	72		
	Juvenil		53	57
	Adulto		56	68
Ambas especies*	Semilla	88		
	Juvenil		80	55
	Adulto		40	40

L-BL: Laboratorio de producción de semilla en Bahía de la Paz. BM: sitio de cultivo Punta Botella, Bahía Magdalena; BT: Sitio de cultivo Bahía de Topolobampo. * Comparación entre los perfiles RFLP de *C. gigas* vs *C. corteziensis*

El Análisis de Componentes Principales (PCA) se utilizó para comparar la variación de la microbiota bacteriana según los perfiles del RFLP, entre las semillas de *C. gigas* y *C. corteziensis* y los resultados obtenidos se presentan como diagramas de dispersión

tridimensional. Como se puede observar en la figura 17; existe un agrupamiento de las semillas de ambas especies de ostión, explicada por tres componentes principales (PC1= 42.4%, $\lambda = 36.9$; PC2 = 19.8 %, $\lambda = 17.1$ y PC3 = 10.2, $\lambda = 8.8$), con una varianza acumulada de 72.4%. Sin embargo, se observa un grupo separado que corresponde a semillas de *C. gigas*. Estos resultados concuerdan con los observados mediante el análisis de similitud DICE (Fig.16, tabla VI).

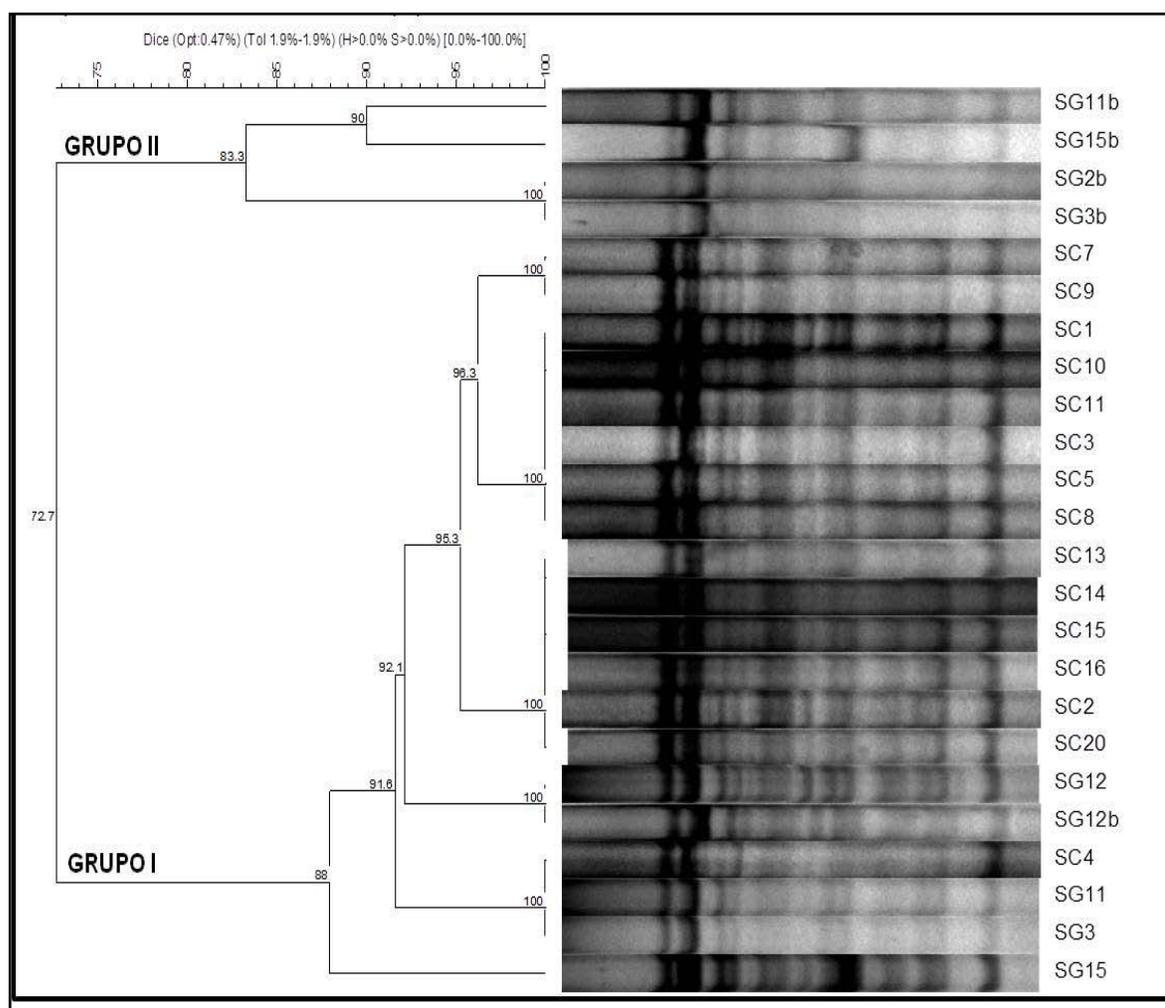


FIGURA 16. Dendrograma representado la similitud (Cs (%)) observada a partir de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR *16S ARNr* bacteriano para SEMILLAS de *Crassostrea cortezensis* y *C. gigas*. [Dice (Tol 1.6%) (H>0.0% S>0.0%) (0.0%-100%)]. SC: semilla *C. cortezensis*; SG: semillas de *C. gigas*. Cada número corresponde a una muestra diferente (individuo).

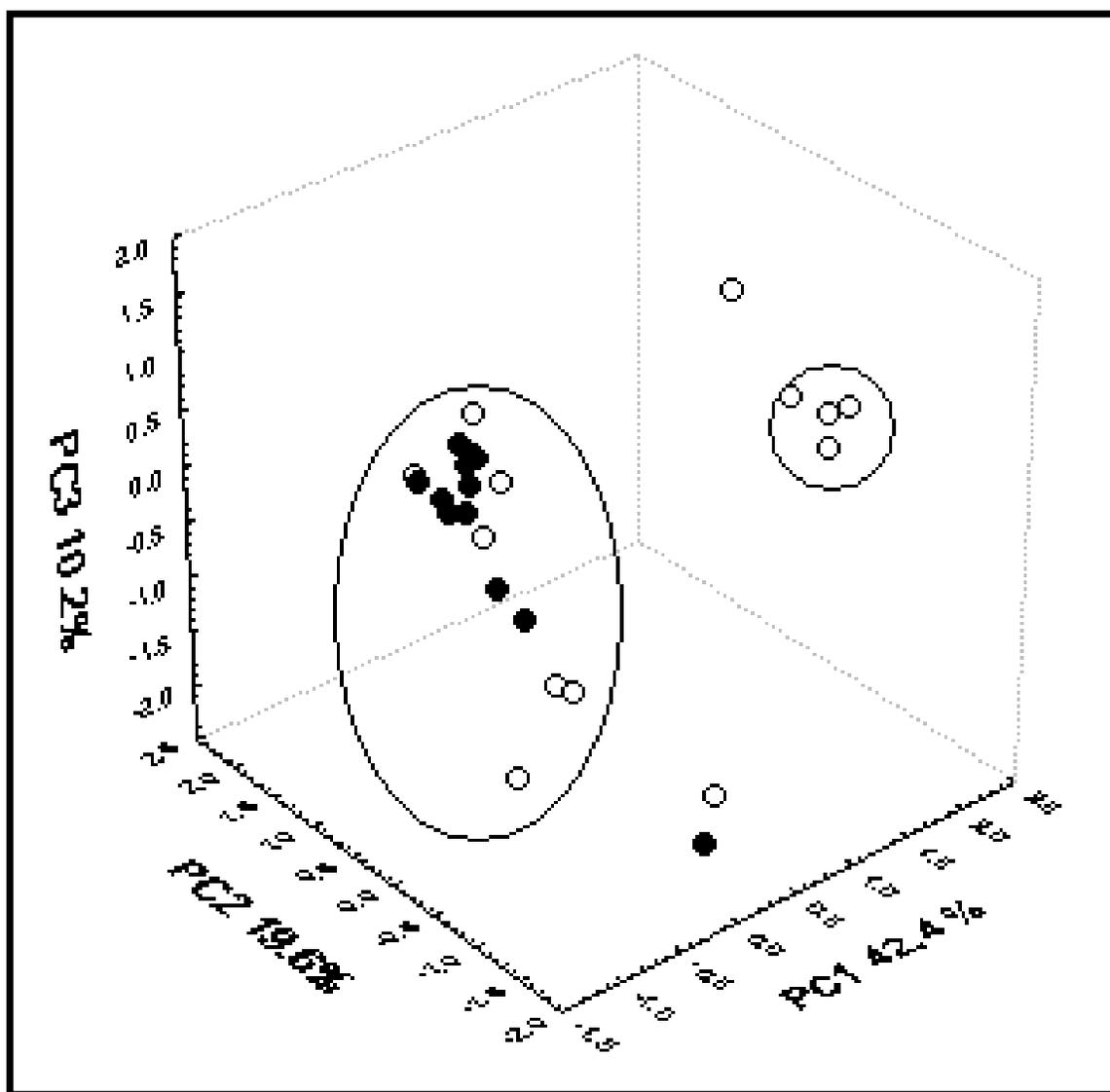


FIGURA 17. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la comparación de los perfiles RFLP del gen *16S ARNr* de semillas de *Crassostrea gigas* (○) y *C. corteziensis* (●).

Variación de la microbiota bacteriana entre juveniles y adultos de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* en los diferentes sitios de cultivo según los perfiles obtenidos por RFLP-PCR 16S ARNr

Los resultados DICE para los perfiles obtenidos a partir de juveniles de *C. corteziensis* indicaron que existen diferencias entre la microbiota asociada a estos organismos cuando son engordados en sitios diferentes, ya que se observan dos agrupamientos ($C_s > 70\%$) (Fig. 18, tabla VI). Dentro de la población proveniente de BT se obtuvieron índices de similitud $C_s > 81\%$, mientras que para BM fue $> 86\%$, lo que muestra una uniformidad intraespecífica de la microbiota asociada a cada localidad, a excepción del ostión JC6 (Fig. 18). Cuando se realizó el mismo análisis pero en juveniles de *C. gigas*, se encontraron diferencias importantes entre los perfiles de cada individuo, con índices $C_s > 53$ en BM y $C_s > 57\%$ en BT y no se observó una asociación clara entre la composición de la microbiota y el lugar de procedencia de los ostiones (tabla VI y Fig. 19), lo que indica una mayor variación entre la microbiota asociada a estos organismos.

Para determinar si existe similitud entre la microbiota de diferentes especies pero engordados en el mismo sitio de cultivo, se realizó una comparación entre la microbiota asociada a juveniles de las dos especies de ostión pero en diferentes localidades (tabla VI). En juveniles provenientes de BM, se observó un agrupamiento de 13 juveniles de *C. gigas* y *C. corteziensis* en un n total=16, con uniformidad en los perfiles encontrados $C_s > 80\%$. Sin embargo en BT, se observaron diferencias entre los juveniles de *C. gigas* y de *C. corteziensis* que se reflejaron en dos agrupaciones distintas con $C_s > 55\%$.

Los resultados obtenidos para los RFLPs de adultos de *C. corteziensis* y *C. gigas* no mostraron claras entre los grupos de ostiones, sitio de cultivo y especie analizada (Tabla VI). Para ambas especies la similitud intraespecífica fue $C_s > 56\%$, lo que estaría indicando variabilidad entre la microbiota asociada a ostiones en el estado adulto.

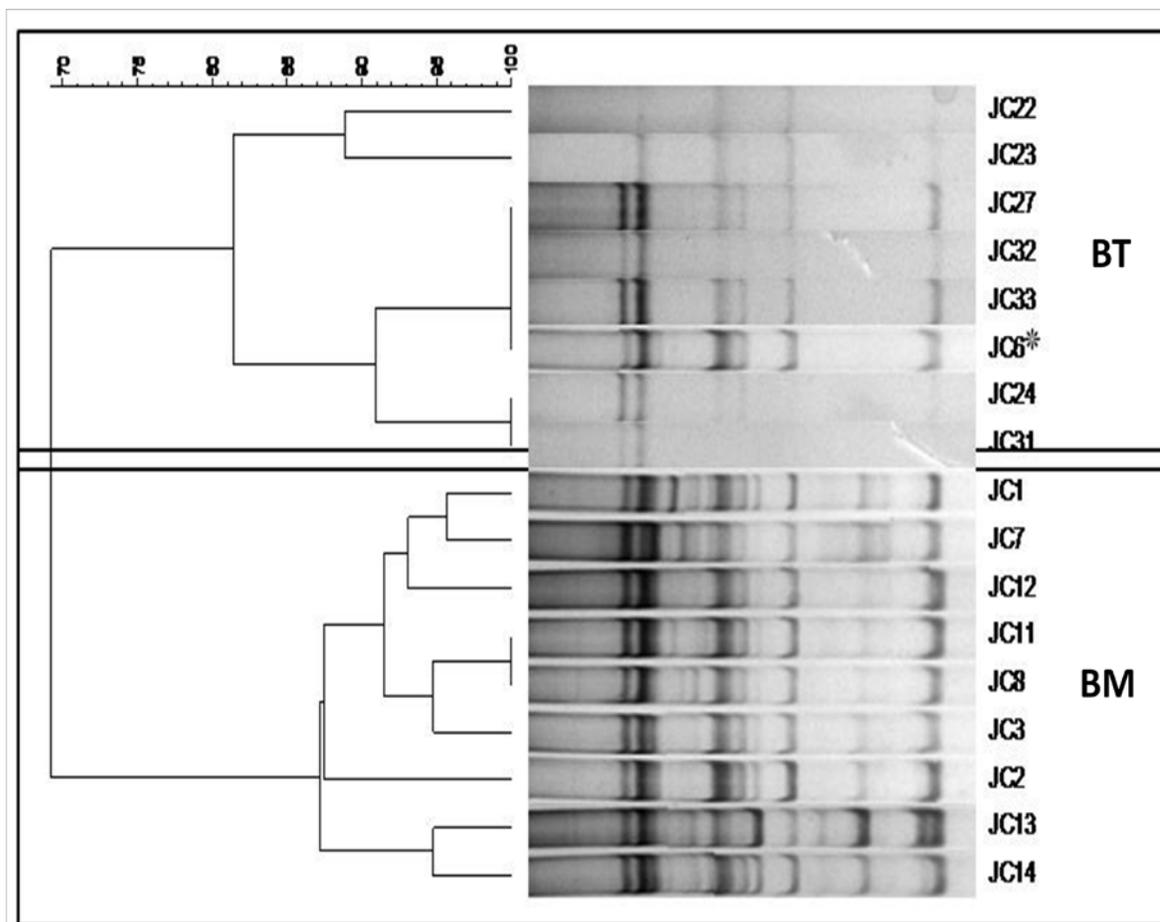


FIGURA 18. Dendrograma representado la similitud (Cs (%)) observada a partir de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR *16S ARNr* bacteriano en **Juveniles de *Crassostrea corteziensis*** [Dice (Tol 1.9%) (H>0.0% S>0.0%) (0.0%-100%)]. JC: Juveniles de *C. corteziensis*. Cada número corresponde a una muestra diferente (individuo). JC1-15 provienen de BM: Sitio de cultivo Bahía Magdalena. JC 22-33 provienen de BT: Sitio de cultivo Bahía de Topolobampo.

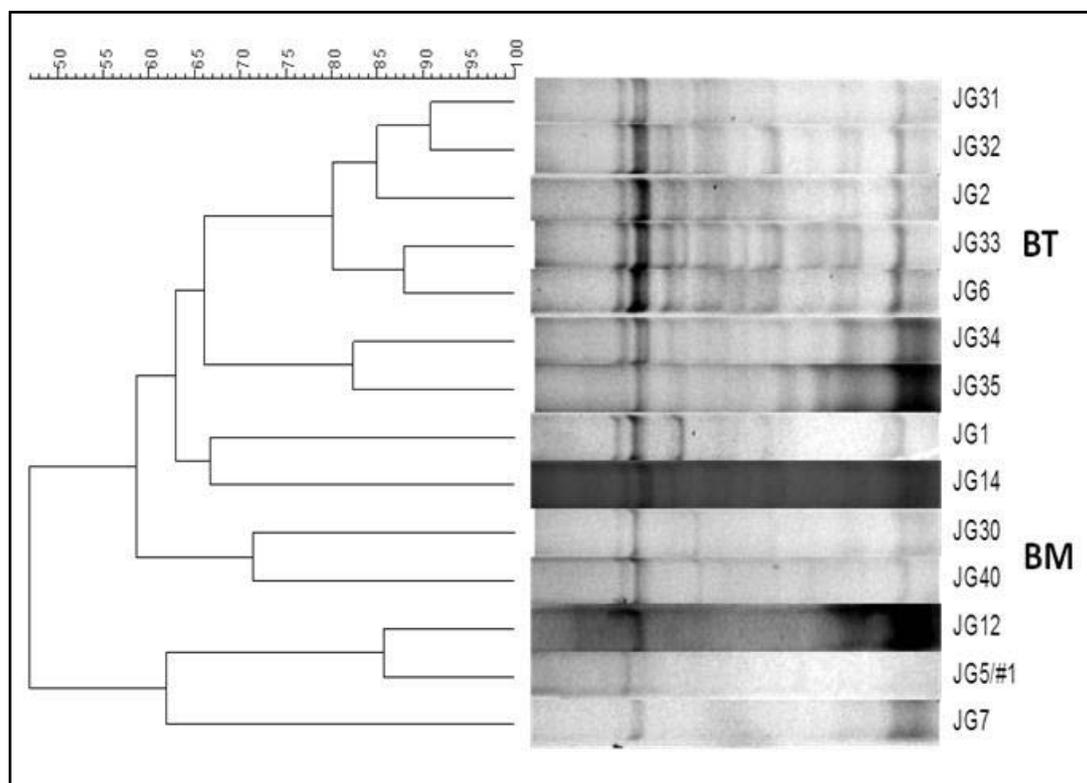


FIGURA 19. Dendrograma representado la similitud (Cs (%)) observada a partir de la comparación de los perfiles obtenidos por RFLP-PCR *16S ARNr* bacteriano en Juveniles de *Crassostrea gigas* [Dice (Tol 1.9%) (H>0.0% S>0.0%) (0.0%-100%)] JG: Juveniles de *C. gigas*. Cada número corresponde a una muestra diferente (individuo). JG1-14 provienen de BM: Sitio de cultivo Bahía Magdalena, JG30- 40 provienen de BT: Sitio de cultivo Bahía de Topolobampo.

Los resultados del PCA (Fig. 20), de las comparaciones entre juveniles y adultos de las dos especies de ostión en los diferentes sitios de cultivo, respaldan estadísticamente los resultados observados en los análisis de los perfiles de RFLPs. En la figura 20a, se puede observar que existe una asociación entre juveniles y adultos de *C. corteziensis* en un mismo sitio de engorda, representado por una varianza acumulada del 73% (PC1 = 35.0%, $\lambda=30.4$; PC2= 23.2%, $\lambda=20.1$; PC3= 15.4%, $\lambda=13.4$). Estos resultados confirman el patrón observado en el dendrograma estimado a partir de las mismas muestras (Fig. 18). Por el contrario, los resultados para *C. gigas* (Fig.20b), mostró que no existe correlación entre los perfiles del RFLP en un mismo sitio de cultivo, respaldando estadísticamente los resultados obtenidos en los dendogramas y con los cálculos Cs (Fig. 19, tabla VI).

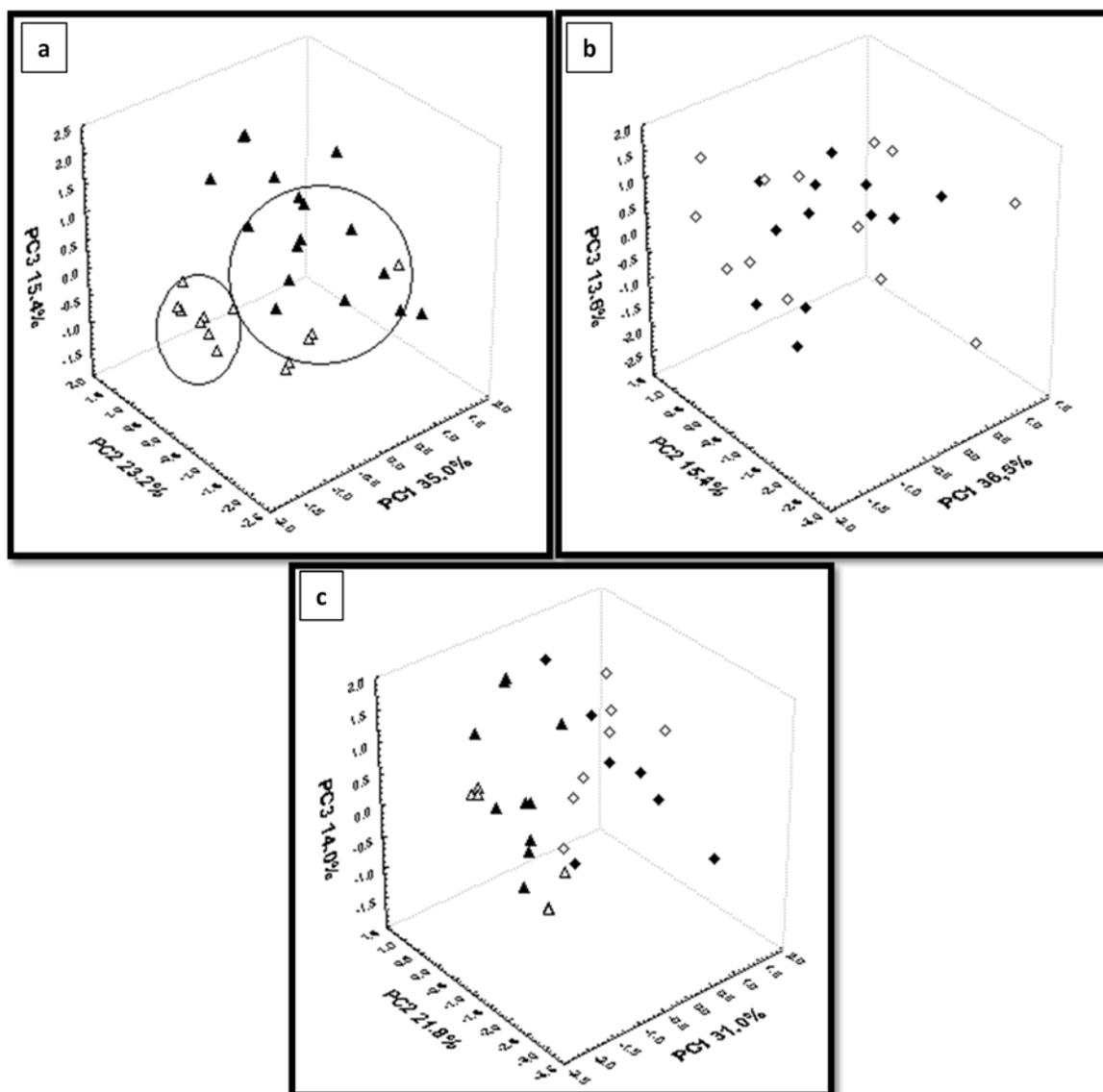


FIGURA 20. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la comparación de los perfiles RFLP del gen *16S ARNr* entre juveniles y adultos de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* en dos sitios de cultivo diferente. a) Comparación de los patrones de bandas RFLP de juveniles y adultos de *C. corteziensis* en los dos sitios de engorda. Bahía Magdalena (▲) y Bahía de Topolobampo (Δ). b) Comparación de los patrones de bandas RFLP de juveniles y adultos de *C. gigas* en los dos sitios de engorda. Bahía Magdalena (▲) y Bahía de Topolobampo (Δ). c) Comparación de los patrones de bandas RFLP de juveniles de *C. corteziensis* (▲) vs *C. gigas* (◆) engordados en Bahía Magdalena y juveniles de *C. corteziensis* (Δ) vs *C. gigas* (◇) engordados en Bahía Topolobampo.

El análisis por PCA, de la comparación de los perfiles RFLPs de juveniles de *C. gigas* y *C. corteziensis* mostraron una dispersión clara de los datos (Fig. 20c), apoyando los resultados obtenidos con los datos de Cs (tabla VI), lo que sugiere que no existe similitud entre la microbiota asociada a estos ostiones aunque hayan sido engordados en un mismo sitio.

Análisis de la estabilidad de la microbiota asociada a las semillas de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* cuando son trasplantadas a los sitios de engorda

Usando los perfiles obtenidos por RFLP, se estudió el efecto de la transferencia de las semillas a los sitios de cultivo para su engorda, sobre la microbiota asociada. En la tabla VII, se puede observar que existe una alta similitud ($C_s > 80\%$) entre los perfiles de las semillas y juveniles de *C. corteziensis* cuando esta es trasplantada a el sitio de engorda en Bahía Magdalena, lo que indica que la microbiota se mantiene estable. La microbiota asociada a *C. corteziensis*, particularmente en el sitio BM, se mantiene estable durante todas sus etapas de crecimiento, ya que se observan altos índices de similitud durante todo el proceso de engorda (Tabla VI y VII). Sin embargo, en el sitio de Bahía Topolobampo, la microbiota no se mantiene estable, al contrario sufre alteración ya que existe una baja similitud de los perfiles RFLP (tabla VII). Los valores de C_s para *C. gigas* muestran que la microbiota asociada a esta especie de ostión sufre perturbaciones cuando es sembrada la semilla a los dos sitios de cultivo (tabla VII).

Mediante PCA, se procedió a respaldar estos resultados estadísticamente, los que mostraron que existe una correlación significativa entre la microbiota asociada a las semillas y los juveniles de *C. corteziensis* en el sitio de BM ($PC1= 37.2\%$, $\lambda= 32.4$; $PC2= 19.1\%$, $\lambda= 16.6$; $PC3= 16.2\%$, $\lambda= 14.1$), esta correlación no se observó en la localidad de bahía Topolobampo (Fig. 21a). No se observó correlación entre las semillas y juveniles en ambos sitios de cultivo para la especie *C. gigas* (Fig. 21b).

TABLA VII. Resumen de los Coeficiente de similitud (Cs, %) obtenido de los perfiles del RFLP de la microbiota asociada a semillas vs los juveniles de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* en un mismo sitio de cultivo.

Especie Ostreido	Etapa Crecimiento	Sitio de Engorda	
		BM	BT
<i>Crassostrea corteziensis</i>	Semilla*	80	40
<i>Crassostrea gigas</i>	Semilla*	54	65

*: Comparación de los perfiles obtenidos por RFLP de las semillas con los obtenidos para juveniles

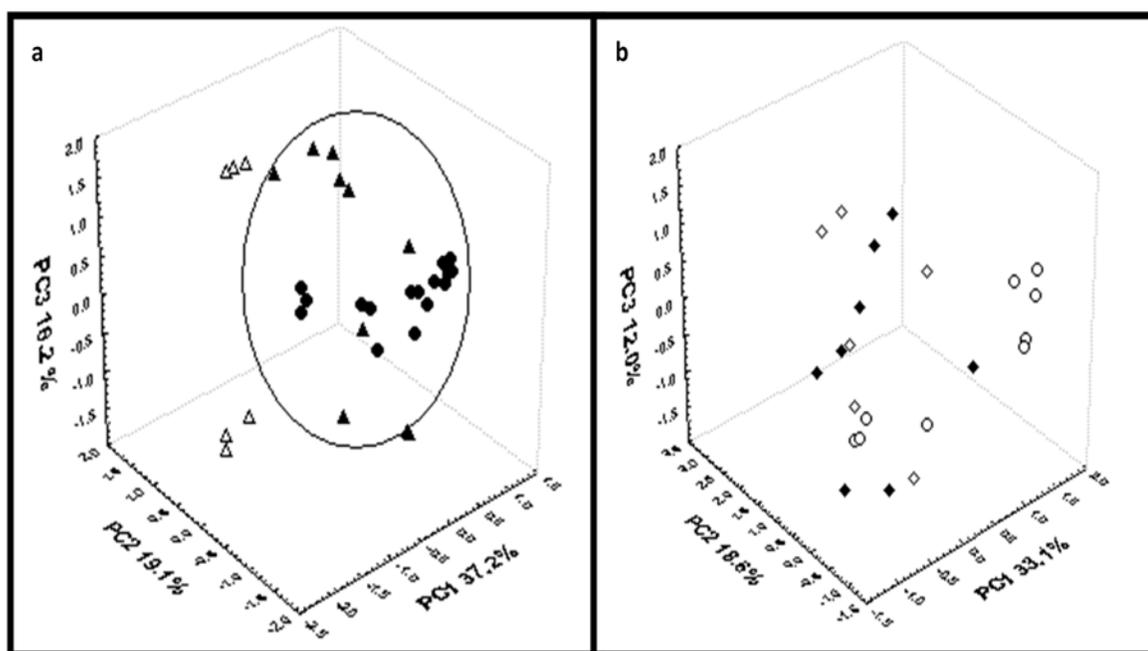


FIGURA 21. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la comparación de los perfiles RFLP del gen *16S ARNr* de semillas vs juveniles en un mismo sitio de cultivo. a) Comparación de los patrones de bandas RFLP de semillas y juveniles de *C. corteziensis* en un mismo sitio de cultivo. Semilla (●), juveniles Bahía Magdalena (▲) y juveniles Bahía de Topolobampo (△). b) Comparación de los patrones de bandas RFLP de semillas y juveniles de *C. gigas* en un mismo sitio de cultivo. Semilla (○), juveniles Bahía Magdalena (◇) y juveniles Bahía de Topolobampo (◆).

Determinación de la composición de la comunidad bacteriana asociada a *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* mediante TGGE-PCR 16S ARNr

El estándar utilizado en todos los ensayos de TGGE se muestra en la Fig. 22. En la parte A de la figura, se muestran todas las cepas bacterianas probadas y en la parte B, el estándar finalmente seleccionado para utilizar en este estudio.

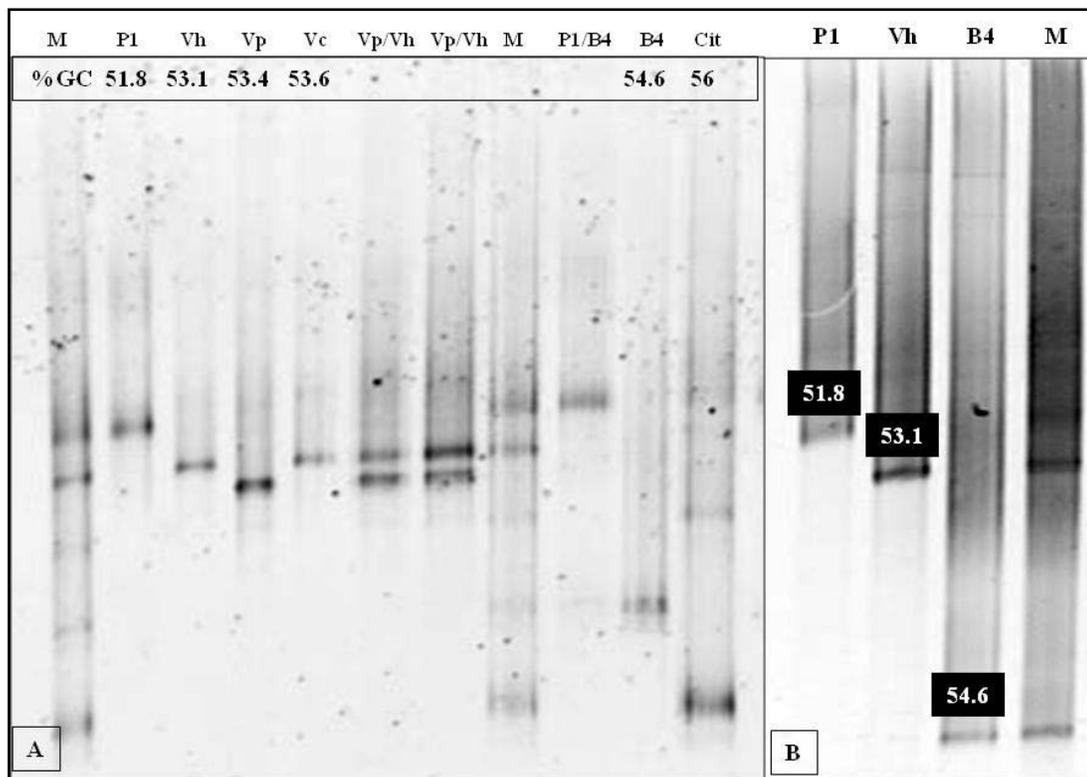


FIGURA 22. Elaboración del estándar utilizado como referencia en los ensayos de TGGE. P1: *Pseudomona aeruginosa* P1; Vh: *Vibrio harveyi* ATCC 14126; Vp: *Vibrio parahemolyticus* ATCC 17802; Vc: *Vibrio carcarie* ATCC 35084; B4: *Bacillus subtilis* Balcázar; Cit: *Citrobacter gillenii*. % GC: contenido de GC calculado a partir de análisis de secuencia utilizando programa BioEdit. Imagen del gel de poliacrilamida teñido con CyberGreen.

Se realizaron TGGEs para *C. gigas* y *C. corteziensis*, en estado de semilla, juvenil y adulto en los dos sitios de engorda, esto para determinar la composición de la microbiota asociada. Un ejemplo de los TGGE obtenidos para semillas de *C. gigas* y *C. corteziensis* se muestra en la figura 23. Para cada uno de los geles se cortaron las bandas que corrieron diferente en

el gel y que se observaron claramente definidas. Dichas bandas fueron consideradas como OTUs, un ejemplo se muestra con flechas en la figura 23. Para enviar a secuenciación, cada una de las bandas consideradas fue re-amplificada por PCR y cortada con la enzima *AluI* para verificar que la banda fuera única (OTU) y no un artefacto erróneo de la PCR. Un ejemplo de lo expresado anteriormente, se muestra en la figura 24, donde se puede observar que las bandas C y E que se vieron como diferentes en el TGGE (aunque migraron muy cercanas una de otra), en realidad son heterodupletes ya que tienen el mismo perfil de restricción, lo mismo se observa con las bandas F y G.

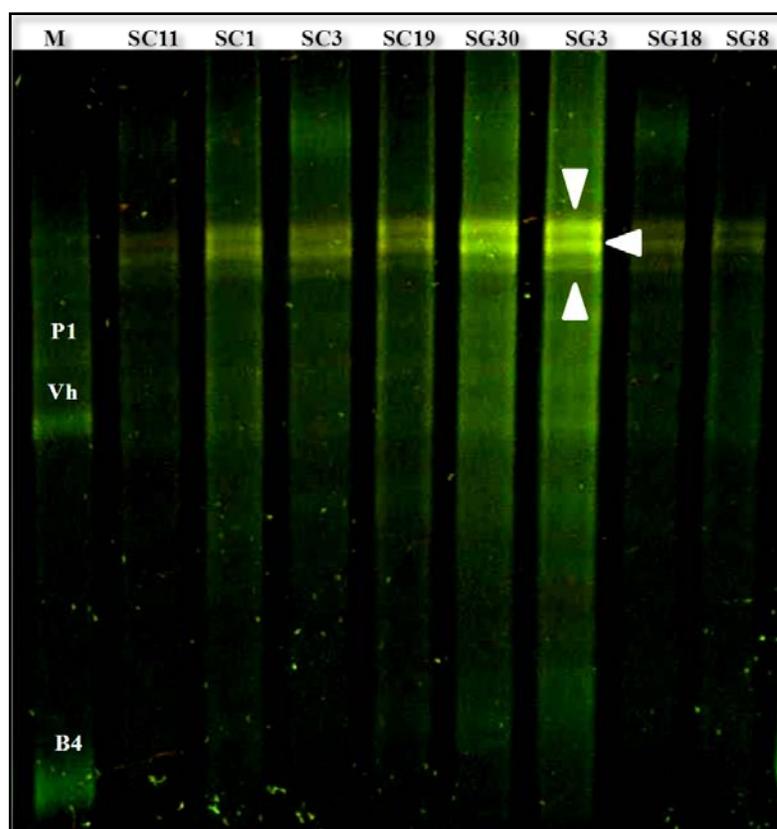


FIGURA 23. Perfiles obtenidos por TGGE-PCR 16SADNr a partir de Semillas de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis*. (▶) Indica las bandas consideradas como OTUs y que fueron cortadas para secuenciación. S: semilla C: *C. corteziensis*; G: *C. gigas*. Cada número (carril) corresponde a una muestra diferente. Imagen de gel de poliacrilamida teñido con Syber Green.

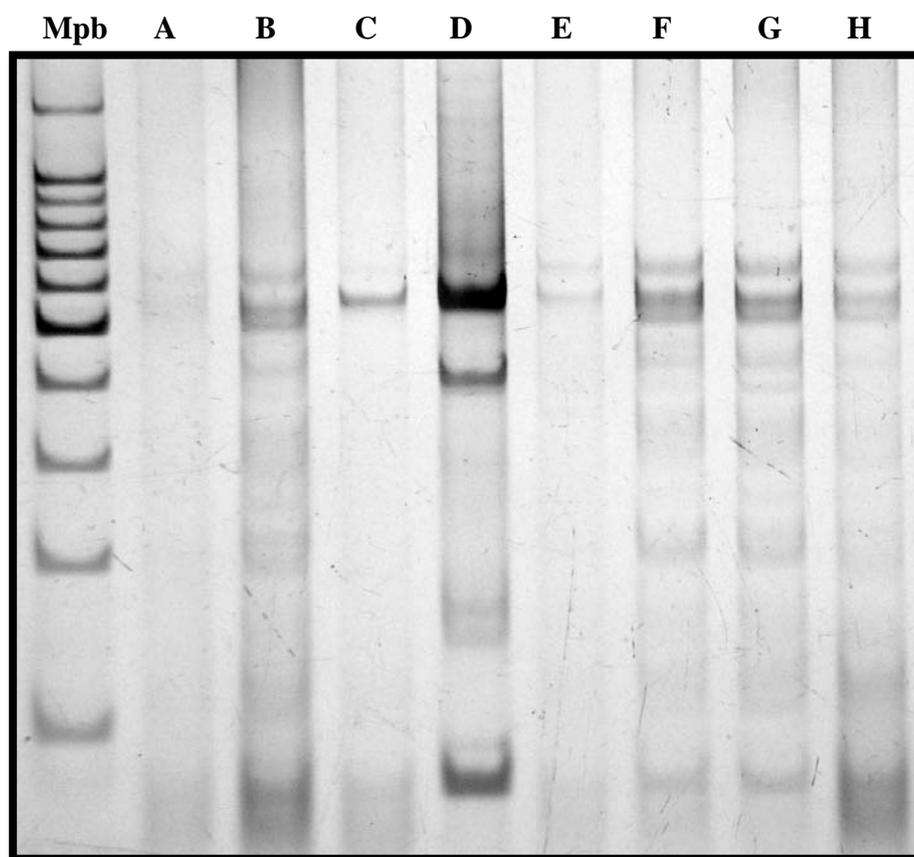


FIGURA 24. Perfiles de restricción obtenidos con enzima *AluI*, para bandas cortadas desde los geles de TGGE. A-H: Bandas obtenidas correspondientes a diferentes OTUs. Imagen: Electroforesis en gel PAGE/NITRATO.

Las secuencias parciales obtenidas de entre 400 y 600 pb, fueron comparadas con secuencias disponibles en RDP para realizar la asignación de especie, un resumen de los resultados de ello se muestran en la tabla VIII y figura 25. Los resultados indican que principalmente los OTUs, más representados pertenecen a los phylum Proteobacteria y Firmicutes. Específicamente estos OTUs están relacionados con las bacterias Gram negativas del género *Burkholderia* y *Borrelia* y las Gram positivas, *Bacillus* y *Propionibacterium*. Se encontraron también bandas únicas (OTUs) pertenecientes a los géneros: *Ruegeria*, *Paracoccus*, *Methylobacterium* y *Vibrio*.

TABLA VIII. Identificación de las secuencias de la obtenidas a partir de las bandas cortadas del TGGE-PCR *16SARNr* bacteriano utilizando la base de datos de RDP. (<http://rdp.cme.msu.edu/>)

<i>Crassostrea corteziensis</i>							
Numero Acceso*	OTU	Asignación Clase	Identidad (%)	Asignación Especie	Etapas de crecimiento	N°/total muestras	Sitio
JF522209	B2	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Semilla	8/8	L
JF522195	A1						
JF522210	B1	Spirochaetes	85	<i>Borrelia</i> sp.	Juvenil	4/7	BM
JF522206	JC13E						
JF522205	JC13F						
JF522208	JC6A	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Juvenil	7/7	BM
JF522207	JC13A						
JF522232	AC9B	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adulto	6/6	BM
JF522231	AC9F						
JF522203	JC24C	Actinobacteria	99	<i>Propionibacterium</i> sp.	Juvenil	2/7	BT
JF522204	JC24A						
JF522202	JC31A	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Juvenil	7/7	BT
JF522201	JC33A						
JF522200	JC33B						
JF522229	AC28B						
JF522230	AC28C	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adulto	7/7	BT
JF522228	AC29A						
<i>Crassostrea gigas</i>							
Numero Acceso*	OTU	Asignación Clase	Identidad (%)	Asignación Especie	Etapas de crecimiento	N°/total muestras	Sitio
JF522197	SG2D	Bacilli	89	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	Semilla	3/8	L
JF522213	SG22B	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Semilla	8/8	L
JF522196	SG30G	α-Proteobacteria	98	<i>Ruegeria</i> sp.	Semilla	1/8	L
JF522199	JG5C	Bacilli	96	<i>Bacillus</i> sp.	Juvenil	4/7	BM
JF522198	JG6F	α-Proteobacteria	98	<i>Paracoccus</i> sp.	Juvenil	1/7	BM
JF522227	JG9A	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Juvenil	7/7	BM
JF522226	AG9B						
JF522223	AG9F						
JF522220	AG10B	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adulto	6/6	BM
JF522218	AG12A						
JF522217	AG12P						
JF522216	AG14P						
JF522225	AG9D	α-Proteobacteria	100	<i>Methylobacterium</i> sp.	Adulto	1/6	BM
JF522222	AG9I	Bacilli	100	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	Adulto	2/6	BM
JF522219	AG11I						
JF522215	JG22A	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Juvenil	6/6	BT
JF522214	AG22C	β-Proteobacteria	100	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adulto	6/6	BT
JF522211	AG30B						
JF522212	AG26H	γ-Proteobacteria	100	<i>Vibrio</i> sp.	Adulto	1/6	BT

*-: Clave de acceso a la secuencia depositada en la base de datos del GenBank, N: cantidad de ostiones que presentaron dicha secuencia. Total de muestras: las que fueron secuenciadas. OTU: sigla en inglés de Unidad taxonómica Operacional. L: Laboratorio Bahía de La Paz; BM: Sitio de Cultivo Bahía Magdalena; BT: Sitio de Cultivo Bahía de Topolobampo.

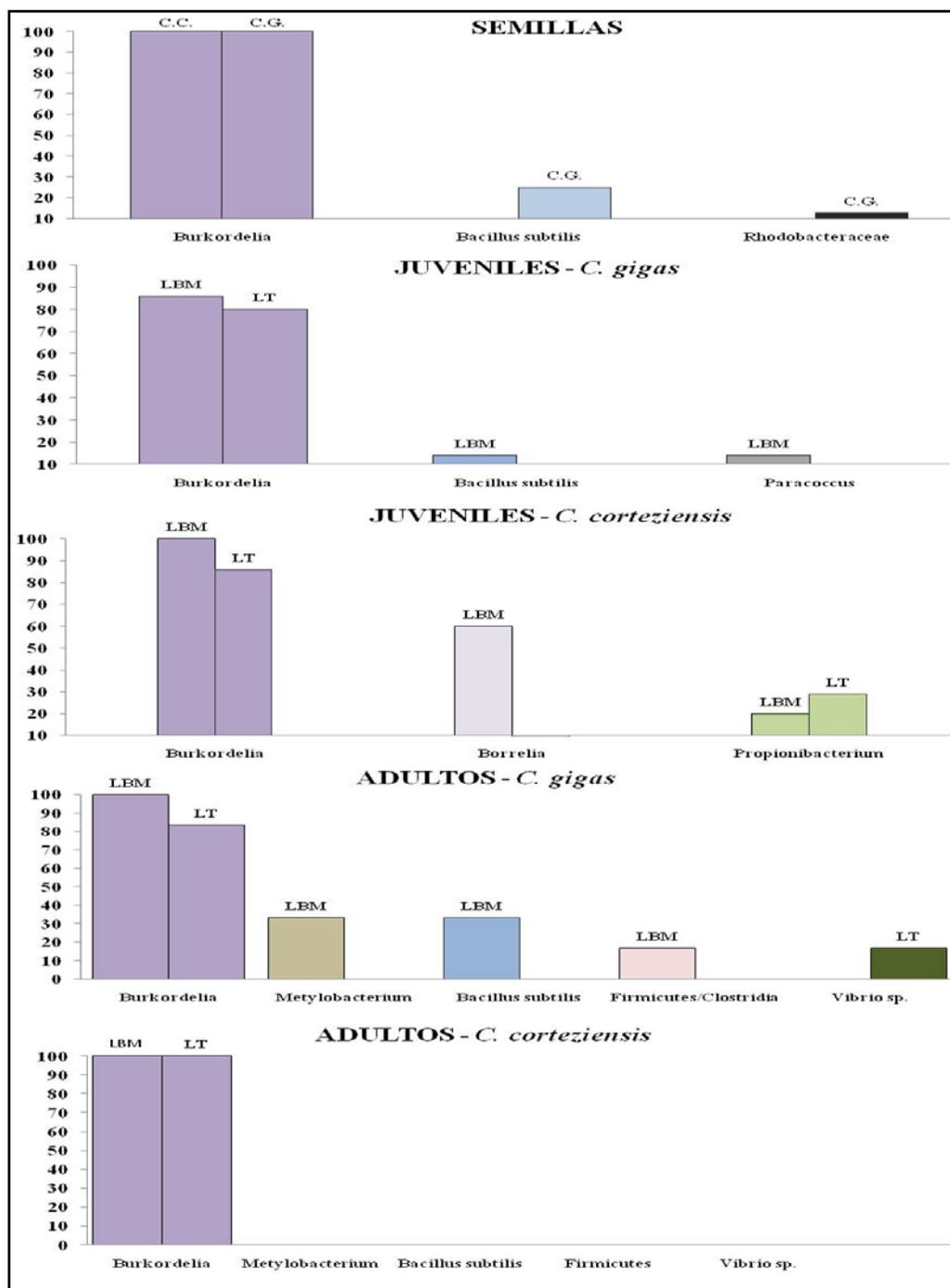


FIGURA 25. Composición bacteriana (%) de la microbiota asociada a ostreidos obtenida a partir de las bandas del TGGE y secuenciación de la región V3-V6 16S *ARNr*. CC: *Crassostrea corteziensis*; CG: *Crassostrea gigas*. BM: Sitio de Cultivo Bahía Magdalena, BT: Sitio de cultivo Bahía de Topolobampo

La especie bacteriana más abundante, encontrada en ambas especies de Ostión, durante todas las etapas de crecimiento y en los dos sitios de engorda fue, *Burkholderia cepacia*. Una bacteria particular, probablemente *Bacillus subtilis* u otra especie del género *Bacillus*, compone la microbiota asociada a *C. gigas* durante su crecimiento en Bahía Magdalena. En la mayoría de los casos se encontró mayor variedad de componentes bacterianos en la microbiota asociada a *C. gigas* que a *C. corteziensis*, principalmente en la etapa adulta (tabla VIII, Fig. 25).

Estimación de la composición y diversidad de la comunidad bacteriana y arquea asociada a *Crassostrea gigas*, *C. sikamea* y *C. corteziensis* mediante pirosecuenciación del gen *16S ARNr*

Preparación de la librería de amplicones de Bacteria y Arquea

Para cada MID (muestra etiquetada), se eligieron 10 individuos (ADN de ostiones) que presentaron una buena amplificación para los genes *16S ARNr* de Bacteria y Arquea. En la figura 26, se puede observar un ejemplo de la amplificación de 10 individuos de la muestra etiquetada como MID8: *C. gigas*, adultos, Depurados, provenientes de Bahía Topolobampo. En dicha figura, se observan los resultados de la amplificación, del ADN de 10 individuos, para la SSU de Arqueas (carriles 1-10) y los mismos 10 individuos para amplificar la SSU de Bacterias (carriles 11-20), el gen 28S de ostreidos fue utilizado como control interno de la amplificación por PCR. Posteriormente, se realizó para cada MID (compuesta por 10 individuos) la amplificación correspondiente con los *primers* de fusión específicos para pirosecuenciación, generando así un pool de amplicones para cada MID. Un ejemplo de la amplificación por PCR usando dichos *primers*, se puede observar en la figura 27. Cada MID de bacterias (12 en total), se formó mezclando 100 µl de cada amplicón individual hasta llegar a una concentración de entre 300 y 500 ng/µl y purezas ≥ 2 DO. En el caso de Arqueas, se realizó el mismo procedimiento, pero debido a que los amplicones de este grupo fueron menos (ver Fig.27), se alcanzó una concentración final para cada MID de entre 70 y 150 ng/µl y purezas ≥ 2 DO. Finalmente, se procedió a generar el pool de amplicones A (Arqueas) y el pool B (Bacterias) mezclando 100 µl de cada MID. En la figura 28, se puede observar el gel resultante para cada librería genética

purificada y con su correspondiente concentración. Las lecturas de concentración y pureza midiendo DO., fueron de 50 ng/ μ l, pureza ≥ 2.2 para el pool A y de 79 ng/ μ l, pureza ≥ 2.3 para el pool B.

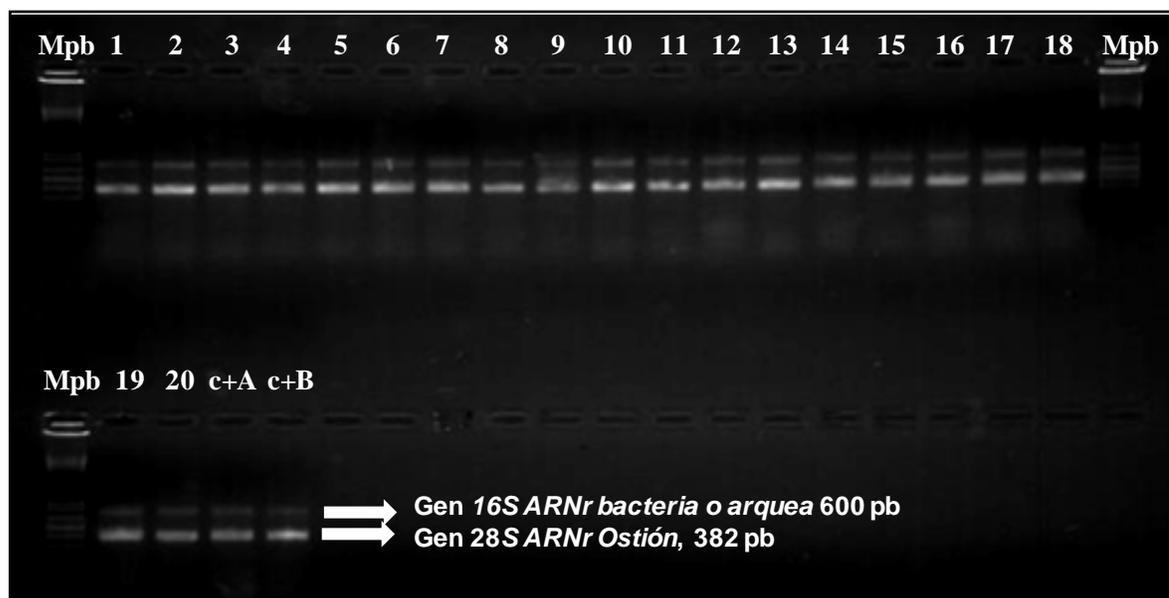


FIGURA 26. Amplificación por PCR de los genes *16S ARNr* de Bacteria y Arquea para muestras de ADN de adultos de *Crassostrea gigas* engordados en Bahía Topolobampo (MID 8). Mpb: Marcador de peso molecular 100 pb (BenchTop 100 pb DNA ladder, PROMEGA); carriles 1-10: ADN amplificado con primer 344F-915R Arqueas, carriles 11-20: ADN amplificado con primer 341F-939R Bacterias, c+A: control positivo Arquea, c+B: control positivo Bacteria. Imagen: Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, tinción con Bromuro de Etidio.

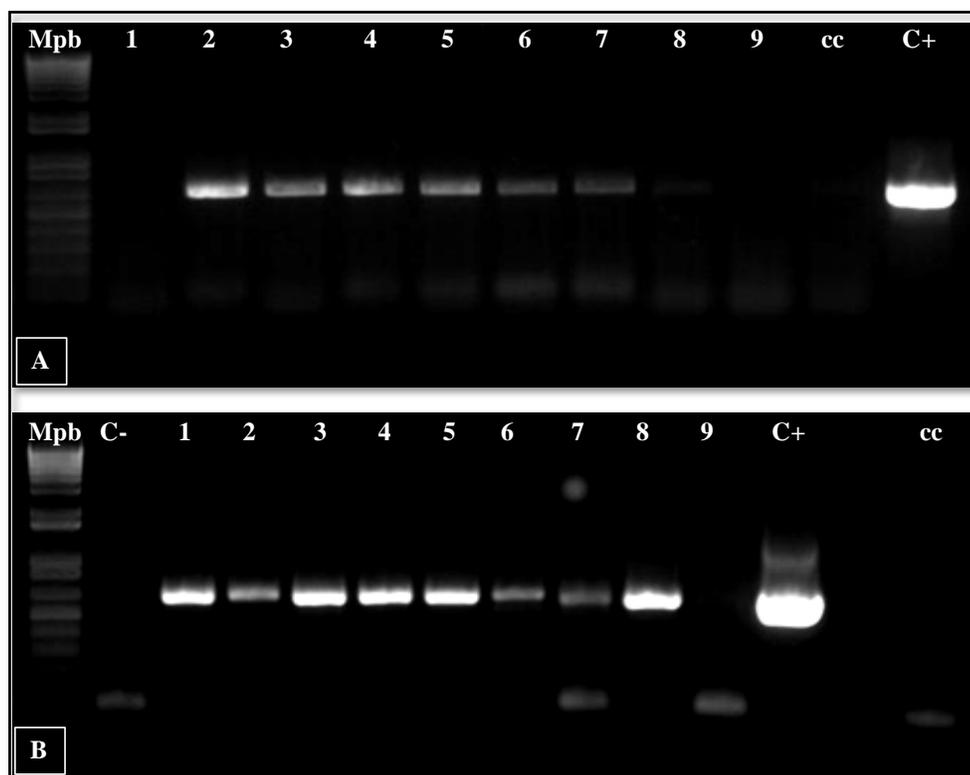


FIGURA 27. Amplificación por PCR utilizando los *primers* de fusión para pirosecuenciación de los genes *16S ARNr* para muestras de ADN de adultos de *Crassostrea corteziensis*, depurados y engordados en Bahía Magdalena (MID 2). **A) ADN amplificado para *primer* de fusión Arqueas.** Mpb: Marcador de peso molecular 1Kb (DNA 1Kb ladder, Invitrogen). Carriles 1-9: individuos MID2; cc: control de contaminación; c+: control Positivo ADN *Escherichia coli* ATCC 25922. **B) ADN amplificado con los *primers* de fusión Bacteria.** Carriles: c-: control negativo ADN *Escherichia coli* ATCC 25922, 1-9: ADN de individuos MID2; c+: *Halobacterium salinarum* ATCC 29341; cc: control de contaminación. Imagen: Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, tinción con Bromuro de Etidio.

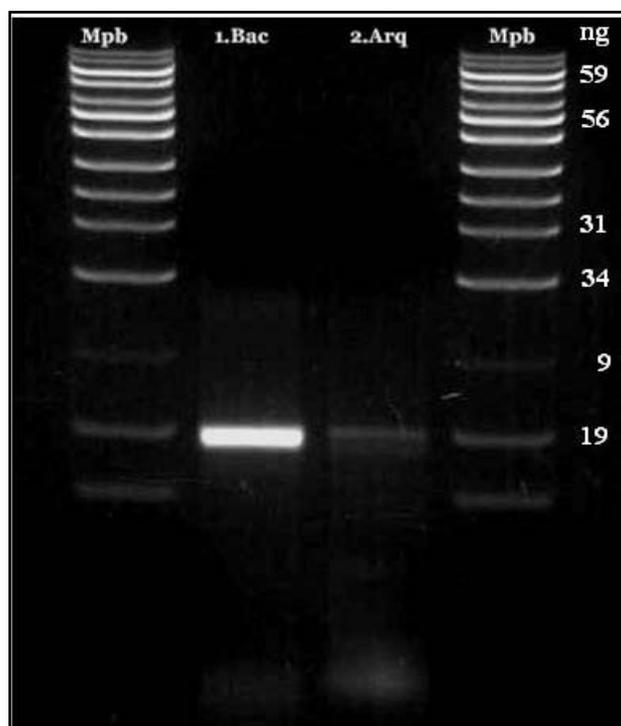


FIGURA 28. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la librería de amplicones para el gen *16S ARNr* de Arquea y Bacteria. Carriles MM. Marcador de masa Fisher BioReagents exACTgeneDNA Ladders, 1 Bac: Producto purificado de pool B, 2 Arq: Producto purificado de pool A. Se cargó 10 μ l en cada carril, gel de agarosa 0.6%, 100V, 30 min.

Eficiencia y calidad de la pirosecuenciación de la librería de amplicones bacteriano

En la figura 29A, se puede observar la cuantificación de ADN mediante fluorescencia y en la figura B, se ven los resultados de la eliminación o remoción de los fragmentos con tamaños menores al amplicón objetivo en este estudio (500-650 pb). La cuantificación inicial del ADN correspondiente al pool de Bacterias fue de 22 ng/ μ l equivalente 4.08×10^{11} moléculas/ μ l, mientras que, una vez removidos los amplicones o productos de PCR no deseados, la cuantificación final fue de 0.78 ng/ μ l lo que equivale a 1.31×10^9 moléculas/ μ l. Para esta librería de amplicones se realizaron 3 corridas de pirosecuenciación. El resultado de la tercera corrida, la más eficiente, se muestra en la figura 30, donde se puede observar que el número de lecturas fue de 33.874, con un promedio de longitud de 525.8 bases y una moda de 540 bases.

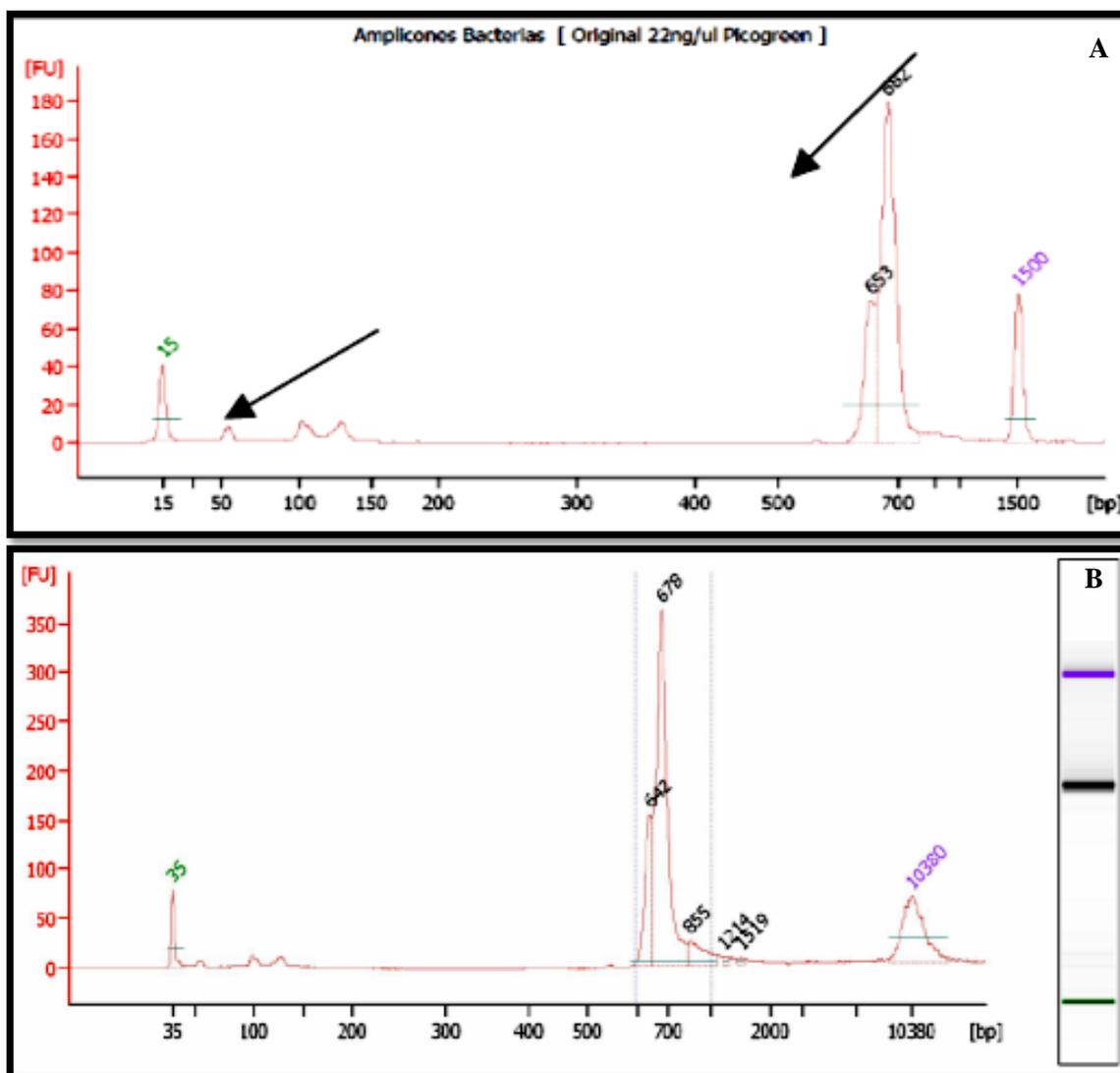


FIGURA 29. Cuantificación por fluorescencia y remoción de fragmentos cortos de ADN del pool de amplicones del gen *16S ARNr* de Bacterias presentes en *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. A. Cuantificación inicial de ADN. B. Cuantificación de ADN luego de la remoción de fragmentos pequeños.

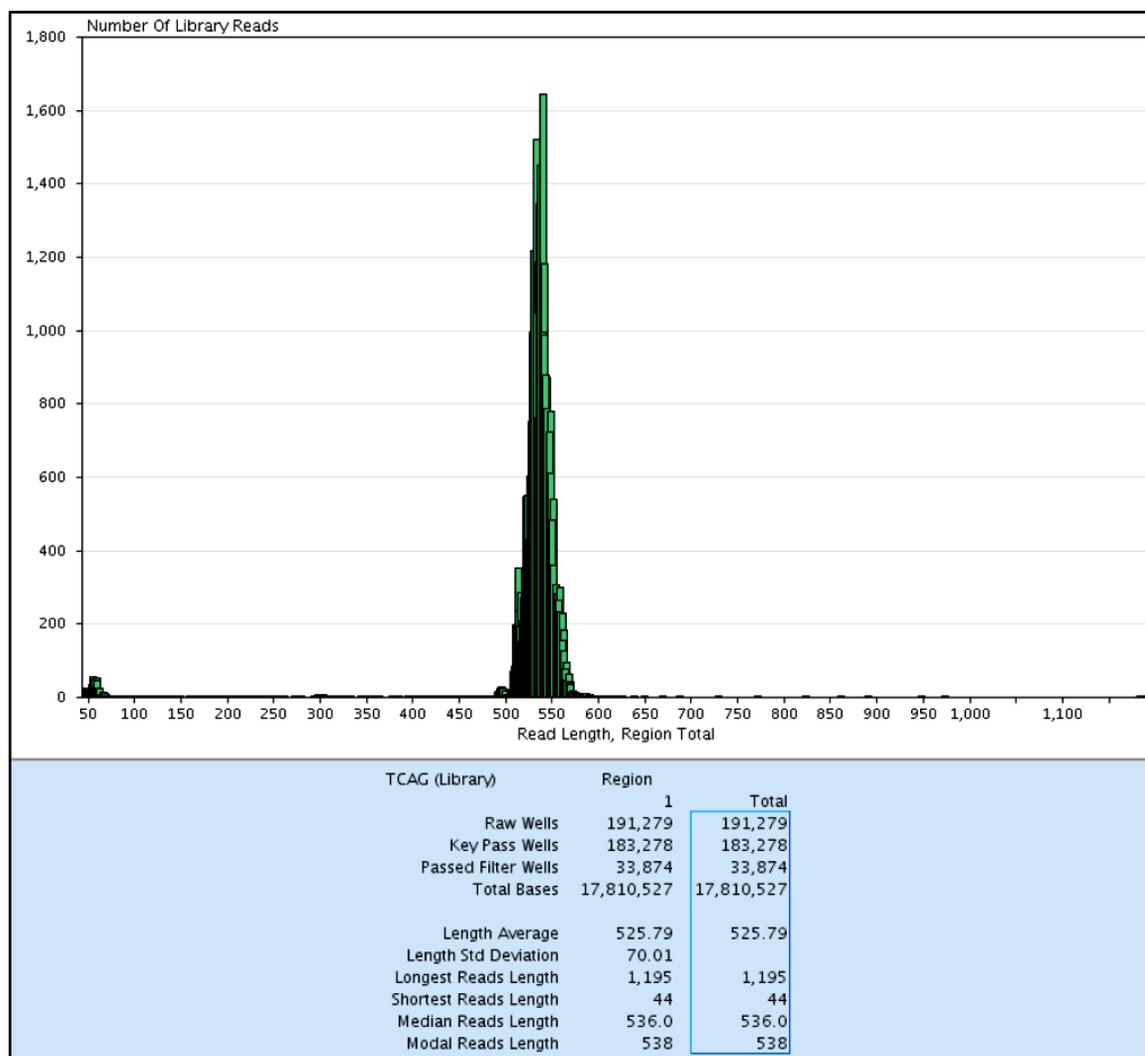


FIGURA 30. Resultado de la corrida de pirosecuenciación para la librería de amplicones del gen *16S ARNr* Bacteriano de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.

El resultado final, considerando las 3 corridas realizadas fue de 57.375 lecturas, con un total de bases generadas de 26.498.850 bases.

En la Tabla IX, se resumen los datos del total de lecturas para cada MID y el total de lecturas válidas. Las lecturas válidas fueron aquellas que presentaron secuencias con alta complejidad, alta calidad, ausencia de secuencias ricas en Ns (bases indeterminadas o ambiguas), ausencia de quimeras, las que coincidan con los *primers* usados en la PCR y

secuencias de tamaños ≥ 524.37 bases. La eficiencia de la pirosecuenciación para la librería bacteriana fue del 70%.

TABLA IX. Rendimiento de la pirosecuenciación de la librería de amplicones 16S ARNr bacteriano obtenida de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*.

MID	Especie Ostreido	Característica de la Muestra	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Lecturas Totales	Lecturas Válidas*
1	<i>C. corteziensis</i>	Semilla	909	2584	6833	10326	9984
2	<i>C. corteziensis</i>	Adulto/Bahía Magdalena Depurada	1351	1283	970	3604	1161
3	<i>C. corteziensis</i>	Adulto/Bahía Magdalena NO Depurada	814	1610	4211	6635	6036
4	<i>C. corteziensis</i>	Adulto/Bahía Topolobampo Depurada	272	425	846	1543	1133
5	<i>C.gigas</i>	Semilla	691	1174	2680	4545	3902
6	<i>C.gigas</i>	Adulto/Bahía Magdalena Depurada	479	965	2368	3812	3120
7	<i>C.gigas</i>	Adulto/Bahía Magdalena NO Depurada	288	503	1230	2021	1798
8	<i>C.gigas</i>	Adulto/Bahía Topolobampo Depurada	324	434	919	1677	1235
9	<i>C. sikamea</i>	Semilla	1112	2248	5671	9031	8378
10	<i>C. sikamea</i>	Adulto/Bahía Magdalena Depurada	134	381	919	1434	1248
11	<i>C. sikamea</i>	Adulto/Bahía Magdalena NO Depurada	498	542	589	1629	758
12	<i>C. sikamea</i>	Adulto/Bahía Topolobampo Depurada	415	487	928	1830	1260
Total			7287	12636	28164	48087	40013

*: Secuencias con alta complejidad, alta calidad, ausencia de secuencias ricas en Ns (bases indeterminadas o ambiguas), ausencia de quimeras, las que coincidan con los *primers* usados en la PCR y secuencias de tamaños ≥ 524.37 bases.

En la figura 31, se muestra el porcentaje de lecturas a las cuales, para cada MID, se pudo identificar como Phylum, toda aquella lectura que presentó ≥ 80 % de similitud de secuencia con algún phylum disponible en la bases de datos de RDP y SILVA, como Clase $\geq 85\%$, Orden $\geq 90\%$, Familia ≥ 95 % y Género $\geq 97\%$. Como se puede observar, a medida que vamos adentrando y aumentando el criterio de clasificación menor es el rango de posible asignación de nombre a la lectura obtenida por pirosecuenciación.

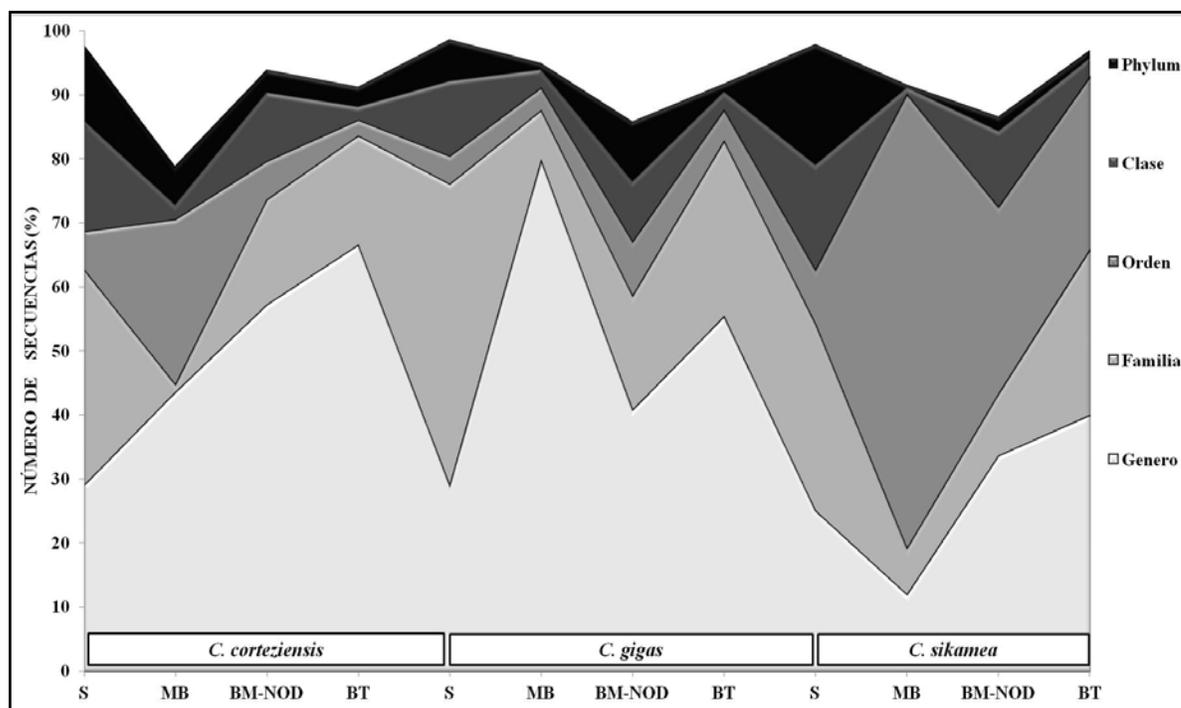


FIGURA 31. Eficiencia en la asignación taxonómica de las lecturas obtenidas por pirosecuenciación de la librería *16S ARNr* de Bacteria asociadas a la microbiota de Ostreidos.

Estimación del esfuerzo de muestreo para los resultados de pirosecuenciación de la librería genética *16S ARNr* de bacterias

Antes de ejecutar los análisis de resultados de la pirosecuenciación, para determinar composición y diversidad de la microbiota bacteriana asociada a Ostreidos, se realizaron curvas de rarefacción para determinar si la muestra analizada es representativa para hacer posteriores análisis. Las curvas de rarefacción permiten determinar si se pueden hacer comparaciones del número de géneros entre comunidades cuando el tamaño de la muestra no es igual. Dichas curvas para cada una de las especies de Ostreidos estudiadas se muestran en las figuras 33 a 34. Como se puede observar en los 3 gráficos, en todos los casos se alcanza la asíntota antes de que se llegue al número total de secuencias analizadas, esto indica que el esfuerzo de muestreo para cada una de las especies de ostreidos y para cada muestra (MID) estudiada, fue el adecuado. En estos gráficos se puede observar

también que la mayor riqueza específica se presentó en las semillas, seguida de los adultos sin depurar en todas las especies de ostiones estudiadas.

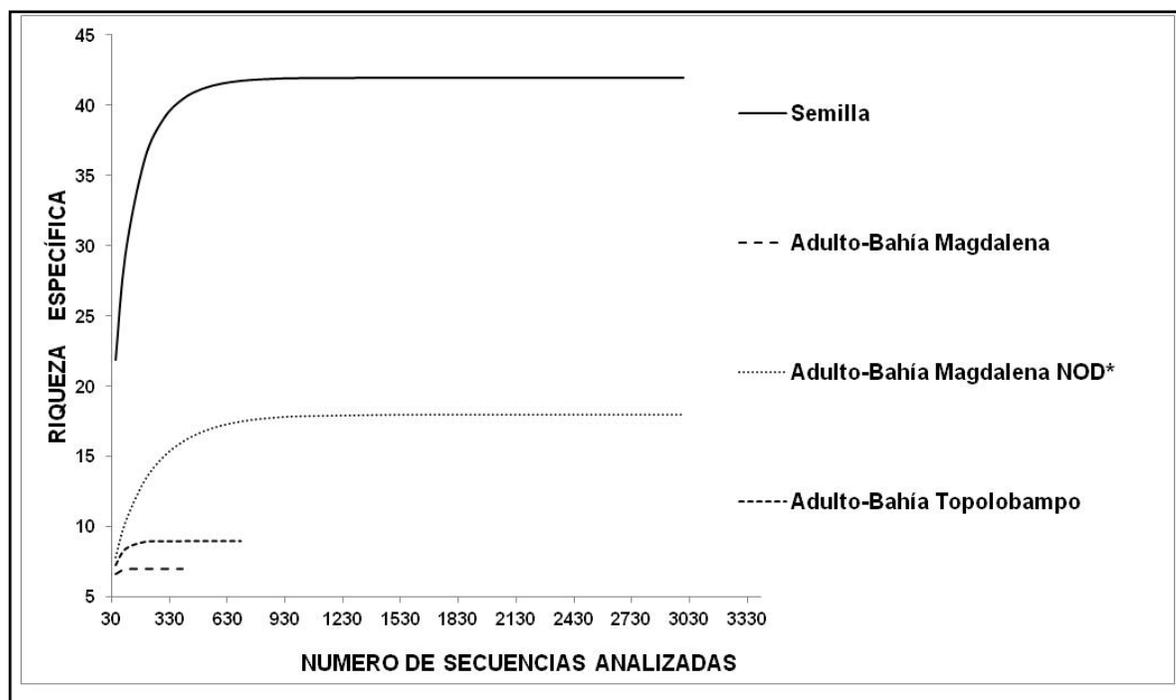


FIGURA 32. Curva de rarefacción de los resultados de la pirosecuenciación de la librería *16S ARNr* bacteria para *Crassostrea corteziensis*. *NOD: No depuradas.

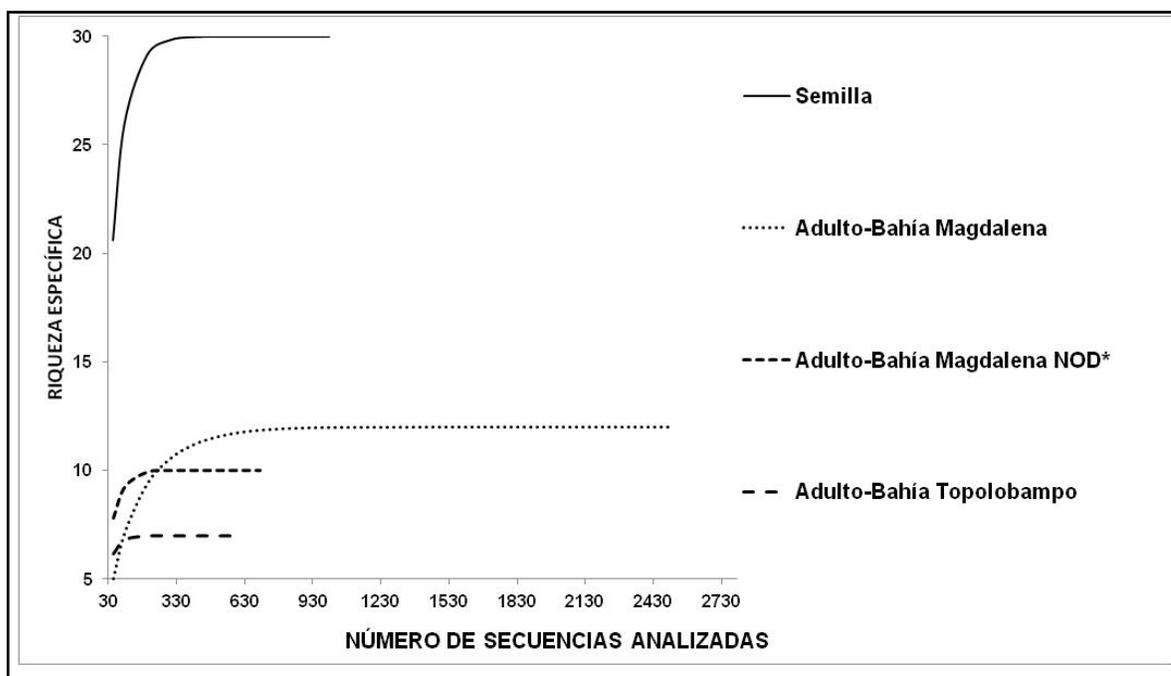


FIGURA 33. Curva de rarefacción de los resultados de la pirosecuenciación de la librería *16S ARNr* bacteria para *Crassostrea gigas*. *NOD: No depuradas.

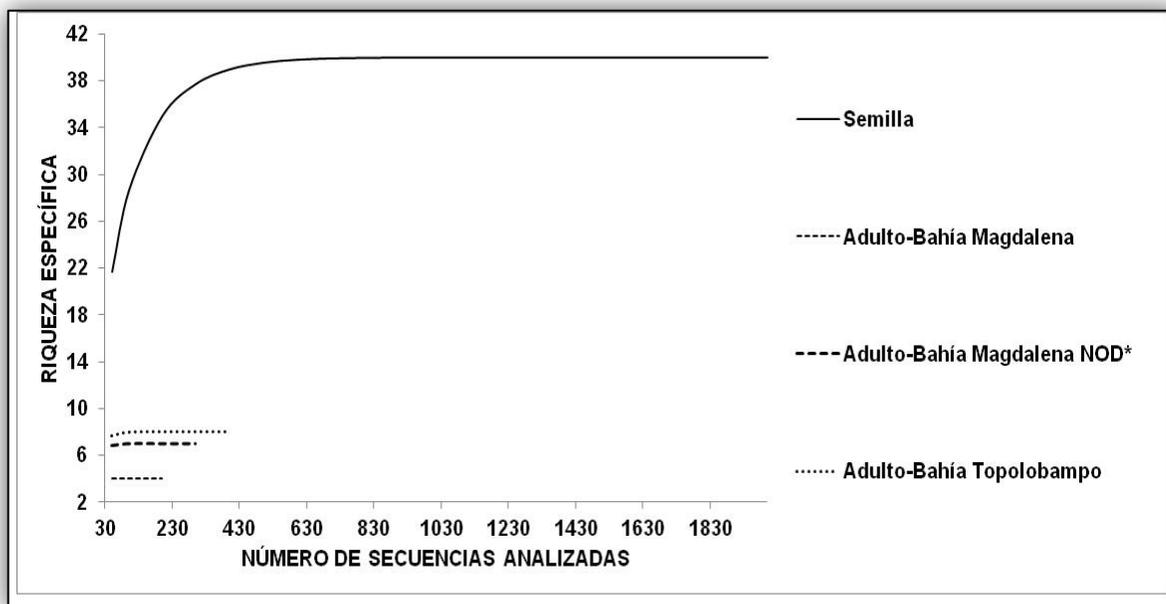


FIGURA 34. Curva de rarefacción de los resultados de la pirosecuenciación de la librería *16S ARNr* bacteria para *Crassostrea sikamea*. *NOD: No depuradas.

Otra herramienta potencialmente útil en el análisis de riqueza específica de muestras de diferente tamaño son las funciones de acumulación de géneros en base a las unidades de muestreo (esfuerzo). En la figura 35, se puede observar el resultado de la curva utilizando el estimador no paramétrico, Chao1, donde la predicción del número de géneros en función del número acumulativo de muestras es bastante similar entre el estimador y lo observado, sin embargo no se alcanza la asíntota.

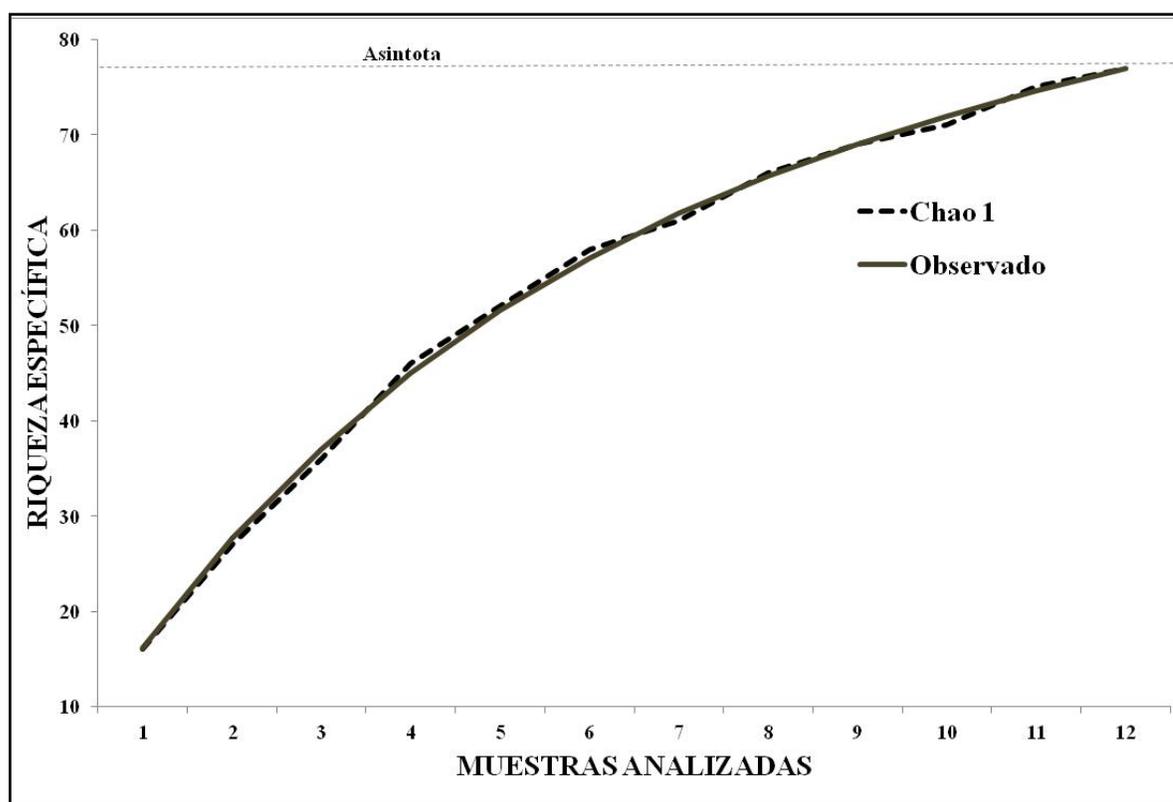


FIGURA 35. Curva de Acumulación de Géneros identificados mediante pirosecuenciación de librería *16S ARNr* Bacterias de Ostreidos.

Composición y diversidad de la comunidad bacteriana asociada a *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*.

La abundancia total de phylum bacterianos encontrados para cada MID se muestra en la tabla X. El phylum más representativo y que se encontró en las tres especies de ostreidos y en todas las condiciones estudiadas (sitio de cultivo, crecimiento, depuradas vs no depuradas) fue el de Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria.

La presencia de Cianobacterias fue importante en el caso de los ostiones que no fueron depurados. El phylum Chlamydiae, fue abundante principalmente en la especie *C. sikamea*.

TABLA X. Abundancia Total de Phylum Bacterianos identificados mediante pirosecuenciación de la librería de amplicones 16S ARNr de Ostreidos.

PHYLUM*	<i>Crassostrea corteziensis</i>				<i>Crassostrea gigas</i>				<i>Crassostrea sikamea</i>			
	ADULTOS				ADULTOS				ADULTOS			
	SEMILLA	BM	BM-NOD	BT	SEMILLA	BM	BM-NOD	BT	SEMILLA	BM	BM-NOD	BT
Fusobacteria	27	0	2	13	5	11	3	0	168	1	2	92
Actinobacteria	38	61	244	46	24	16	51	44	3	16	24	43
Spirochaetes	7	1	3	0	0	0	0	0	11	0	0	0
Bacteroidetes	3149	56	101	34	994	54	21	63	3037	16	16	96
Proteobacteria	6440	716	2049	872	2785	2734	621	969	4711	206	217	613
Cyanobacteria/Chloroplast	4	12	3168	11	1	39	699	44	4	4	188	1
Acidobacteria	5	0	15	1	0	0	4	1	0	2	2	0
Firmicutes	94	21	57	20	34	10	102	8	114	15	14	21
Tenericutes	0	0	3	1	0	52	1	1	0	0	3	25
Chloroflexi	1	1	11	1	0	2	2	1	0	0	0	0
Chlamydiae	0	0	3	2	0	42	35	1	142	882	189	305
TOTAL	9768	871	5664	1002	3843	2960	1542	1132	8195	1142	656	1197

*: Se asignó un Phylum a toda aquella lectura que presentó $\geq 80\%$ de similitud de secuencia con un phylum de la base de datos RDP y SILVA. BM: sitio de cultivo en Bahía Magdalena, ostiones depurados; BM-NOD: sitio de cultivo en Bahía Magdalena ostiones no depurados; BT: sitio de cultivo en Bahía Topolobampo, ostiones depurados.

En la figura 36, se pueden observar los resultados de la abundancia relativa de phylum bacterianos en semillas. Las tres especies estudiadas presentan una gran similitud entre los Phylum representados, donde el predominante fue Proteobacterias, con una abundancia relativa de 66, 72 y 58% para *C. corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* respectivamente. El segundo Phylum importante encontrado en esta etapa de desarrollo fueron los

Bacteroidetes, con abundancias relativas que van desde un 26% en *C. gigas* a un 37% en *C. sikamea*. Con porcentajes cercanos al 1% se observó la presencia de Firmicutes y exclusivamente en *C. sikamea* se encontró la presencia de Chlamydiae (Fig. 36).

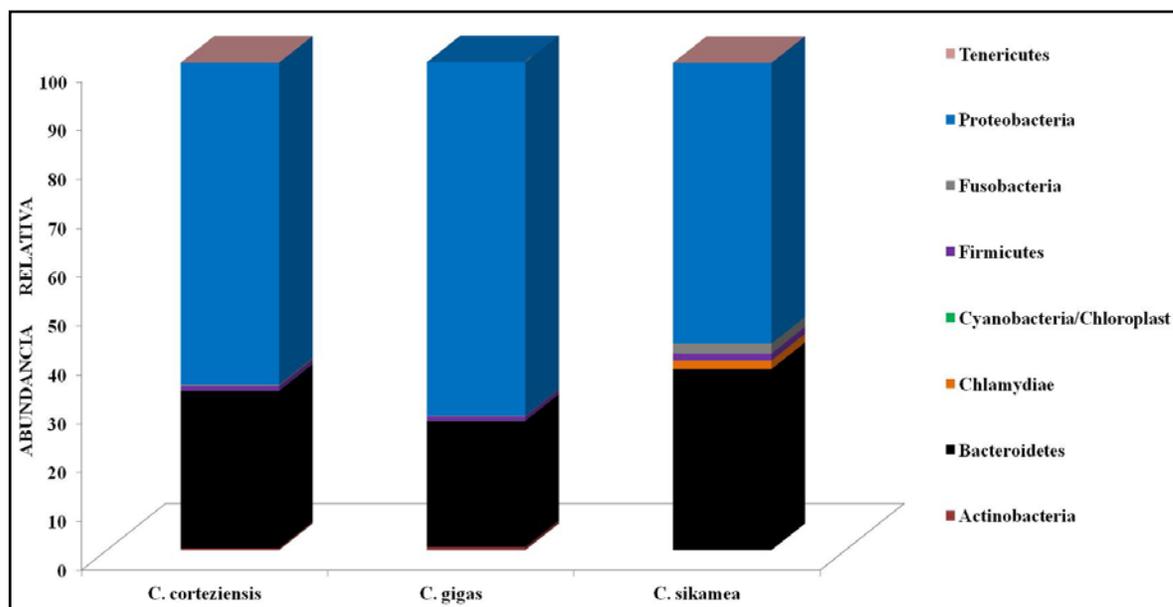


FIGURA 36. Abundancia Relativa de Phylum bacterianos encontrados en Semillas de Ostreidos. Resultados obtenidos mediante pirosecuenciación de la librería de genes *16S ARNr* de bacterias. El Phylum fue asignado a toda aquella lectura que presentase $\geq 80\%$ de similitud de secuencia con un Phylum de la base de datos RDP y SILVA. Los colores indican el phylum, comenzando con Actinobacteria abajo, Tenericutes, arriba.

La abundancia relativa encontrada en los adultos de las tres especies de Ostreidos en ambos sitios de cultivo se representa en la figura 37. Nuevamente, las proteobacterias fueron las predominantes, presentando abundancias que van desde un 82 a un 92% en *C. gigas* y *C. corteziensis*, sin embargo este patrón no se observó para *C. sikamea* en el sitio de cultivo ubicado en Bahía Magdalena donde Chlamydiae alcanzó una abundancia del 77% (Fig. 37). Se puede observar también que no existen los mismos patrones de presencia de phylum

-cuando comparamos las diferentes especies de Ostreidos engordados en un mismo sitio. Parecería existir una similitud entre la microbiota asociada a una misma especie de ostión, aunque éste sea cultivado en un sitio de cultivo diferente (Fig. 37).

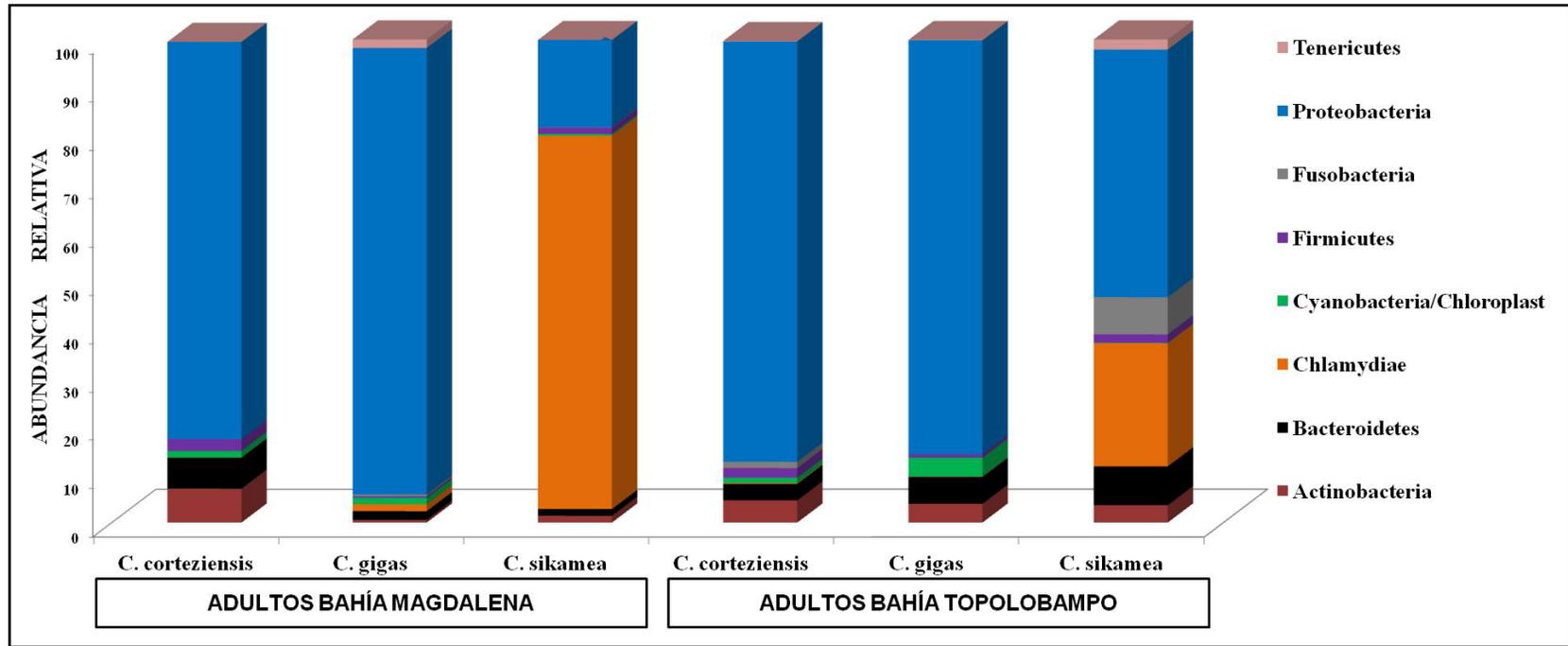


FIGURA 37. Abundancia Relativa de Phylum bacterianos encontrados en ostiones Adultos en diferentes sitios de engorda. Resultados obtenidos de la pirosecuenciación de la librería de genes *16S ARNr*. El Phylum fue asignado a toda aquella lectura que presentó $\geq 80\%$ de similitud de secuencia con un Phylum de la base de datos RDP y SILVA.

Con el fin de comparar la microbiota transitoria y la residente o autóctona asociadas a las tres especies de ostreidos, se grafica en la figura 38, las abundancias relativas de adultos engordados en Bahía Magdalena de muestras depuradas y sin depurar. En dicho

gráfico, se puede observar que la diferencia principal entre la microbiota asociada de las muestras depuradas y no depuradas es la presencia en estas últimas de Cianobacterias (Fig. 38).

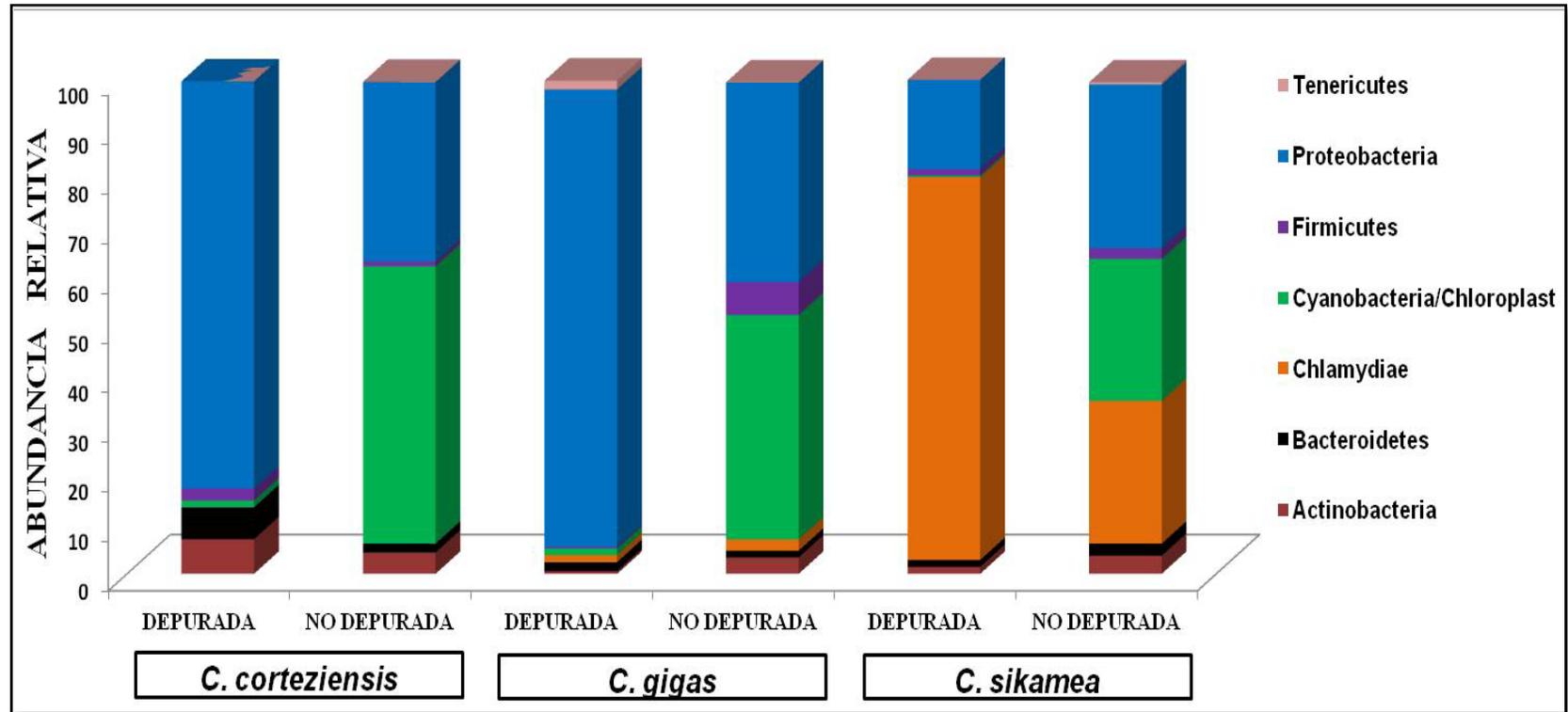


FIGURA 38. Abundancia Relativa de Phylum bacterianos encontrados en ostiones Adultos depurados y no depurados cultivados en Bahía Magdalena. Resultados obtenidos de la pirosecuenciación de la librería de genes *16S ARNr*. El Phylum fue asignado a toda aquella lectura que presentó $\geq 80\%$ de similitud de secuencia con un Phylum de la base de datos RDP y SILVA.

Como las Proteobacterias fueron las más abundantes, se grafica en la figura 39, la abundancia relativa de las Clases encontradas en semillas y adultos depurados. Las semillas de las tres especies de ostión presentaron como clase más abundante Alpha-proteobacteria seguido de Gamma-proteobacteria. En el caso de los adultos engordados en Bahía Magdalena, la proporción de Clases encontradas varió mucho entre especies de ostreidos (Fig. 39). Mientras que, en Bahía Topolobampo, las Clases predominantes fueron Gamma-proteobacteria seguido de Alpha-proteobacteria, aunque en *C. corteziensis* ese lugar lo ocupa la Clase Beta-proteobacteria.

En la figura 40, se puede observar que la proporción de clases de Proteobacterias presentes en muestras no depuradas de los organismos engordados en Bahía Magdalena, es muy similar en abundancias y tipo de Clase, esto no se observa en las muestras depuradas de la misma localidad de engorde.

En este estudio, una lectura se clasificó como un determinado género, si solo si, la secuencia presentó un porcentaje igual o mayor a 97 de similitud de secuencia con un género disponible en la base de datos de RDP y SILVA. Cuando se procedió a realizar el análisis de abundancia de géneros asociados a la microbiota de Ostreidos, se encontraron 254 géneros representados (microdiversidad). Sin embargo, mucho de ellos se detectaron en una o dos secuencias de las obtenidas, por lo que se decidió utilizar como criterio para un resultado válido, solo aquellas que tuvieron una frecuencia de ocurrencia ≥ 10 secuencias. Este criterio se estableció, considerando que en cada muestra o MID se utilizaron 10 individuos para generar la librería de amplicones. Esto dio como resultado final, que la microbiota asociada a los Ostreidos de este estudio estuviera representada por un total de 77 géneros.

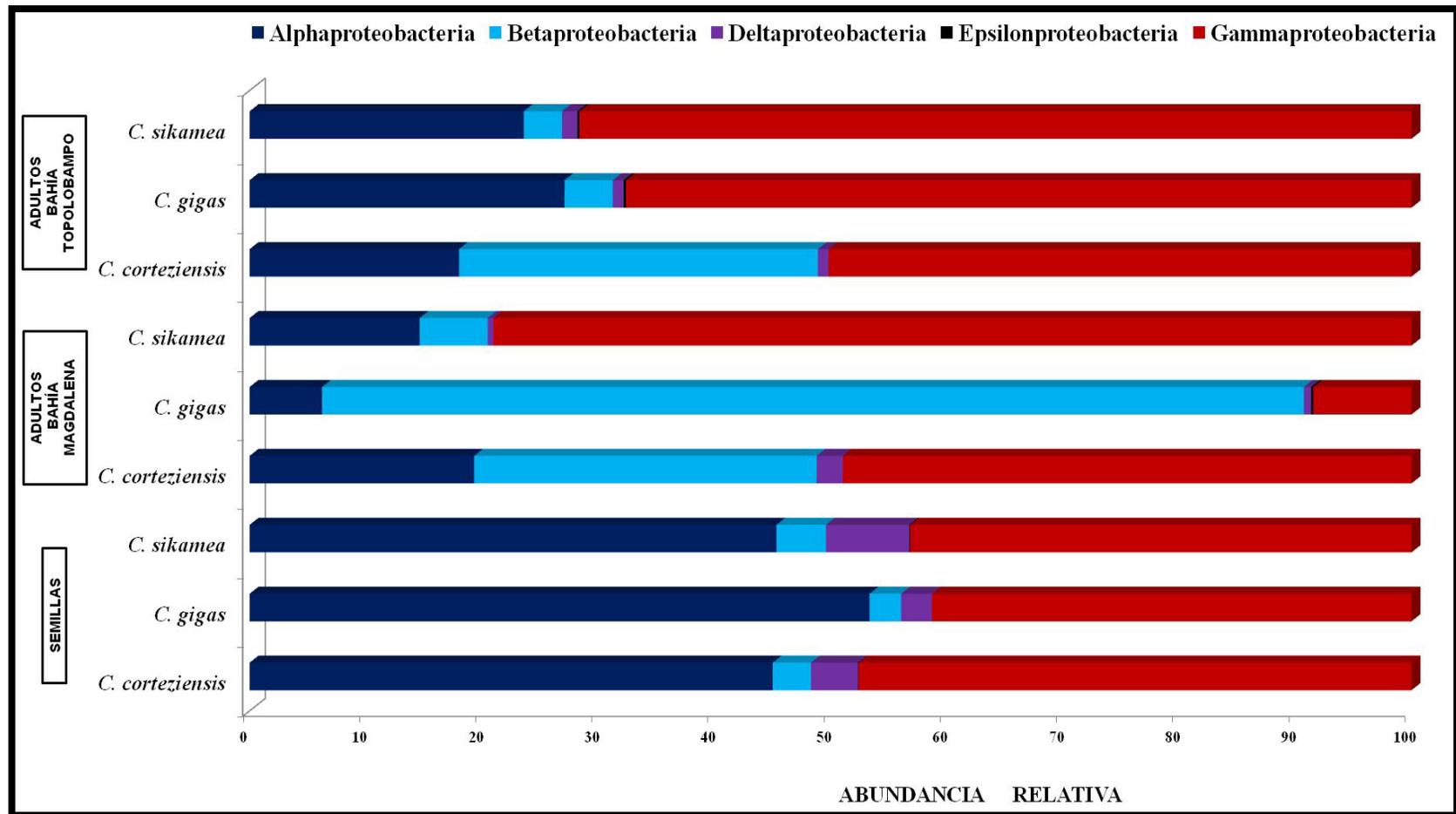


FIGURA 39. Abundancia Relativa de las Clases de Proteobacterias, identificadas mediante pirosecuenciación de la librería de genes *16S ARNr*, para las tres especies de Ostreidos depurados. Se asignó una Clase a toda aquella lectura que presentó \geq 85% de similitud de secuencia con una Clase en la base de datos RDP y SILVA.

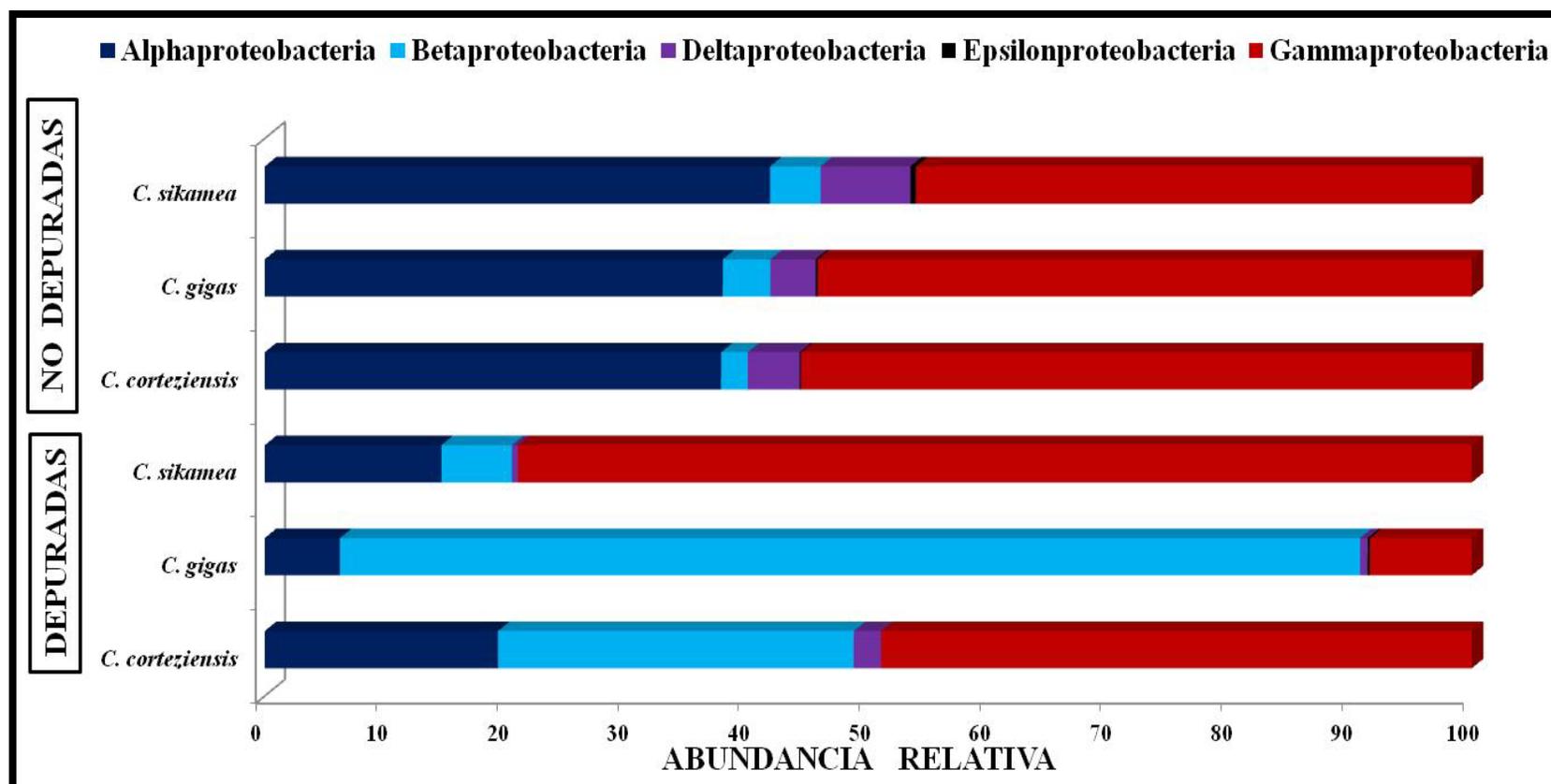


FIGURA 40. Abundancia Relativa de las Clases de Proteobacterias, identificadas mediante pirosecuenciación de la librería de genes *16S ARNr*, para las tres especies de Ostreidos depurados vs No depurados engordados en Bahía Magdalena. Se asignó como Clase a toda aquella lectura que presentó ≥ 8 5% de similitud de secuencia con una Clase en la base de datos RDP y SILVA.

En las tabla XI y XII, se muestran los resultados de las abundancias totales de los géneros presentes en la microbiota residente asociada a las tres especies de ostreidos en etapa de semilla y adultos engordados en Bahía Magdalena y Bahía Topolobampo y que fueron previamente depurados. Se puede observar que en todos los casos, la abundancia relativa y riqueza de géneros fue mayor en las semillas que en adultos (tabla XI). Dentro de las Actinobacteria, *Propionibacterium* spp. es un género exclusivo de los adultos de las tres especies de ostreidos en ambos sitios de engorda (tabla XII), mientras que dentro de los Bacteroidetes casi todos los géneros detectados se encuentran asociados a la microbiota de las semillas (tabla XI). Los géneros *Burkholderia* spp. y *Escherichia* y/o *Shigella* son los que están presentes en *C. corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* en las dos etapas de crecimiento estudiadas y en ambos sitios de engorda (tablas XI y XII). El género *Vibrio* spp., solo se presentó en las semillas de las tres especies estudiadas.

Cuando comparamos las muestras depuradas de las no depuradas de adultos engordados en Bahía Magdalena, nuevamente podemos observar que la diferencia entre dichas muestras radica principalmente en la presencia de Cianobacterias, particularmente del género *GpIIa*, *Bacillariophyta* y *Chlorophyta* (Tabla XIII). Destaca también, dentro del phylum Actinobacteria la predominancia del género *Ilumatobacter* sp.

En la figura 41, se pueden observar los géneros de Proteobacterias encontrados en la microbiota asociada a las semillas de las tres especies de ostión. Como se puede observar en dicha figura, que la composición de la microbiota asociada a las semillas es muy similar en todos los Ostreidos estudiados, observándose diferencias principalmente en las abundancias relativas y la mayor riqueza de géneros que se observa en *C. gigas*. En la figura, destaca como género más abundante *Neptuniibacter*, seguido de *Marinicella* y *Oceanicola*.

TABLA XI. Abundancia Total de Géneros bacterianos asociados a la microbiota residente en Semillas de Ostreidos. Resultados obtenidos de la pirosecuenciación del gen *16S ARNr* detectado en ostreidos depurados. Los valores representan número de secuencias correspondientes a cada género bacteriano identificado.

PHYLUM	GÉNERO	<i>Crassostrea corteziensis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Crassostrea sikamea</i>
Actinobacteria	Ilumatobacter	11	0	0
	Aquimarina	70	11	13
	Crocinitomix	0	0	20
	Ekhidna	23	12	11
	Gilvibacter	65	21	14
	Jejuia	0	0	14
	Kordia	26	30	10
Bacteroidetes	Lewinella	245	103	169
	Marinifilum	90	0	152
	Muricauda	26	11	17
	Reichenbachiella	12	0	0
	Roseivirga	30	0	11
	Tenacibaculum	155	23	108
	Winogradskyella	116	44	73
Firmicutes	Streptococcus	0	12	0
Fusobacteria	Fusobacterium	0	0	42

TABLA XI. Continuación.

PHYLUM	GÉNERO	<i>Crassostrea corteziensis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Crassostrea sikamea</i>
Alfa-Proteobacteria	Cohaesibacter	36	13	59
	Kiloniella	11	12	24
	Kordiimonas	23	13	14
	Loktanella	18	0	0
	Maritalea	16	11	36
	Oceanicola	152	65	92
	Phaobacter	15	10	0
	Rhodovulum	118	44	92
	Roseovarius	41	13	33
	Ruegeria	19	0	14
	Sneathiella	0	0	26
	Terasakiella	18	0	15
	Thalassobius	0	0	11
Beta-Proteobacteria	Burkholderia	27	36	101
Delta-Proteobacteria	Desulfobacter	0	0	10
	Desulfocella	23	0	0
	Desulfoluna	0	0	20
	Desulfovibrio	0	0	18
	Plesiocystis	0	0	10
Gamma-Proteobacteria	Acinetobacter	26	0	0
	Aestuariibacter	29	10	0
	Algicola	0	0	16
	Alteromonas	12	25	12
	Cycloclasticus	170	32	31
	Enhydrobacter	15	0	0
	Escherichia/Shigella	65	37	160
	Haliae	10	0	0
	Marinicella	233	89	119
	Marinobacter	56	66	0
	Methylphaga	25	18	0
	Moritella	16	0	0
	Neptuniibacter	374	120	189
	Pseudoalteromonas	34	20	44
	Pseudomonas	35	0	20
	Reinekea	19	12	11
Thalassomonas	95	27	81	
Vibrio	70	28	15	
TOTAL	52	869	267	654

Se asignó un Género a toda aquella lectura que presentó una similitud de secuencia $\geq 97\%$ con un género depositado en la base de datos RDP y SILVA. NOTA IMPORTANTE: solo se muestran resultados de secuencias encontrados en 10 individuos de una misma MID.

TABLA XII. Abundancia Total de Géneros bacterianos asociados a la microbiota residente en Adultos de Ostreidos. Resultados obtenidos de la pirosecuenciación del gen *16S ARNr* detectado en ostreidos depurados. Los valores representan número de secuencias correspondientes a cada género bacteriano identificado.

PHYLUM	GÉNERO	<i>Crassostrea corteziensis</i>		<i>Crassostrea gigas</i>		<i>Crassostrea sikamea</i>	
		BM	BT	BM	BT	BM	BT
Actinobacteria	<i>Propionibacterium</i>	33	42	11	12	15	40
Bacteroidetes	<i>Tenacibaculum</i>	0	0	10	0	0	35
Cyanobacteria/Chloroplast	Bacillariophyta	0	0	24	0	0	0
	GpIIa	0	0	0	37	0	0
Fusobacteria	<i>Psychrilyobacter</i>	0	10	10	0	0	86
Alfa-Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	0	0	48	0	0	0
	<i>Sphingomonas</i>	10	21	11	0	0	11
Beta-Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	165	235	2106	25	19	27
	<i>Delftia</i>	17	0	0	0	10	0
Gamma-Proteobacteria	<i>Ralstonia</i>	0	16	0	0	0	0
	<i>Acinetobacter</i>	0	10	0	0	0	0
	<i>Aeromonas</i>	48	0	0	0	0	0
	<i>Endozoicomonas</i>	12	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia/Shigella</i>	28	245	81	125	34	49
	<i>Nevskia</i>	0	0	25	0	0	0
	<i>Pseudoalteromonas</i>	0	11	29	0	0	16
	<i>Pseudomonas</i>	0	0	10	0	0	0
	<i>Serratia</i>	0	0	0	326	0	0
	<i>Umboniibacter</i>	0	39	0	22	0	95
Tenericutes	<i>Mycoplasma</i>	0	0	15	0	0	0
TOTAL		20	313	629	2380	547	78

Se asignó un Género a toda aquella lectura que presentó una similitud de secuencia $\geq 97\%$ con un género depositado en la base de datos RDP y SILVA. BM: sitio de cultivo en Bahía Magdalena, ostiones depurados BT: sitio de cultivo en Bahía Topolobampo, ostiones depurados. NOTA IMPORTANTE: solo se muestran resultados de secuencias encontrados en 10 individuos de una misma MID.

TABLA XIII. Abundancia Total de Géneros bacterianos asociados a la microbiota en Adultos depurados y No depurados de Ostreidos cultivados en Bahía Magdalena. Resultados obtenidos de la pirosecuenciación del gen *16S ARNr*.

PHYLUM	GÉNERO	<i>Crassostrea corteziensis</i>		<i>Crassostrea gigas</i>		<i>Crassostrea sikamea</i>		
		BM	BM-NOD	BM	BM-NOD	BM	BM-NOD	
Actinobacteria	<i>Ilumatobacter</i>	0	59	0	12	0	11	
	<i>Propionibacterium</i>	33	13	11	10	15	12	
Bacteroidetes	<i>Actibacter</i>	0	10	0	0	0	0	
	<i>Tenacibaculum</i>	0	0	10	0	0	0	
Cyanobacteria/Chloroplast	Bacillariophyta	0	704	24	108	0	34	
	Chlorophyta	0	470	0	97	0	28	
	GpIIa	0	1384	0	305	0	107	
	GpIV	0	10	0	10	0	0	
Fusobacteria	<i>Psychrilyobacter</i>	0	0	10	0	0	0	
Alfa-Proteobacteria	<i>Andersenella</i>	0	16	0	0	0	0	
	<i>Bradyrhizobium</i>	0	14	0	0	0	0	
	<i>Methylobacterium</i>	0	0	48	0	0	0	
	<i>Sphingomonas</i>	10	0	11	0	0	0	
Beta-Proteobacteria	<i>Achromobacter</i>	0	15	0	0	0	0	
	<i>Burkholderia</i>	165	30	2106	23	19	11	
	<i>Delftia</i>	17	0	0	0	10	0	
Delta-Proteobacteria	<i>Desulfosarcina</i>	0	13	0	0	0	0	
Gamma-Proteobacteria	<i>Aeromonas</i>	48	13	0	0	0	0	
	<i>Endozoicomonas</i>	12	0	0	0	0	0	
	<i>Escherichia/Shigella</i>	28	383	81	35	34	12	
	<i>Nevskia</i>	0	47	25	11	0	0	
	<i>Pseudoalteromonas</i>	0	0	29	0	0	0	
	<i>Pseudomonas</i>	0	47	10	0	0	0	
	<i>Stenotrophomonas</i>	0	13	0	11	0	0	
<i>Thiohalocapsa</i>	0	12	0	0	0	0		
Tenericutes	<i>Mycoplasma</i>	0	0	15	0	0	0	
TOTAL		26	313	3253	2380	622	78	215

Se asignó un Género a toda aquella lectura que presentara ≥ 97 % de similitud de secuencia con un género depositado en la base de datos RDP y SILVA. BM: sitio de cultivo en Bahía Magdalena, ostiones depurados; BT: sitio de cultivo en Bahía Topolobampo, ostiones depurados. BM-NOD: sitio de cultivo en Bahía Magdalena, ostiones NO depurados; BT-NOD: sitio de cultivo en Bahía Topolobampo, ostiones NO depurados.

A diferencia de lo que ocurre con las semillas, la comunidad Proteobacteria asociada a adultos la riqueza específica es mucho menor (Fig. 42). Los géneros comunes a *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* engordados en Bahía Magdalena fueron *Burkholderia* spp., y los géneros *Escherichia/Shigella*, presentando diferencias solo en su abundancia relativa. En

Bahía Topolobampo este patrón se repite a excepción de que aparece otro género en común, *Umboniibacter* (Fig. 42).

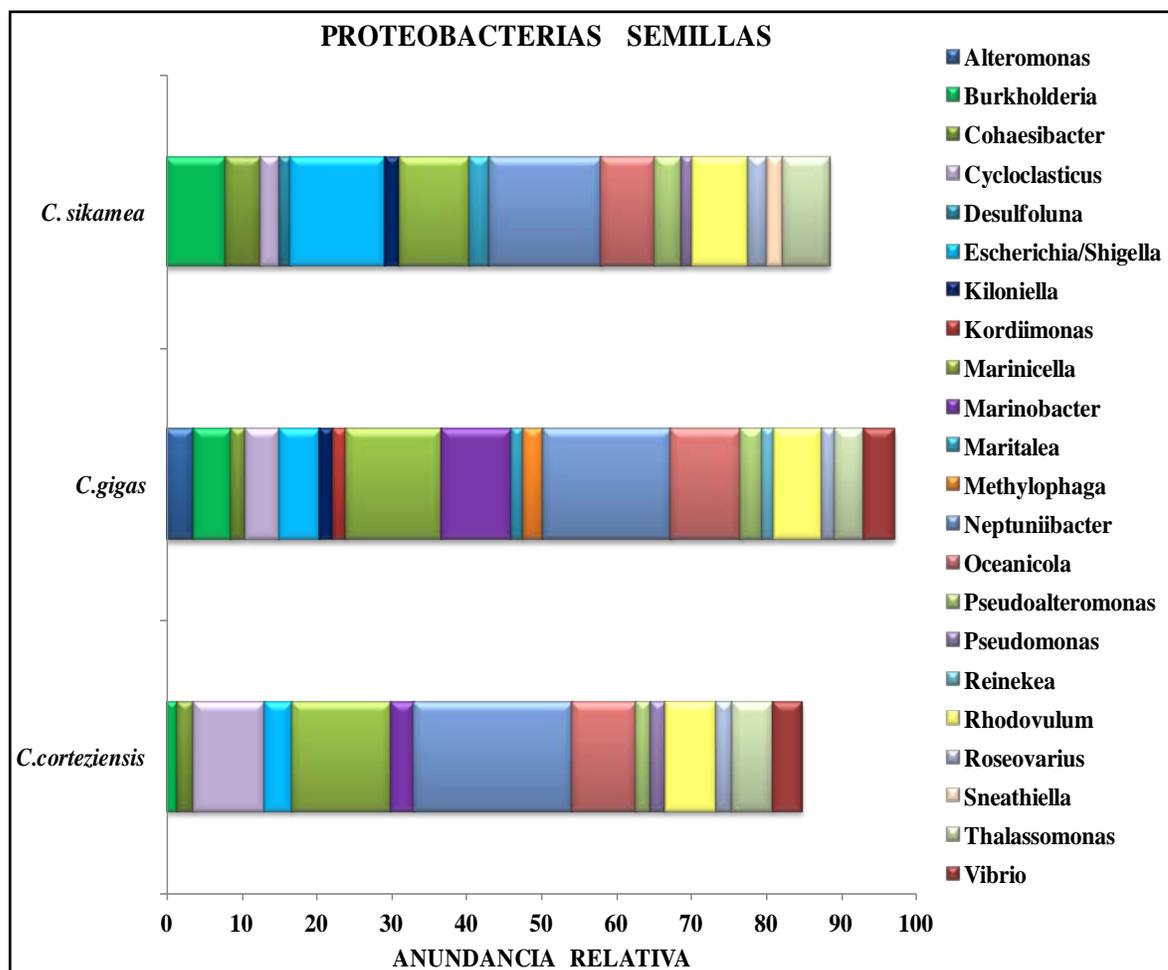


FIGURA 41. Géneros de Proteobacterias componentes de la Microbiota residente asociada a Semillas de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*. Resultados de las secuencias obtenidas de la pirosecuenciación de la librería *16S ARNr*. NOTA IMPORTANTE: Sólo se grafican abundancias $\geq 3\%$.

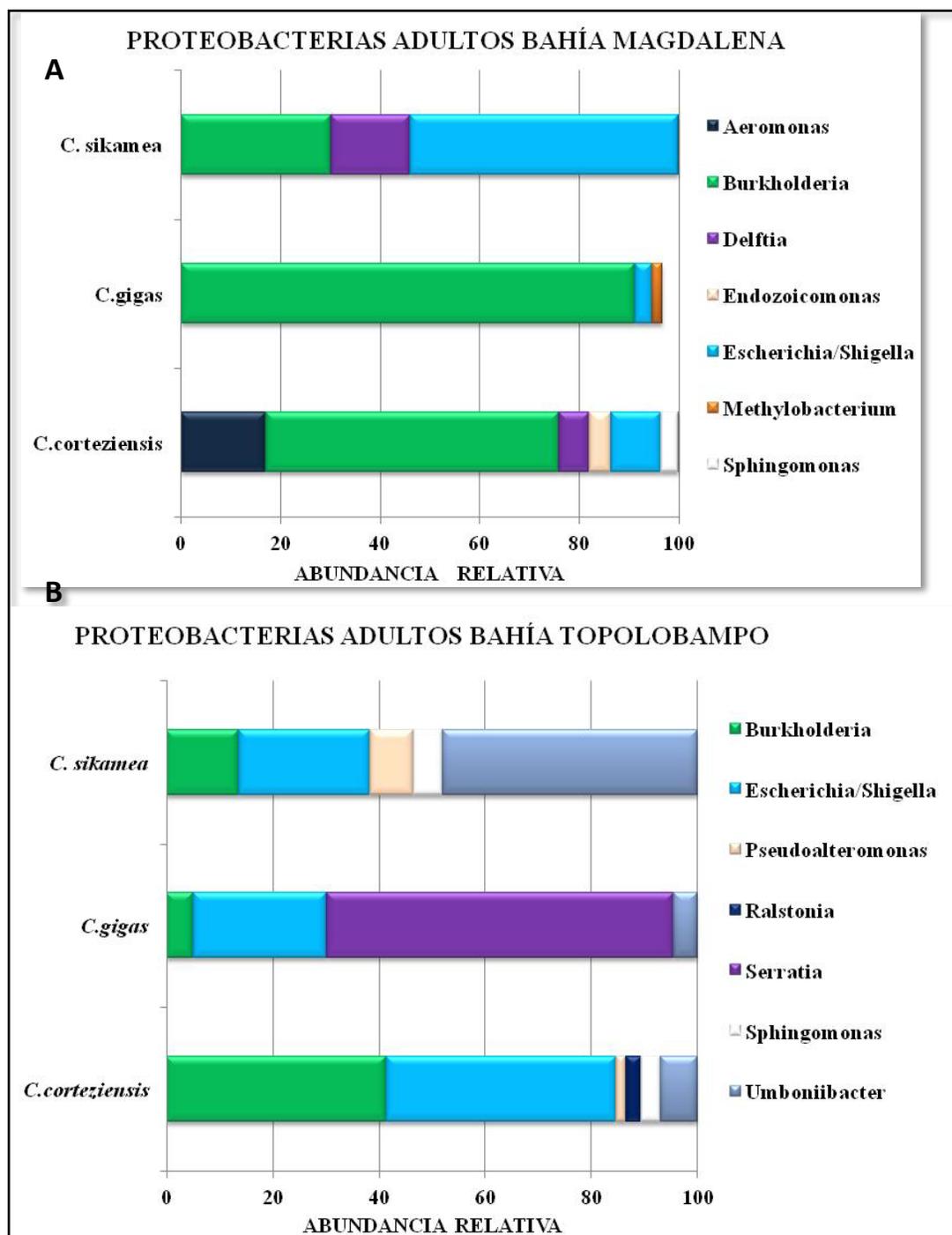


FIGURA 42. Géneros de Proteobacterias componentes de la Microbiota residente asociada a Adultos de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* en dos sitios de engorda. Resultados de las secuencias obtenidas de la pirosecuenciación de la librería 16S ARNr. NOTA IMPORTANTE: Sólo se grafican abundancias $\geq 3\%$.

En la figura 43, se grafican las diferencias encontradas en cuanto a los géneros de Proteobacterias detectados en adultos depurados y no depurados cultivados en un mismo sitio. Como se puede observar, la abundancia y riqueza encontrada para este phylum bacteriano, en las muestras que fueron depuradas es mayor a la detectada en las no depuradas. Destaca, que en ambos tratamientos, se encontró la presencia de *Escherichia/Shigella* y *Burkholderia* spp.

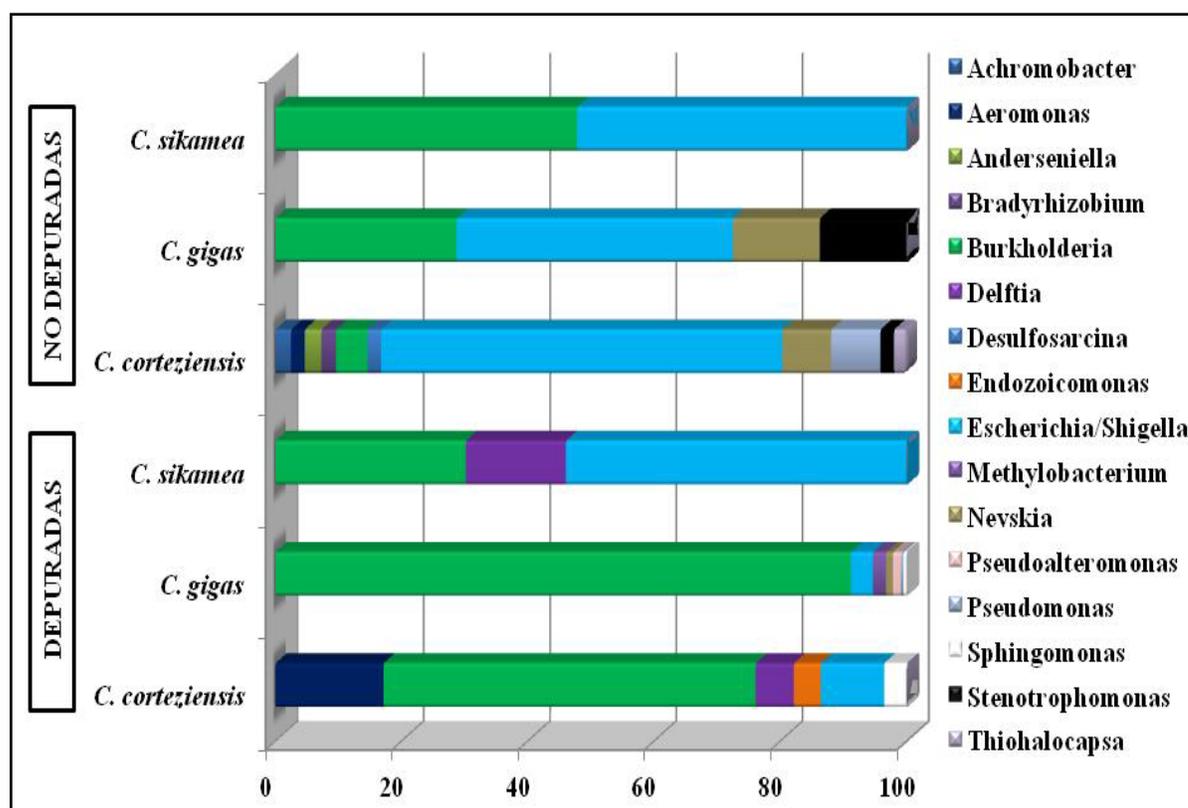


FIGURA 43. Comparación de los Géneros de Proteobacterias componentes de la Microbiota asociada a Adultos de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* en muestras depuradas y no depuradas engordados en Bahía Magdalena. Resultados de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación de la librería *16S ARNr*. NOTA IMPORTANTE: Sólo se grafican abundancias $\geq 3\%$.

Las abundancias y composición de Actinobacteria que forman parte de la microbiota asociada a ostreidos depurados, se muestra en la figura 44. Únicamente las semillas de *C. corteziensis* presentaron algún genero de Actinobacteria asociada a su microbiota, específicamente, *Ilumatobacter* sp. Los adultos de las tres especies de ostreidos, tienen asociada a su microbiota la bacteria *Propionibacterium*, sin importar donde estos fueron engordados (Fig. 44). Sin embargo, cuando estas muestras no fueron depuradas se encontró además la presencia de *Ilumatobacter* sp. (Fig. 45).

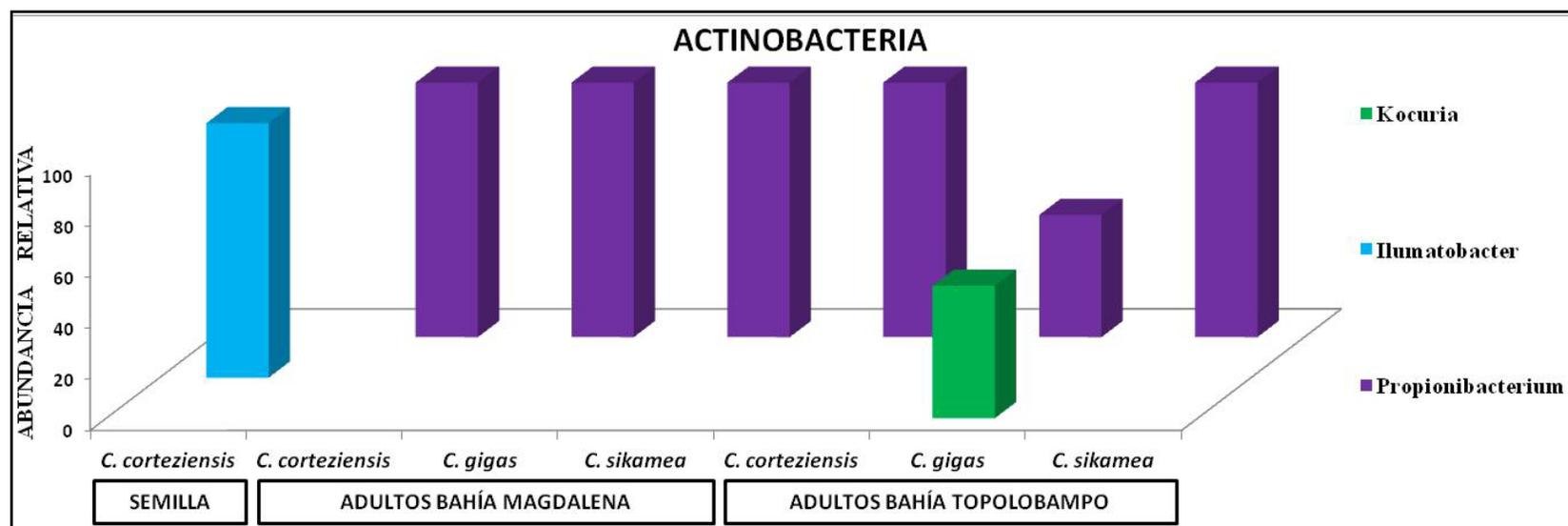


FIGURA 44. Géneros de Actinobacteria componentes de la Microbiota residente asociada a *Crassostrea corteziensis*, *C. gigantea* y *C. sikamea*. Resultados de las secuencias obtenidas de la pirosecuenciación de la librería *16S ARNr*. NOTA IMPORTANTE: Sólo se grafican abundancias $\geq 3\%$.

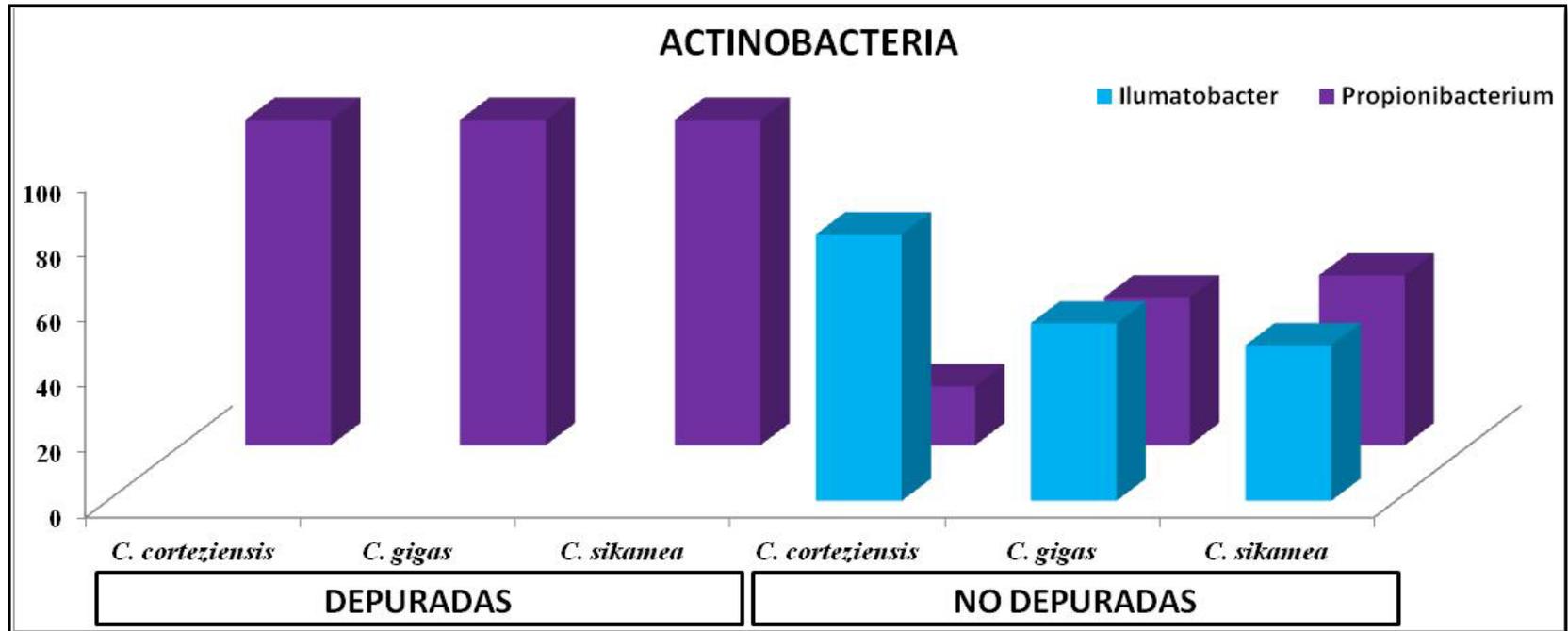


FIGURA 45. Comparación de los Géneros de Actinobacteria componentes de la Microbiota asociada de muestras depuradas y no depuradas de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* cultivados en Bahía Magdalena. Resultados de las secuencias obtenidas de la pirosecuenciación de la librería 16S ARNr. **NOTA IMPORTANTE:** Sólo se grafican abundancias $\geq 3\%$.

Representantes del phylum Bacteroidetes, fueron casi exclusivamente detectados como abundantes en la microbiota de las semillas, con una composición de géneros muy similar entre una especie de ostión y otra, mostrando diferencias principalmente de abundancia (Fig. 46). *Lewinella*, *Tenacibaculum* y *Winogradskyella* son algunos de los géneros comunes y más abundantes de las tres especies de Ostreidos. El género *Tenacibaculum* se encontró también en adultos sin depurar de *C. gigas* proveniente de BM y adultos de *C. sikamea* de BT (datos no graficados).

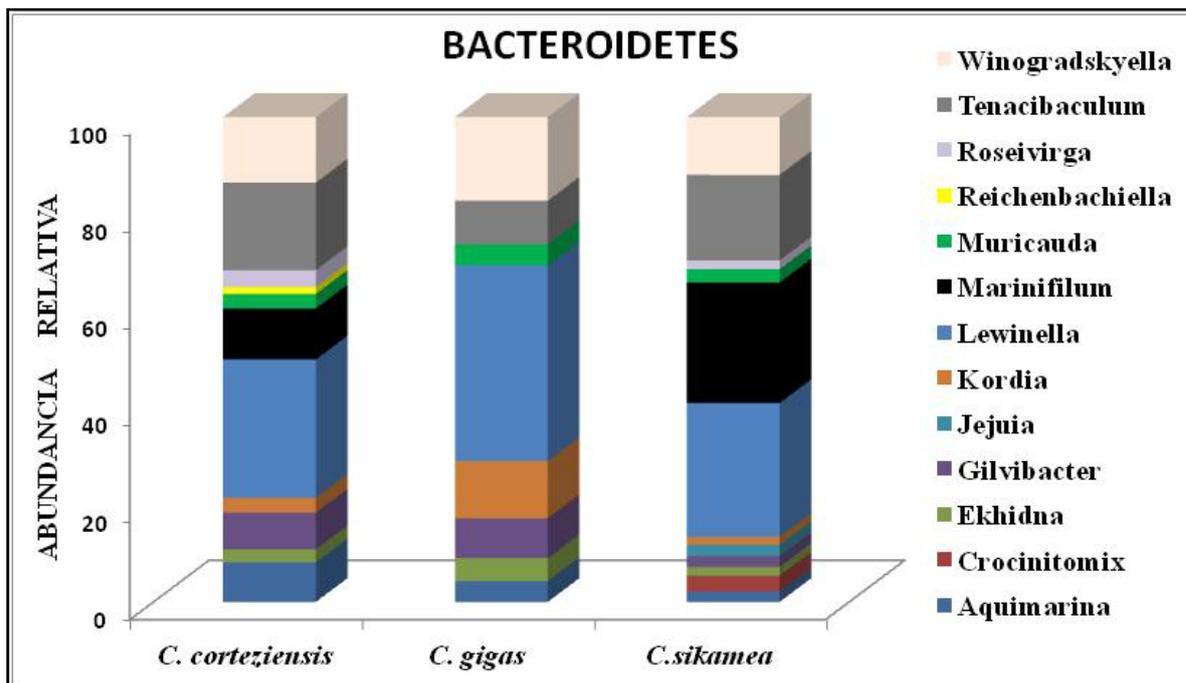


FIGURA 46. Géneros de Bacteroidetes componentes de la Microbiota residente asociada Semillas de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*. Resultados de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación de la librería *16S ARNr*. NOTA IMPORTANTE: Sólo se grafican abundancias $\geq 3\%$.

Como se puede observar anteriormente (Fig. 38 y Tabla XIII), con muy pocas excepciones (adultos de *C. gigas*), las cianobacterias y algas fueron componentes muy importantes de la microbiota en organismos no depurados, por ello la composición en cuanto géneros se muestra en la figura 47.

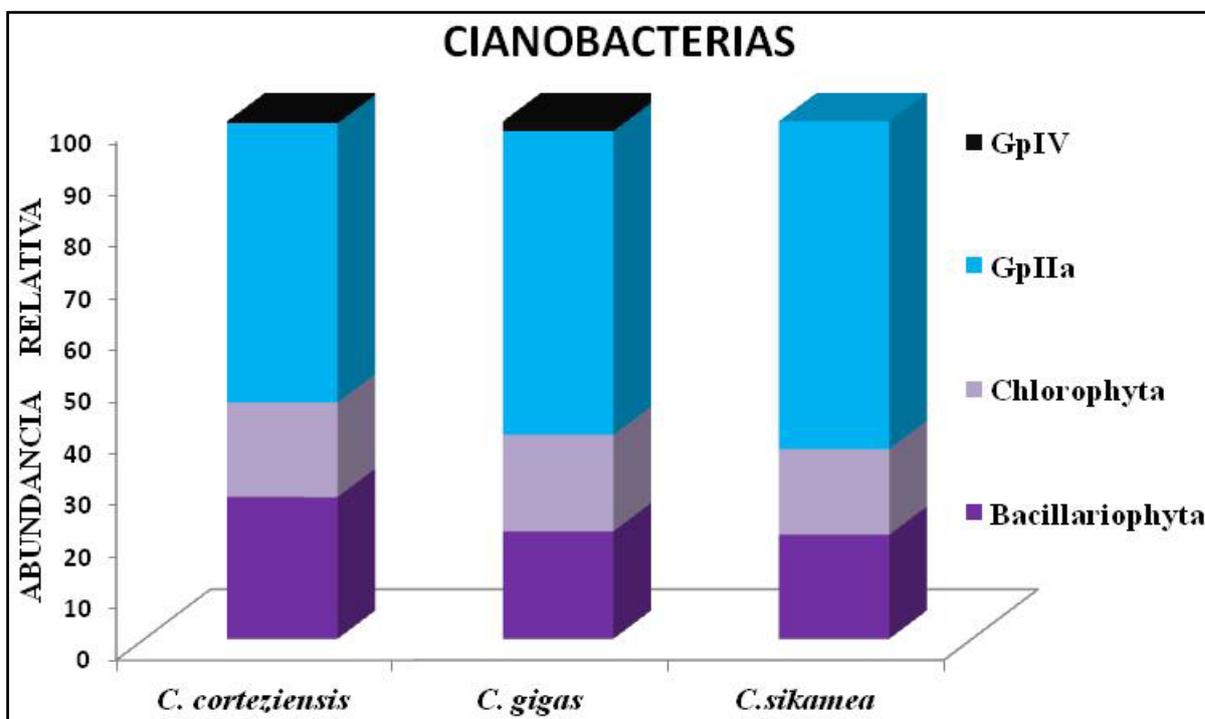


FIGURA 47. Cianobacterias y Algas encontrados en la Microbiota asociada a *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* de organismos no depurados. Resultados de las secuencias obtenidas de la pirosecuenciación de la librería 16S ARNr. NOTA IMPORTANTE: Sólo se grafican abundancias $\geq 3\%$.

En la figura 48, se representa como diagrama de Venn, un resumen de las bacterias detectadas como parte de la microbiota residente (ostiones depurados), transitoria y residente (ostiones no depurados) y las transitorias, resultantes de las diferencias entre estas dos. Claramente se puede observar que Cianobacterias e *Ilumatobacter* son componentes transitorias de la microbiota asociadas a los ostreidos incluidos en este estudio. Los componentes bacterianos que se detectaron tanto en ostiones depurados como los no depurados, probablemente son los que definen a la microbiota residente presentes en estos ostiones (Fig. 48). Las bacterias que fueron detectadas únicamente en los organismos depurados, no estuvo presente en todas las especies de ostreidos.

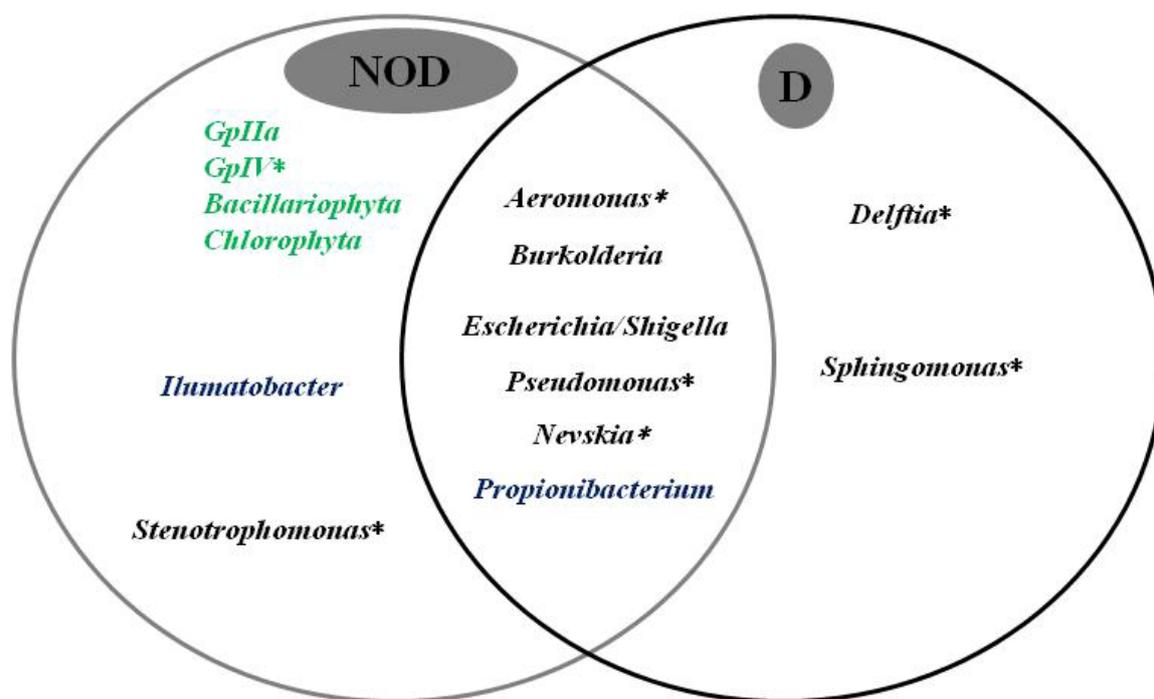


FIGURA 48. Diagrama de Venn que resume los géneros bacterianos detectados en organismos Depurados (D) y en los No Depurados (NOD) en adultos de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* cultivadas en Bahía Magdalena. Resultados de la comparación de secuencias obtenidas de la pirosecuenciación de la librería *16S ARNr* de muestras depuradas vs no depuradas. En verde: Cianobacterias y algas, azul: Actinobacteria, Negro: Proteobacterias. *: Aquellos géneros que solo se encontraron en dos especies de Ostreido.

En la figura 49, se resume la composición de la microbiota asociada y que comparten las tres especies de Ostreidos e identificados en cada etapa de crecimiento y sitio de cultivo. Se puede observar que en semillas la diversidad es mayor que en adultos, principalmente dentro del Phylum Proteobacteria, mientras que una variedad de géneros representantes de los Bacteroidetes, únicamente se presentan en esta etapa del desarrollo de los organismos estudiados. La diversidad es mayor en los adultos cultivados en Bahía Topolobampo y en ambos sitios de cultivo se detectó la presencia del género *Propionibacterium* (Fig. 49). Claramente los géneros más abundantes en las tres especies de ostión y que se presenta independientemente del lugar donde estos hayan sido engordados o etapa de crecimiento donde se encuentren, son *Burkholderia* spp. y *Escherichia/Shigella*.

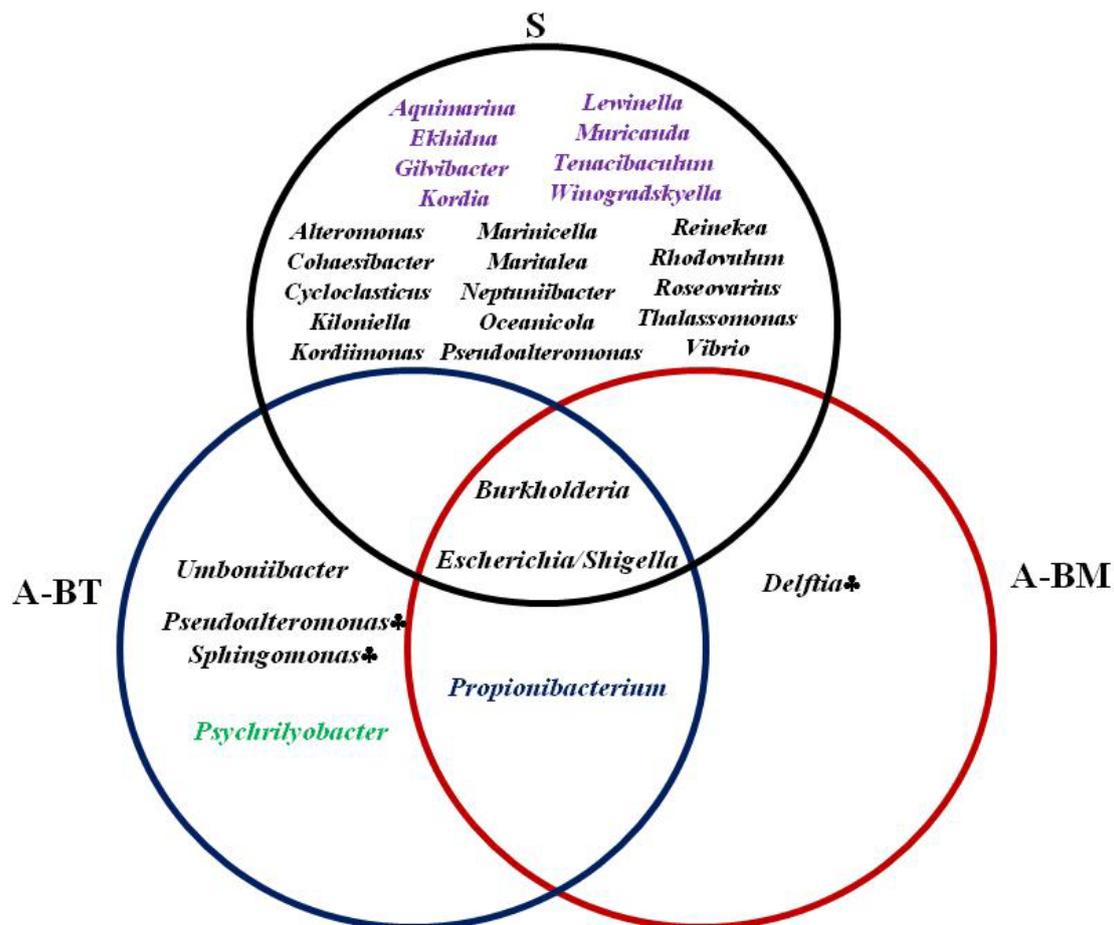


FIGURA 49. Diagrama de Venn que resume los componentes bacterianos principales asociados a la microbiota residente de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. S: semilla (circulo en negro), A-BM: adultos cultivados en Bahía Magdalena (circulo en rojo), A-BT: adultos cultivados en Bahía Topolobampo (circulo en azul). En violeta: Bacteroidetes, azul: Actinobacteria, Negro: Proteobacterias. Verde: Fusobacteria, ♣: Aquellos géneros únicamente se encontraron en *C. corteziensis* y *C. sikamea*. Los resultados mostrados corresponden a identificación de las secuencias obtenidas de la pirosecuenciación de la librería *16S ARNr*.

En la tabla XIV se muestran los resultados obtenidos utilizando diversos índices de diversidad calculados utilizando los datos obtenidos mediante la identificación de los géneros a partir de las secuencias obtenidas a partir de la pirosecuenciación de la librería genética *16S ARNr* de bacterias asociada a *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. Como se puede observar en dicha tabla, la riqueza específica fue mayor en las semillas, mientras que las abundancias totales fueron muy variables entre especie de ostión, etapa de crecimiento y lugar de engorde. El índice de equidad de Shannon-Wiener (H'), muestran que la diversidad fue mayor en la semillas seguido de los organismos que no fueron depurados, el sitio de cultivo ubicado en Bahía Topolobampo la microbiota

presenta mayor diversidad que en Bahía Magdalena. Estos mismos resultados se observan cuando se analiza el índice de Simpson (tabla XIV). En las semillas de las tres especies de ostiones estudiadas, se obtuvo un índice de diversidad de Pielou (J') cercano a 1, lo que indica que los géneros encontrados en esta etapa de crecimiento son igualmente abundantes, mientras que lo contrario ocurre con los adultos de *C. gigas* engordados en Bahía Magdalena donde dicho índice es de 0.215 lo que indica que existe mucha disparidad entre las abundancias de los géneros asociados a su microbiota. *Crassostrea corteziensis* es quien presenta los mayores valores de riqueza y abundancia, a excepción de los adultos cultivados en Bahía Magdalena.

Para determinar la similitud o diferencia estadística, entre las comunidades bacterianas asociadas a cada una de las especies incluidas en este estudio, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y los resultados se muestran en la figura 50. Los resultados mostrados en dicho gráfico fueron estadísticamente significativos y esta representados por una varianza acumulada del 90% (PC1 = 59.9%, $\lambda= 7.2$; PC2= 20.8%, $\lambda= 2.5$; PC3= 9.3%, $\lambda=1.3$). En etapa de semilla, las tres especies de ostión mostraron tener una microbiota asociada muy similar. Existe además una correlación entre la composición de la microbiota asociada y el lugar donde estos fueron cultivados, ya que se encontró similitud en la composición de la comunidad bacteriana de las especies *C. corteziensis* y *C. sikamea* cuando son engordados en el mismo lugar, no obstante esta clara asociación no se observa para *C. gigas* (Fig. 50).

TABLA XIV: Análisis de Diversidad de la microbiota bacteriana asociada a Ostreidos. Resultados de los géneros bacterianos obtenidos de la pirosecuenciación de la librería genética *16S ARNr*.

	ESPECIE	S	N	J'	H'(loge)	1- λ
SEMILLAS	<i>C. corteziensis</i>	42	2670	0.863	3.226	0.943
	<i>C. gigas</i>	30	968	0.909	3.091	0.942
	<i>C. sikamea</i>	40	1927	0.877	3.235	0.948
ADULTOS BAHÍA MAGDALENA	<i>C. corteziensis</i>	7	313	0.756	1.471	0.676
	<i>C. gigas</i>	12	2380	0.242	0.601	0.215
	<i>C. sikamea</i>	4	78	0.928	1.286	0.706
ADULTOS BAHÍA MAGDALENA NOD*	<i>C. corteziensis</i>	18	3253	0.582	1.684	0.737
	<i>C. gigas</i>	10	622	0.686	1.579	0.700
	<i>C. sikamea</i>	7	215	0.787	1.531	0.702
ADULTOS BAHÍA TOPOLOBAMPO	<i>C. corteziensis</i>	9	629	0.682	1.498	0.699
	<i>C. gigas</i>	7	560	0.650	1.265	0.603
	<i>C. sikamea</i>	8	359	0.903	1.877	0.826

S: Riqueza, N: total de Individuos, J': equidad de Pielou, H': Índice de Diversidad de Shannon, 1-l': Índice de Simpson

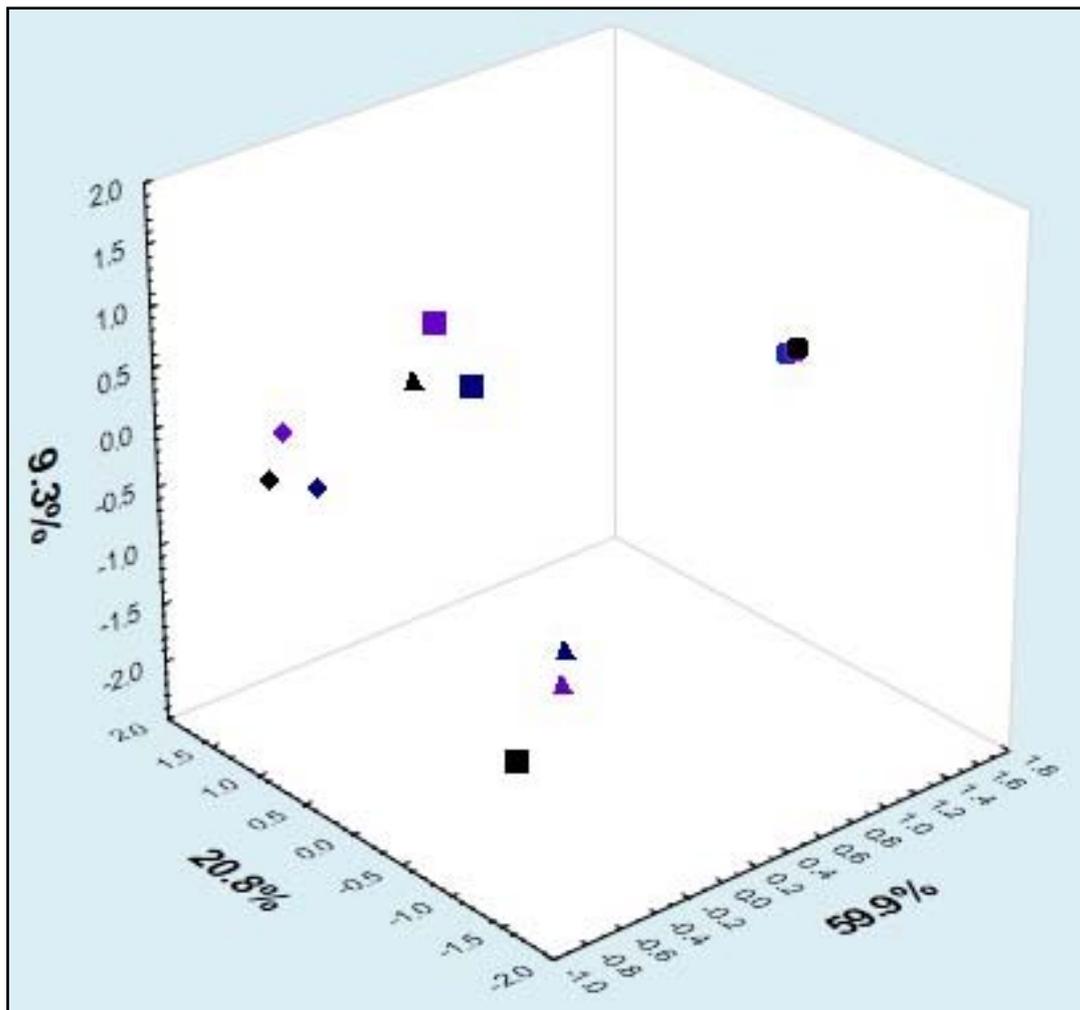


FIGURA 50. Gráfico de dispersión 3D del Análisis de Componente Principales (PCA) de la microbiota asociada a *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.

Resultados de la comparación de la comunidad bacteriana obtenida mediante la pirosecuenciación de la librería genética del gen *16S ARNr*. En negro: *C. gigas*, azul: *C. corteziensis*, violeta: *C. sikamea*. Semilla (●), Adultos depurados engordados en Bahía Magdalena (■), Adultos depurados engordados en Bahía Topolobampo (▲) y juveniles Adultos No depurados engordados en Bahía Magdalena (◆). Todos los resultados mostrados fueron estadísticamente significativos.

Dentro de los resultados obtenidos mediante la pirosecuenciación (tablas XI y XII) se puede observar que se detectaron géneros bacterianos asociados a la microbiota de los Ostreidos y que pueden considerarse como potencialmente patógenos. Estos probables patógenos se resumen en la tabla XV, ya que han sido anteriormente reportados como causantes de enfermedades en Ostreidos y en muchos casos en la transmisión de estos patógenos a humanos donde generan también enfermedad.

TABLA XV. Potenciales patógenos bacterianos asociados a la microbiota de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. Resultados obtenidos mediante pirosecuenciación del gen 16S ARNr.

Género Bacteriano	Especie Ostreido	Enfermedad Ostreidos*	Transmitida humanos*
<i>Acinetobacter</i>	semillas <i>C. corteziensis</i>	Semillas	no R
<i>Aeromonas</i>	adultos <i>C. corteziensis</i>	no R	si
<i>Alteromonas</i>	semillas toda s sp.	Semillas	no R
<i>Chlamydia</i>	adultos todas sp.	Adultos	si
<i>Escherichia coli</i>	semillas y adultos toda s sp.	no R	si
<i>Mycoplasma</i>	adultos <i>C. gigas</i>	Adultos	si
<i>Pseudomonas</i>	semillas <i>C. gigas</i> y <i>C. sikamea</i>	Semillas	si
<i>Shigella</i>	semillas y adultos toda s sp.	no R	si
<i>Streptococcus</i>	semilla <i>C. gigas</i>	no R	si
<i>Vibrio</i>	semillas toda s sp.	Semillas, Juveniles, Adultos	si

*Paillard *et al.* (2004); Thompson *et al.*, (2005). no R: no reportado, sp. : especies de Ostreidos

Eficiencia y calidad de la pirosecuenciación de la librería de amplicones de Arqueas

Los resultados de la cuantificación de la librería genética para el gen *16S ARNr* de Arqueas, se muestra en la figura 51. En dicha figura se puede ver que la cuantificación de ADN, la que resulta en una concentración de 8.39 ng/ μ l, equivalente a 2.23×10^{10} moléculas/ μ l, menor que la obtenida para la librería de bacterias (4.08×10^{11} moléculas/ μ l). Esto era de esperar, ya que la concentración obtenida cuando se cuantificó mediante electroforesis en gel también fue mucho menor (Fig. 28). Además existen una gran cantidad de amplicones inespecíficos de tamaño pequeño que pueden interferir con la pirosecuenciación. A pesar de ello, y considerando que la concentración de la librería era muy baja, se optó por no realizar el proceso de remoción de fragmentos pequeños ya existía una gran probabilidad de perder parte importante de la muestra.

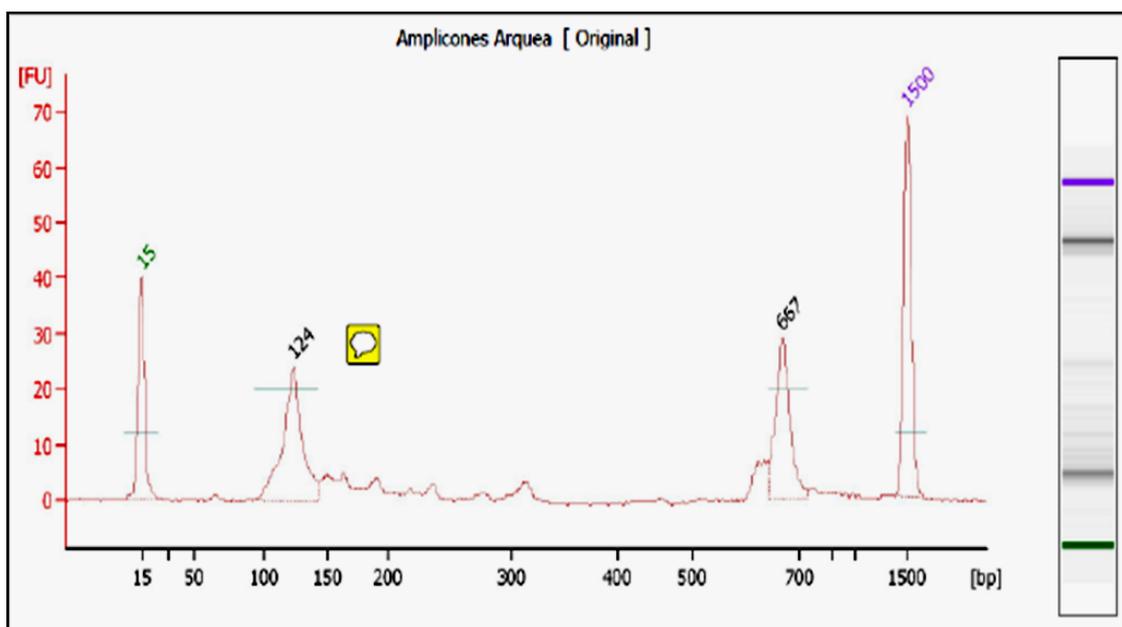


FIGURA 51: Cuantificación por fluorescencia del pool de amplicones del gen *16S ARNr* de Arqueas presentes en *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.

El resultado de la corrida para la librería genética de Arqueas, se muestra en la figura 52. Desafortunadamente, no se obtuvo buen rendimiento de la corrida ya que se sesgó a lecturas de amplicones pequeños, moda y media de lecturas de 40 y 60 pb respectivamente, mientras que, las lecturas de nuestro interés de 500-600pb se vieron muy poco representadas. Una posible solución a este inconveniente, podría haber sido realizar la remoción de los fragmentos pequeños, sin embargo, no se optó por dicha

opción dado que al analizar las secuencias nos encontramos con que el 39% de las lecturas del tamaño esperado (500 a 600pb) correspondieron a la amplificación cruzada del gen *18S ARNr* de Moluscos Bivalvos Ostreidos (Fig. 53). Específicamente, las secuencias presentaron un tamaño de amplicón de 560-567 pb, lo que impidió también poder observar el amplicón no deseado, cuando se realizó la corrida de electroforesis en gel de agarosa (Fig. 28).

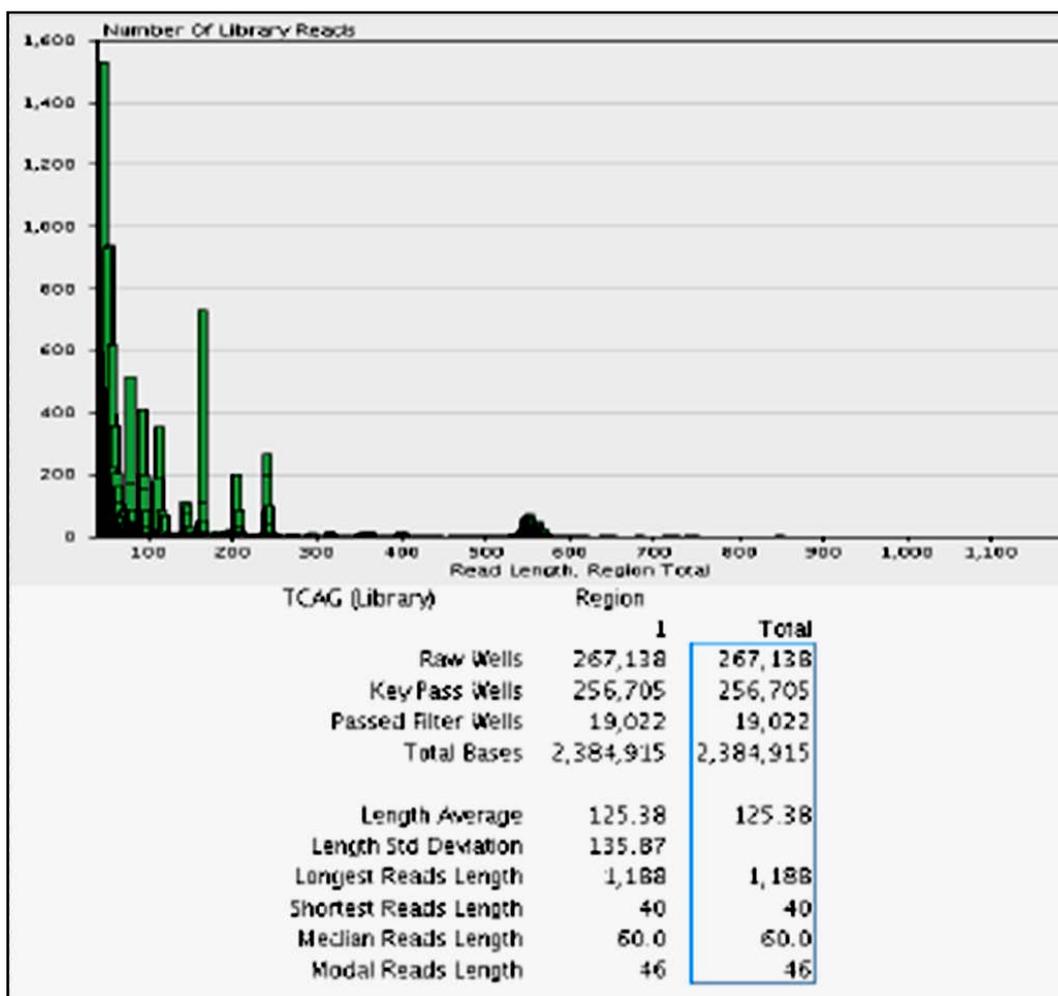


FIGURA 52. Resultado de la corrida de pirosecuenciación para la librería de amplicones del gen *16S ARNr* Arquea de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	L
EU880789.1	<i>Crassostrea virginica</i> isolate Cvrl11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	24.7	24.7	30%	11	100%	
EU880792.1	<i>Crassostrea virginica</i> isolate Cvrl11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	24.7	24.7	30%	11	100%	
EU880791.1	<i>Crassostrea gigas</i> isolate Crassostrea gigas111 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	24.7	43.3	30%	11	100%	
EU880790.1	<i>Crassostrea gigas</i> isolate Crassostrea gigas111 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	24.7	43.3	30%	11	100%	
GU207468.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba177C12, complete sequence	24.7	43.3	35%	11	100%	
AM182289.1	<i>Crassostrea gigas</i> partial 18S rRNA gene	24.7	24.7	30%	11	100%	
AB084842.1	<i>Crassostrea gigas</i> gene for 18S rRNA, complete sequence	24.7	24.7	30%	11	100%	
X89316.1	<i>C. virginica</i> small subunit ribosomal RNA gene	24.7	24.7	30%	11	100%	
JF918916.1	<i>Crassostrea ariakensis</i> clone Ca20 USP-like protein isoform 2 mRNA, complete cds	22.7	22.7	27%	45	100%	
HM627878.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> voucher HYYJ D904 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	22.7	22.7	27%	45	100%	
FJ841884.1	<i>Crassostrea ariakensis</i> mitochondrion, complete genome	22.7	41.3	45%	45	100%	
FJ841883.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> mitochondrion, complete genome	22.7	22.7	27%	45	100%	
GU207482.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba80D21, complete sequence	22.7	80.6	65%	45	100%	
GU207466.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba118P5, complete sequence	22.7	99.2	65%	45	100%	
GU207448.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba127B8, complete sequence	22.7	22.7	27%	45	100%	
GU207441.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba91N8, complete sequence	22.7	41.3	50%	45	100%	
GU207422.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba67A11, complete sequence	22.7	97.2	52%	45	100%	
GU207421.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba21O17, complete sequence	22.7	59.9	30%	45	100%	
GU207418.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba127F5, complete sequence	22.7	117	57%	45	100%	
GU207411.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba181I6, complete sequence	22.7	41.3	40%	45	100%	
GU207407.1	<i>Crassostrea gigas</i> clone CG_Ba31I7, complete sequence	22.7	78.5	52%	45	100%	
EU872894.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> isolate Hainan big#1 mitochondrion, complete genome	22.7	22.7	27%	45	100%	
FJ689173.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> isolate H50 mitochondrion, complete genome	22.7	22.7	27%	45	100%	
FJ689172.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> isolate BH45 mitochondrion, complete genome	22.7	22.7	27%	45	100%	
EU288073.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> mitochondrion, complete genome	22.7	22.7	27%	45	100%	
AM382380.1	<i>Crassostrea gigas</i> partial mRNA for putative strombine dehydrogenase (stroh gene), isolated from adductor muscle	22.7	22.7	27%	45	100%	
A1879885.1	<i>Crassostrea gigas</i> mRNA for alanopine dehydrogenase 2 (alodh2 gene)	22.7	22.7	27%	45	100%	
EU818038.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> isolate QZ6 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	22.7	22.7	27%	45	100%	
EU818034.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> isolate ZHW4 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	22.7	22.7	27%	45	100%	
EU818033.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> isolate Y86 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	22.7	22.7	27%	45	100%	
EU818032.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i> isolate SH1 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	22.7	22.7	27%	45	100%	

FIGURA 53. Resultado de la amplificación cruzada para el gen *18S ARNr* de Ostreidos identificado mediante la pirosecuenciación de la librería del gen *16S ARNr* Arquea de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.

En la tabla XVI, se muestra la cantidad de lecturas obtenidas para cada MID de la librería de Arqueas. No se obtuvieron lecturas para los MID 4, 6 y 11.

TABLA XVI. Rendimiento de la pirosecuenciación de la librería de amplicones 16S ARNr Arquea obtenida de *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*.

Especie Ostreido	Característica de la Muestra	MUESTRAS	Lecturas Totales	Lecturas Válidas*
<i>C. corteziensis</i>	Semilla	MID01	251	156
<i>C. corteziensis</i>	Adulto/Bahía Magdalena Depurada	MID02	1699	274
<i>C. corteziensis</i>	Adulto/Bahía Magdalena NODepurada	MID03	1712	222
<i>C. corteziensis</i>	Adulto/Bahía Topolobampo Depurada	MID04	0	0
<i>C. gigas</i>	Semilla	MID05	163	42
<i>C. gigas</i>	Adulto/Bahía Magdalena Depurada	MID06	0	0
<i>C. gigas</i>	Adulto/Bahía Magdalena NODepurada	MID07	996	288
<i>C. gigas</i>	Adulto/Bahía Topolobampo Depurada	MID08	1413	179
<i>C. sikamea</i>	Semilla	MID09	3000	383
<i>C. sikamea</i>	Adulto/Bahía Magdalena Depurada	MID10	1750	123
<i>C. sikamea</i>	Adulto/Bahía Magdalena NODepurada	MID11	0	0
<i>C. sikamea</i>	Adulto/Bahía Topolobampo Depurada	MID12	4696	219
TOTAL RENDIMIENTO			18978	2014

*: Secuencias con alta complejidad, alta calidad, ausencia de secuencias ricas en Ns (bases indeterminadas o ambiguas), ausencia de quimeras, las que coincidan con los *primers* usados en la PCR y secuencias de tamaños ≥ 500 bases.

Composición de la comunidad Arquea asociada a *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*.

Como se dijo anteriormente, no se obtuvo una buena secuenciación de la librería genética de Arqueas, principalmente por dos razones: bajo rendimiento de lecturas de los fragmentos de interés, porque se favoreció la secuenciación de fragmentos cortos y amplificación cruzada con el gen *18S ARNr* de los Ostreidos. Por esta razón, los resultados obtenidos de la composición de la comunidad Arquea asociada a la microbiota de las tres especies de ostiones estudiadas, debe ser considerada como muy preliminar. No obstante, los resultados obtenidos se muestran en la tabla XVII. Claramente, se pudo detectar únicamente géneros del Phylum Euryarchaeota, de los cuales *Haloarcula* parece ser la más abundante, mientras que el género *Halobacterium*

se detectó, en cantidades posibles de considerar como datos válidos, solamente en adultos de *Crassostrea sikamea* engordados en Bahía Topolobampo.

TABLA XVII. Composición de la comunidad Arquea asociada a Ostreidos. Resultados obtenidos mediante pirosuenciación de la librería del gen *16S ARNr*.

Especie Ostreido	Etapa Crecimiento	Sitio de Cultivo	PHYLUM		GENERO	
			Euryarchaeota	Haloarcula	Halobacterium	
<i>Crassostrea corteziensis</i>	SEMILLA	Bahía de La Paz	74	51	0	
		Bahía Magdalena	1	0	0	
	ADULTOS	Bahía Magdalena NOD*	0	0	0	
		Bahía Topolobampo	ND	ND	ND	
<i>Crassostrea gigas</i>	SEMILLA	Bahía de La Paz	25	0	1	
		Bahía Magdalena	ND	ND	ND	
	ADULTOS	Bahía Magdalena NOD*	2	1	0	
		Bahía Topolobampo	1	0	1	
<i>Crassostrea sikamea</i>	SEMILLA	Bahía de La Paz	35	0	1	
		Bahía Magdalena	63	63	0	
	ADULTOS	Bahía Magdalena NOD*	ND	ND	ND	
		Bahía Topolobampo	24	13	11	

*NOD: organismos no depurados; ND: no fue posible determinar porque no se obtuvieron lecturas. Se asignó un Phylum a toda aquella lectura que presentó $\geq 80\%$ de similitud de secuencia con un phylum de la base de datos RDP y SILVA. Se consideró como género a toda aquella lectura que presentó $\geq 97\%$ de similitud de secuencia con un phylum de la base de datos RDP y SILVA. Los resultados considerados como válidos para fueron aquellos MID, donde se presentó la lectura de género en al menos 10 individuos.

DISCUSIÓN

La composición de la microbiota asociada a ostreidos, probablemente, está determinada por propiedades particulares del huésped e influenciada por la dieta y las condiciones ambientales. La microbiota residente cumple una función fundamental como barrera protectora contra la colonización por potenciales patógenos; puede aportar positivamente al estatus sanitario y a la nutrición de los animales; por lo tanto, conocer su composición y sus variaciones en distintas condiciones es muy importante para el desarrollo sustentable de la ostricultura. En este trabajo de investigación, se determinó mediante técnicas moleculares independientes de cultivo, la composición de la microbiota residente en dos especies de ostión de importancia en la acuicultura mundial: *Crassostrea gigas* y *C. sikamea* y una de importancia y elevado potencial a nivel regional, *C. corteziensis*. Se comparó la composición de la microbiota autóctona en estos hospederos, utilizando organismos sanos y se monitoreó la composición de la comunidad bacteriana durante diferentes estados de crecimiento del ostión. Se estableció, cómo se modifica la microbiota asociada a partir del traspaso (siembra) de la semilla producida en el laboratorio bajo condiciones controladas (agua de mar tratada, alimento cultivado), a dos sitios de engorda en el ambiente natural donde deben enfrentarse a condiciones ambientales diferentes y variables.

Consideraciones metodológicas

Extracción de ADN

Para poder obtener una visión representativa de la composición de la microbiota asociada mediante técnicas moleculares independientes de cultivo, es indispensable contar con un método eficaz, reproducible y de alto rendimiento para la extracción de ADN bacteriano. Por esta razón, en este estudio, se debió proceder a utilizar diferentes protocolos para la extracción de ADN, entre los que se incluyeron: (1) Método de Sweijd *et al.* (1998) propuesto por los autores para extraer ADN específicamente de ostreidos y que involucra la utilización de CTAB, solubilización con NaCl, y precipitación con cloroformo-alcohol isoamílico; (2) Kit comercial QIAmp DNA MINI KIT., recomendado por Robledo *et al.*, (2000) quienes lo describen como un buen método para extraer eficientemente, ADN desde muestras de *Crassostrea virginica* y (3) método de Sambrook *et al.* (1989). Con éste último, método de extracción de ADN, solo se pudo obtener un buen resultado desde semillas y no de juveniles y adultos. Esto

pudo deberse a la presencia, en estos individuos más grandes, de gran cantidad de polisacáridos y lípidos como resultado de un mayor desarrollo digestivo, actividad nutricional y el acumulo de compuestos de reserva, principalmente, ácidos grasos (Sweijd *et al.*, 1998). La presencia de lípidos y polisacáridos, impide la precipitación del ADN mediante el uso de etanol. Dicho inconveniente pudo ser solucionado adicionando el detergente iónico bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), que capturó lípidos, polisacáridos, fenoles dejando libre a los ácidos nucleicos, de modo que los contaminantes permanecieron en la porción soluble, que luego son eliminados por lavado. A diferencia del kit comercial (QiAmp), el protocolo de Sweijd no permitió la recuperación de ADNs de pequeño tamaño, ya que no se logró detectar los genes *16S ADNr* bacteriano objetivo de este estudio. Posiblemente, el filtro que contienen las columnas del kit comercial, permitió la captación del ADN total de la muestra, recuperándose de una manera eficiente el ADN de menor tamaño. Dados los resultados de pureza y concentración, se utilizó en este trabajo de investigación, el protocolo de Sambrook *et al.*, 1989, para la extracción de ADN desde semillas y el kit QiAmp para muestras provenientes de juveniles y adultos.

Cabe destacar que dado el tamaño de las semillas, el ADN extraído correspondió al organismo completo, mientras que en juveniles y adultos se realizó efectivamente, la disección y el ADN procesado correspondió al del sistema gastrointestinal completo.

Comparación de tres métodos utilizados para determinar variación y composición de la microbiota asociada

En este trabajo de investigación se utilizaron tres métodos moleculares basados en la utilización de la detección de los genes *16S ARNr* para determinar la variación y composición de la microbiota, a saber: RFLP, TGGE y Pirosecuenciación.

El análisis de la variación de la microbiota según etapa de crecimiento y sitio de cultivo, fue realizado mediante RFLP y pirosecuenciación y los resultados obtenidos fueron muy comparables y similares entre ambos métodos (esto se discutirá en detalle más adelante). Dicha técnica, se implementó amplificando el gen *16S ARNr* de bacterias a partir del ADN de los tejidos de los ostiones, los cuales posteriormente, fueron cortados con una enzima de múltiple sitio de corte y los perfiles obtenidos fueron utilizados para realizar las comparaciones entre índices de similitud Dice (Cs). La técnica de RFLP, es de bajo costo, sencilla y rápida de realizar en cualquier laboratorio que cuente con

implementos básicos para hacer experimentos de biología molecular. Mientras que, la técnica de pirosecuenciación es más cara, porque requiere de reactivos de mayor costo (ej.: Taq polimerasa de alta fidelidad y *primers* de fusión específicos) y equipos con los que no cualquier laboratorio cuenta, sino al contrario, en la mayoría de los casos se deben contratar servicios de laboratorios externos. Por esta razón y sin lugar a dudas, en los casos en que únicamente se desee establecer diferencias entre una comunidad bacteriana el RFLP es una muy buena opción.

TGGE es un método de análisis molecular que permite separar fragmentos de ADN en función de sus diferencias de tamaño y composición de secuencia (Fromin *et al.*, 2002; Muyzer y Smalla, 1998). Los fragmentos de ADN son separados por su momento de desnaturalización (conversión del ADN de doble cadena en hebras simples) por la aplicación de un gradiente físico, la temperatura. Diferentes secuencias de nucleótidos, en fragmentos de ADN del mismo tamaño, darán lugar a diferentes posiciones en el gel (Beier *et al.*, 2008; Muyzer & Smalla, 1998). Las ventajas de la técnica de TGGE son múltiples, ya que permite investigar la diversidad de una población microbiana natural sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes, posibilita la identificación de los microorganismos hasta nivel de especie, es apta para el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, y permite comparar los perfiles de biodiversidad de la población evaluando diferencias espaciales y temporales en un determinado nicho ecológico, así como también el impacto producido por la introducción de agentes externos (Beier *et al.*, 2008; Fromin *et al.*, 2002; Muyzer y Smalla, 1998). Mediante la utilización de la técnica TGGE, se pretendió en este trabajo de investigación, establecer la composición de la comunidad bacteriana y sus diferencias según sitio de cultivo y etapa de crecimiento de los ostiones. Sin embargo, dicha técnica presentó varios inconvenientes que hicieron difícil cumplir dichos objetivos. Entre ellos se destacan: 1) falta de definición entre los perfiles de bandas obtenidos, lo que no permitió establecer similitudes o diferencias entre la composición de la microbiota de los organismos estudiados; 2) baja reproducibilidad; 3) fue requerida una gran cantidad de ADN amplificado para evidenciar las bandas, lo que hizo necesario realizar una PCR anidada; 4) existió gran cantidad de heterodupletes. Un serio problema que tiene el analizar la diversidad genética por métodos basados en PCR, es la potencial generación de artefactos durante la amplificación de mezclas de ADN usando primers universales (Acinas *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2002). Tales

artefactos se generan por errores de la Taq polimerasa y entre éstos se destacan la formación de quimeras (Wang & Wang, 1997) y heteroduplex (Qiu *et al.*, 2001; Speksnijder *et al.*, 2001). Existen varias maneras de evitar la aparición de dichos errores en la amplificación, entre ellos disminuir los ciclos de la PCR, re-amplificar los productos del PCR anidado, diluyendo el ADN y utilizando Taq polimerasa nueva y disminución de los tiempos de extensión, entre otros (Acinas *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2002). A pesar de que en este estudio se siguieron todas estas recomendaciones en la amplificación del gen *16S ARNr* presente en los ostreidos, no se pudo eliminar dichos errores y se identificaron varios OTUs que en realidad correspondían a heterodupletes y quimeras. Además, no permitió establecer claramente las diferencias entre perfiles según sitio de cultivo y etapa de crecimiento del ostión. No obstante, se pudo afortunadamente usando esta técnica, identificar la composición de las especies bacterianas más abundantes y representativas asociadas a *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis*.

La reciente introducción de la pirosecuenciación, ha permitido un avance importante en los estudios metagenómicos porque permite en un análisis rápido y exhaustivo de comunidades microbianas, usando el gen *16S ARNr* para identificar y establecer la composición de comunidades tomadas directamente de su entorno, eliminando la necesidad de aislar, cultivar o clonar (Acinas, 2007; Huse *et al.*, 2008; Margulis *et al.*, 2005; McHardy & Rigoutsos, 2007; Sogin *et al.*, 2006). Por esta razón, en este estudio se uso dicha técnica para conocer la estructura y diversidad de la comunidad procarionte asociada a *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* en semillas y adultos engordados en dos sitios diferentes. El análisis por pirosecuenciación de la librería genética bacteriana, permitió efectivamente, identificar detalladamente la composición de la comunidad asociada y sus diferencias según etapa de desarrollo y sitio de cultivo del ostión, datos que no se pudo obtener utilizando la técnica de TGGE. Se pudo establecer con buena resolución la composición de la comunidad, aunque con las limitaciones que posee el método de pirosecuenciación en cuanto a la asignación taxonómica. Se ha establecido, que uno de los inconvenientes más relevantes que posee esta metodología, es que no permite discriminar a nivel taxonómico más allá del género, incluso se ha demostrado en varios trabajos de investigación que dicha limitación de identificación taxonómica puede restringirse a nivel de Phylum (Acinas, 2007; Kim *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2008; Peressutti *et al.*, 2010; Sundquist *et al.*, 2007). Como se

puede observar en la figura 31, a medida que uno se va adentrando en la afiliación taxonómica menor es la capacidad de asignar un nombre a la secuencia obtenida por pirosecuenciación. De todas las secuencias obtenidas por pirosecuenciación entre un 85 y 98% de ellas fue posible asignar un phylum, mientras que para género los valores fueron muy dispares llegando a un 10 % para *C. sikamea* y un 68% para *C. gigas* cultivadas en Bahía Magdalena. A pesar de ello, en este trabajo de investigación, se pudo determinar la clasificación taxonómica a nivel de género bacteriano, con un rendimiento del 30% promedio. Se ha visto que un factor importante a considerar para evitar esta limitación en la clasificación taxonómica, es la elección de la región variable que se va utilizar para detectar el gen *16S ARNr* y también el tamaño de dicho amplicón (Liu *et al.*, 2008; Sundquist *et al.*, 2007; Tringe y Rubin, 2005). Se ha determinado que la región variable V3-V6 del gen *16S ARNr* que posee un tamaño de entre 500 y 600 pb, es suficiente para determinar correctamente las asignaciones taxonómicas mediante pirosecuenciación (Clarridge, 2004; Huse *et al.*, 2008; Janda & Abott, 2007; Soergel *et al.*, 2012; Sundquist *et al.*, 2007) y por tanto fue la utilizada en este estudio. Sin embargo, sería recomendable considerar en posteriores investigaciones que involucren esta técnica, la utilización de más de un tipo de *primer* de manera de aumentar significativamente el rendimiento (Soergel *et al.*, 2012).

Numerosos estudios han establecido la importancia de elegir una base de datos de secuencias del gen *16S ARNr* fiable para comparar la asignación taxonómica de los filotipos encontrados por pirosecuenciación (Huse *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Actualmente, existen varias bases de datos de secuencias de la SSU ribosomal (16S y 18S) disponibles para realizar este tipo de análisis y entre ellas se destacan: RDP (Ribosomal Data Project, Cole *et al.*, 2009), GreenGene (DeSantis *et al.*, 2006), SILVA data base Project (Pruesse *et al.*, 2007). La base de datos SILVA, incluye secuencias de los tres dominios (Bacteria, Arquea y Eucariotas), la asignación taxonómica incluye organismos no cultivables y utiliza el sistema ARB para identificar las secuencias (Prüebe *et al.*, 2007; Westream *et al.*, 2011). GAST, trabaja con secuencias cortas únicamente de la región V6, GreenGene, incluye secuencias de los tres dominios y utiliza la inferencia de múltiples alineamientos para establecer la taxonomía (Huse *et al.*, 2008). La base de datos considerada como estándar para análisis de comunidades procariontas, es el RDP. Está disponible vía web y acepta para el análisis secuencias cortas y largas, la asignación de secuencia se realiza mediante la comparación de la composición nucleotídica y las clasifica según la sistemática del manual Bergey, usando

el programa *Naive bayesian classifier* (Cole *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007). Dadas las características de las muestras que analizamos en este trabajo, se eligió a RDP como base de datos para realizar las asignaciones taxonómicas, en los casos que hubo dudas con la identificación taxonómica se recurrió a SILVA. Existe el suficiente consenso internacional de que BLAST, no es un buen sistema para realizar este tipo de análisis ya que presenta errores taxonómicos y las secuencias disponibles no tiene un control estricto de calidad (Essinger y Rosen, 2010; Huse *et al.*, 2008; Liu, *et al.*, 2008), por esta razón no fue utilizada en este estudio.

La comparación de las secuencias del gen *16S ARNr* permite la diferenciación entre organismos a nivel de género en todos los phylum principales de procariontas, además de clasificar las cepas en múltiples niveles, incluyendo lo que hoy conocemos como subespecie. A pesar del uso extensivo del gen *16S ARNr* para estudios metagenómicos, no se encontró en la literatura un consenso internacional sobre el criterio a utilizar para asignar un nivel taxonómico durante la comparación de una secuencia con otra disponible en una base de datos (Clarridge, 2004). Hay quienes estipulan que una similitud de secuencia $> 97\%$ representa una especie (Petti, 2007), mientras otros establecen que debe ser $> 99\%$ (Janda & Abbott, 2007). En este estudio se utilizó el criterio de asignación de secuencias SILVA, que define como phylum aquellas que tienen una homología de secuencia del $\geq 80\%$, Clase $\geq 85\%$, Orden $\geq 90\%$, familia $\geq 95\%$, Genero $\geq 97\%$ y Especie $\geq 99\%$.

Antes de ejecutar los análisis para determinar composición y diversidad de la microbiota bacteriana asociada a Ostreidos, se realizaron curvas de rarefacción para determinar si la muestra analizada por pirosecuenciación es representativa (Heck *et al.*, 1975; Hughes *et al.*, 2001; Magurran, 1998). Las curvas de rarefacción permiten determinar si se pueden hacer comparaciones del número de géneros entre comunidades cuando el tamaño de la muestra no es igual (Krebs, 1989; Magurran, 1998). Los resultados obtenidos para cada una de la especies de Ostreidos, muestran que el esfuerzo de muestreo fue el adecuado ya que en todos los casos se alcanza la asíntota, incluso mucho antes de que se alcance el máximo de muestras analizadas, como por ejemplo se observa para las semillas de las tres especies de ostiones (Fig. 32-34). Además se hallaron un elevado número de secuencias únicas o poco representadas (Tabla X), lo que indica una adecuada cobertura de muestreo para esta genotecas de secuencias (Acinas, 2007).

Para el caso de la librería genética de Arqueas, surgieron varios inconvenientes que no permitieron obtener buenos resultados. A pesar de que se realizó un análisis previo *in silico*, para seleccionar los mejores primers para generar la librería de amplicones, no fue posible detectar *in silico* la amplificación cruzada para el gen *28S ARNr* de moluscos bivalvos ostreidos que luego se observó en la pirosecuenciación. Además por el tamaño de dicho amplicón de 560 pb aproximadamente tampoco se observó en la electroforesis en gel ya que se enmascaró con nuestro amplicón de interés de 600 pb. Esto remarca la importancia de utilizar una buena base de datos de secuencia fiable (Huse *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008), ya que el análisis *in silico* se realizó usando BLAST donde este amplicón cruzado no se observó y por ello se eligió este par de primers. Sin embargo, si se hubiera realizado dicho análisis *in silico* usando una base de datos como SILVA este error se hubiera evitado. Por otro lado, a pesar de haber usado Taq polimerasa de alta fidelidad, un programa de PCR, ajustado para evitar amplicones inespecíficos esto no se pudo evitar ya que se observó gran cantidad de fragmentos pequeños que disminuyen mucho la eficiencia y rendimiento de la pirosecuenciación (Fig. 51-52). Estos inconvenientes, observados al momento de realizar la secuenciación, hacen que los resultados obtenidos en este estudio para la librería genética *16S ARNr* Arqueas, deban ser considerados como muy preliminares.

Similitud de la microbiota bacteriana asociada a semillas de Ostreidos

En la etapa de semilla la microbiota mostró una composición uniforme independiente del hospedero (*C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*), como lo muestran los resultados de perfiles similares obtenidos por RFLP y de la composición bacteriana obtenida por pirosecuenciación. Los análisis por PCA, muestran en todos los casos, un agrupamiento dado por la similitud entre los perfiles y composición de la comunidad bacteriana asociada a las semillas, sin importar de la especie de que se trate. Durante la producción artificial de larvas y semillas, las bacterias asociadas al alimento y las condiciones de producción controlada en el laboratorio, influyen en la composición de la microbiota (Avendaño & Riquelme, 1999; Avendaño *et al.*, 2001a & b, 2002; Gatesoupe, 1999; Tanaka *et al.*, 2004). Toda la semilla incluida en este estudio proviene del mismo laboratorio, donde las larvas fueron alimentadas con microalgas de cultivos controlados compuestos de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*, mantenidas bajo las mismas condiciones de temperatura y salinidad. Una vez concluido el periodo larvario y el proceso de fijación que conduce a la producción de pre-semillas de 500 micras, éstas

fueron pre engordadas con dietas de estas mismas algas cultivadas, pero en forma masiva y al medio externo. El cultivo de estas microalgas en los criaderos de moluscos, no es axénico, al contrario generalmente está acompañado por varias bacterias asociadas (Avendaño & Riquelme, 1999; Badillo-Salas *et al.*, 2009; Riquelme & Avendaño, 2003). Las microalgas, son un producto altamente nutritivo, muy útil como alimento de moluscos bivalvos ostreidos (Badillo-Salas *et al.*, 2009; Mazón-Suástegui *et al.*, 2009; Mazón-Suástegui *et al.*, 2008; Mueller-Feuga, 2000). Por lo tanto, cuando los ostiones se alimentan de microalgas, las bacterias asociadas pueden colonizar el tracto gastrointestinal tracto y pasar a formar parte de la microbiota. Se ha informado que los moluscos bivalvos que tienen dietas similares, proporcionan entornos similares para la colonización bacteriana gastrointestinal (Avendaño y Riquelme, 1999; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Harris, 1993; Riquelme & Avendaño, 2003). Esta condición puede explicar la alta similitud observada en la composición de la microbiota residente asociada a *C. corteziensis*, *C. sikamea* y *C. gigas*.

Las semillas mostraron una mayor diversidad y abundancia en la composición de la microbiota que la observada en adultos de la misma especie de ostión. Se ha reportado que el estado fisiológico, la etapa de vida y sobre todo la madurez del sistema gastrointestinal, pueden influir en la composición de la microbiota en organismos marinos, principalmente por la falta de una barrera que impida la colonización por parte de los microorganismos (Harris, 1993, Gatesoupe, 1999; Moriarty, 1990; Paillard *et al.*, 2004). Por ejemplo, en el camarón *Penaeus japonica*, se ha demostrado que existe un decrecimiento en la densidad y composición de las bacteria en el intestino a medida que se progresa del estado zoea a la postlarva (Harris, 1993). Este mismo comportamiento se ha visto en moluscos y peces (Denev *et al.*, 2009; Tinh *et al.*, 2008).

Por otro lado se ha sugerido que los adultos de diferentes especies de moluscos bivalvos, tienen una mayor capacidad para seleccionar el alimento y la microbiota asociada, que las larvas o post-larvas. Observaciones en especies de *Pecten maximus*, *Mercenaria mercenaria*, *Argopecten* sp. y *Crassostrea gigas* han mostrado que existe una selección del alimento ingerido, lo cual puede afectar la composición de la microbiota (Prieur, 1990, Ward *et al.* 1997). Esta capacidad de seleccionar los microorganismos ingeridos podría explicar en parte las diferencias en la cantidad de bacterias asociadas en semillas con respecto a los adultos. Así como también la encontrada mediante RFLP, entre juveniles y adultos de *C. gigas* y *C. sikamea*

engordados en un mismo sitio. Probablemente, el tiempo de estadía en cada sitio tenga una influencia importante, de tal manera que por ello se encontró que en Bahía Magdalena la población bacteriana asociada a las semillas era muy similar a la de los juveniles, mientras que no fue así con los adultos. Lamentablemente, los costos de la pirosecuenciación, no permitieron incluir organismos juveniles para determinar con exactitud las diferencias observadas.

Se debe considerar también, que otra posible explicación en las diferencias encontradas en la abundancia y diversidad de la microbiota en semillas con respecto a los adultos, se deban a que la muestra procesada fue diferente. A pesar de que todos los organismos fueron depurados, al momento de disecar fue imposible extraer el tracto gastrointestinal de las semillas, por lo que esta fue procesada entera. Recientemente, algunos autores han informado de la asociación de microorganismos en branquias y manto en especies de mejillones y ostreidos (Duperron et al, 2008a & b; Jensen *et al.*, 2010; Zurel *et al.*, 2011). Si existen bacterias asociadas a las branquias y manto de las semillas de los ostreidos analizados en este estudio y considerando que no hayan podido ser depuradas, es posible entonces que este factor influya en la sobrestimación de la diversidad y abundancia de bacterias en semillas comparada con la de adultos.

Variación de la microbiota bacteriana asociada a Ostreidos una vez incorporada la semilla en los diferentes sitios de cultivo.

Una vez obtenida la semilla, estas fueron llevadas a dos sitios de cultivo geográficamente diferentes, Bahía Magdalena (BM), que es uno de los ecosistemas con mayor biodiversidad y atractivo eco-turístico en el Estado de Baja California Sur y Bahía de Topolobampo (BT). El sitio de cultivo en BM, está en una zona conformada por numerosos esteros y canales someros bordeados por bosques de mangle, tiene bajo impacto de contaminantes o actividad antropogénica, pero está mayormente influenciado por las condiciones oceanográficas (Chávez, 2006; Acosta y Ruíz, 2007); mientras que, Bahía Topolobampo está conformada por lagunas con bocas relativamente amplias y permanentes, se encuentran fuertemente impactada por contaminantes ya que reciben las aguas residuales con nutrientes y plaguicidas provenientes de la principal área agrícola y acuícola del estado de Sinaloa (Páez *et al.*, 2002; Osuna y Riva, 2002; Montaña *et al.*, 2007).

Durante el cultivo de los organismos incluidos en este estudio, las condiciones de temperatura, salinidad y artes de cultivo (pre-engorda en canastas en líneas flotantes y engorda en camas ostrícolas), fueron muy similares. En la ostrícola localizada en Topolobampo existió un manejo menos periódico en la limpieza de los animales o en las condiciones de cultivo, porque se encontraron epibiontes adheridos a sus valvas. Sin embargo, se observaron diferencias en el crecimiento para la misma especie en diferentes localidades: *C. gigas* presentó mayor crecimiento en BM, mientras que *C. corteziensis* y *C. sikamea* tuvieron un mayor crecimiento en BT. Estas diferencias están respaldadas en que las condiciones ambientales del pacífico son más aptas para el crecimiento de *C. gigas* mientras que las otras dos especies de ostión crecen mejor en el golfo de California (Maeda, 2008).

Numerosos estudios han revelado, que las poblaciones bacterianas aisladas del tracto gastrointestinal de invertebrados acuáticos difieren en su composición si los organismos marinos provienen de hábitat diferentes (Harris, 1993; Hernández & Soto, 2006; Prieur *et al.*, 1990; Pujalte *et al.*, 1999). Otros estudios han indicado, que las condiciones ambientales afectan significativamente la microbiota de invertebrados marinos. Ostiones de una misma especie cultivados en el ambiente natural o criados en un laboratorio pueden tener comunidades bacterianas diferentes asociadas a su tracto gastrointestinal (Gatesoupe, 1999; Harris, 1993; Hernández y Soto, 2006; Prieur *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 2005). En el proceso de cultivo de organismos marinos, varios parámetros, como la salinidad, temperatura (Cook *et al.* 1998; DePaola *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2001), cantidad de nutrientes, disponibilidad del alimento y las condiciones de manejo de los animales durante su cultivo, hacinamiento, estrés (Colombo *et al.*, 1990; Lacoste *et al.*, 2001), pueden influir sobre la constitución de la biota gastrointestinal. Nuestros resultados, principalmente los obtenidos por RFLP y pirosecuenciación, muestran que la composición de la microbiota bacteriana asociada a *C. corteziensis* y *C. sikamea*, se vio influenciada por las condiciones de los sitios de cultivo. Claramente, la población bacteriana asociada a estas especies, fue diferente cuando los organismos fueron engordados en sitios distintos (BM y BT). En un mismo sitio de cultivo, los resultados de la pirosecuenciación muestran que *C. corteziensis* y *C. sikamea*, poseen una composición de la microbiota muy similar. Es importante mencionar, que en el caso de *C. corteziensis* la microbiota permaneció estable cuando fue trasplantada al sitio de engorda en Bahía Magdalena, ya que los resultados de RFLP

y PCA mostraron que la microbiota de semillas y juveniles fue muy similar. Este comportamiento no se observa en Bahía Topolobampo, lo que llama la atención ya que la temperatura tropical observada en este sitio de cultivo, favorece las condiciones de crecimiento de *C. corteziensis* (Chávez-Villalba *et al.*, 2005; Mazón-Suástegui *et al.* 2009 y 2011). Probablemente las condiciones en Bahía Magdalena, son similares a las del laboratorio de producción de semillas y por esa razón el impacto del trasplante sobre la microbiota fue menor en dicha localidad. Lamentablemente, contamos con datos limitados de los parámetros ambientales de los lugares utilizados para la engorda de los animales, que no son suficientes para establecer una relación con la composición de la microbiota. Sería interesante en trabajos posteriores, evaluar cómo influyen dichos parámetros sobre la población bacteriana asociada a estos ostiones.

Las diferencias encontradas en la composición de la comunidad bacteriana asociada a *C. corteziensis* y *C. sikamea* entre los sitios usados para la engorda (BM y BT), puede ser explicado por las características de cada sitio de cultivo. En particular las condiciones ambientales y de manejo del cultivo en Bahía Magdalena reflejan bajos niveles de contaminación y poca actividad antropogénica, lo que apoya la mayor estabilidad de la microbiota en este sitio de cultivo. En contraste, Bahía Topolobampo, es un sitio altamente impactado, donde las lagunas están contaminadas por la actividad agraria, acuícola e industrial (Osuna & Riva, 2002; Paez *et al.*, 2002). La riqueza de géneros encontrados en la microbiota de estas dos especies de ostreidos y la diversidad, estudiada mediante el uso de variados índices, muestran que la mayor diversidad se presentó en Bahía Topolobampo.

LaValley *et al.* (2009), estudiaron la composición de la microbiota asociada a *Crassostrea virginica* en diferentes localidades y encontraron, al igual que en nuestro estudio, que existía una similitud de la microbiota en organismos que habitaban un mismo lugar, mientras que era diferente entre localidades. Zurel *et al.* (2011), describen un comportamiento similar cuando estudiaron la composición de la población bacteriana asociada a las branquias de los ostiones *Chama savignyi* y *Chama pacífica*, que provienen de dos sitios geográficos diferentes. Ambos estudios coinciden además en que la microbiota asociada a los ostiones difiere de la encontrada en el ambiente marino de cada localidad. En nuestro trabajo, dicho análisis no fue posible de dilucidar, debido a que no se analizó la estructura de la comunidad bacteriana en el agua de mar, factor que en posteriores estudios debería ser considerado.

Variabilidad intraespecífica de la microbiota bacteriana asociada a *Crassostrea gigas*.

A pesar de que las condiciones de cultivo fueron idénticas para las tres especies de ostreidos, encontramos que la composición de la microbiota entre individuos (intraespecífica) de *C. gigas* fue variable. Esto se evidencia en las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos por RFLP para semillas de *C. corteziensis* y *C. gigas*. También fueron observados en cuanto a la composición de la microbiota asociada e identificada por pirosecuenciación. *C. gigas* fue la única especie de ostreidos donde no fue posible encontrar una clara asociación entre la composición de la comunidad bacteriana y el sitio de cultivo. De hecho en los resultados obtenidos por pirosecuenciación mostraron perfiles diferentes que los obtenidos para las otras dos especies de ostión. Las claras diferencias encontradas entre el comportamiento de la microbiota asociada entre *C. gigas*, *C. sikamea* y *C. corteziensis* puede explicarse en la distinta capacidad de filtración que tienen estos organismos (Harris, 1993; Prieur *et al.*, 1990). El ostión japonés ha superado a la producción de ostras nativas, porque presenta mayores tasas de filtración, sobre todo en los periodos de alta abundancia de alimento lo que favorece a su mayor crecimiento (Castillo-Durán *et al.*, 2010; Farías, 2008). Una diferencia en la capacidad de ingerir bacterias durante la respiración y alimentación por parte de *C. gigas*, podría explicar estas diferencias. Podría especularse además, que como el ostión japonés es una especie introducida, es más susceptible a ser colonizado por microorganismos diferentes y más diversos que el ostión del placer, especie nativa más adaptada a este ambiente. Se ha demostrado que las especies no nativas, poseen mayor susceptibilidad a la colonización por microorganismos que las especies locales (Andrews, 1980; Ruesink *et al.*, 2005). Sin embargo esto no explicaría las similitudes que tiene la microbiota bacteriana asociada a *C. corteziensis* con respecto a *C. sikamea*, especie también introducida.

Descripción de de la microbiota bacteriana asociada al tracto gastrointestinal de ostreidos y diferencias encontradas según etapa de crecimiento y sitio de cultivo.

En la literatura internacional, no se encontraron reportes que hagan un seguimiento de la microbiota asociada a los ostiones en sus diferentes etapas de crecimiento. Menos aún de aquellos que estudien los cambios de la microbiota en los organismos durante su proceso de cultivo, por lo tanto este trabajo constituye el primer reporte al respecto en Ostreidos. En términos generales la microbiota ha sido estudiada en los estadios

iniciales, larva y postlarva y por separado a la de adultos en el ambiente natural. Generalmente, los trabajos sobre microbiota en moluscos bivalvos hacen referencia al estado larval o postlarval y los cambios de la microbiota asociada en respuesta a la inoculación de probióticos en el alimento. Esto focalizado a generar avances sobre el éxito en la obtención de semillas en laboratorio y solucionar los problemas de pérdidas cuantiosas en la producción de las mismas, por aparición de enfermedades (Jorquera *et al.*, 2001; Kesakordi-Watson *et al.*, 2012; Riquelme *et al.*, 2000; Torkildsen *et al.*, 2005).

En adultos, la mayoría de los estudios están focalizados a realizar un análisis de la microbiota asociada a ostreidos enfermos, con el fin de establecer el microorganismo patógeno causante de la enfermedad (DePaola *et al.*, 2000; Prieur *et al.*, 1990; Richards *et al.*, 2008; Rippey, 1994). En muchos otros casos, ha sido estudiado el cambio de la microbiota según la aplicación de diferentes mecanismos de depuración y almacenamiento para su comercialización después de la cosecha (Cruz-Romero *et al.*, 2008; Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Son y Fleet, 1980; Tamplin y Capers, 1992; Vasconcelos & Lee, 1972).

Los resultados obtenidos por pirosecuenciación y TGGE, muestran que el phylum predominante durante todo el desarrollo en las tres especies de ostión fue, sin lugar a dudas las proteobacterias, resultados que además coinciden ampliamente con los anteriormente reportados para diferentes especies de Ostreidos, utilizando técnicas cultivo dependiente e independiente (Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Hernández y Olmos, 2006; Green & Barnes, 2010; Najjah *et al.*, 2008; Pujalte *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2002; Vasconcelos y Lee, 1972; Zurel *et al.*, 2011). Encontramos que existen diferencias en cuanto a la estructura de la comunidad Proteobacterias según la etapa de crecimiento y sitio de cultivo, aunque en todos los casos la presencia épsilon-proteobacterias fue la minoritaria al igual de lo que ya se ha reportado anteriormente (Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Hernández & Olmos, 2006; Green & Barnes, 2010; Najjah *et al.*, 2008; Pujalte *et al.*, 1999; Vasconcelos & Lee, 1972; Zurel *et al.*, 2011). Aunque Romero y colaboradores en el 2002, describen que Arcobacter una épsilon-Proteobacterias, es el microorganismo predominante y común en una especie chilena, *Ostrea chilensis*. En semillas la clase más abundante fue α -Proteobacterias seguido de las γ -Proteobacterias, mientras de β y δ estuvieron presentes pero en mucha menor

proporción. Estos resultados no pudieron ser comparados, porque no se encontró en la literatura descripciones detalladas de la microbiota bacteriana asociada a postlarvas de moluscos bivalvos y que hayan utilizado técnicas de cultivo independiente. Existen reportes donde se describe mediante el asilamiento bacteriano a especies de *Vibrio*, *Pseudomonas* como componentes de la microbiota asociada a larvas y postlarvas de *C. gigas* (Priour, 1990) y de *Argopecten purpuratus* (Avendaño *et al.*, 2001b).

La distribución de abundancias según clases de Proteobacterias fue variable en adultos, dependiendo del sitio de cultivo y especie de ostión de que se trate, no obstante, en general α y γ -Proteobacterias fue la más abundante. Estos resultados concuerdan en parte, con los descritos anteriormente en ostiones adultos donde la clase α -Proteobacterias es la dominante y más abundante (Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Green & Barner, 2010; Najiah *et al.*, 2008, Pujalte *et al.*, 1999; Zurel *et al.*, 2011) y en otros moluscos bivalvos (Duperron *et al.*, 2007). Hernández y Olmos en 2006, describieron que esta es la clase de Proteobacterias asociada a la glándula digestiva de *C. gigas*. Aunque en este estudio algunas variaciones fueron encontradas por ejemplo, la clase β -Proteobacterias fueron muy abundantes en *C. corteziensis* en ambos sitios de cultivo al igual que en la especie *C. gigas* engordada en Bahía Magdalena.

Estas diferencias detectadas al comparar las clases de Proteobacterias predominantes se vieron obviamente reflejadas en las diferencias en cuanto a géneros se refiere. Las semillas mostraron mayor riqueza y diversidad de géneros (se identificaron 37 en total) que la mostrada en adultos (14 en total), además de una mayor similitud entre las especies de ostiones analizadas. En las semillas los resultados de la pirosecuenciación mostraron que el género predominante fue *Neptuniibacter*, seguido de *Marinicella*, *Oceanicola* y *Rhodovulum*. Se detectó también el género *Burkholderia* al igual que lo que muestran los resultados del TGGE, sin embargo a diferencia de esta técnica, mediante pirosecuenciación se estableció que éste no es el género predominante. A excepción de los géneros, *Vibrio* spp., *Escherichia* sp. y *Maritalea* (Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Green & Barner, 2010; Najiah *et al.*, 2008, Pujalte *et al.*, 1999; Zurel *et al.*, 2011), la gran diversidad de géneros detectados en este estudio, no han sido reportados anteriormente en ostreidos. Esto último podría ser explicado por tres razones principales: 1) la falta de descripción de la microbiota asociada específicamente en semillas; 2) porque la mayoría de los trabajos reportados se basan en una descripción de

los pocos microorganismos que pudieron ser aislados mediante el cultivo. 3) Cuando se usan técnicas cultivo independiente, los autores hacen una descripción referida en términos generales a los phylum bacterianos encontrados; 4) la pirosecuenciación es una técnica de reciente creación y la información tan detallada que esta técnica permite entregar, no se ha usado aún para describir la microbiota en estos organismos.

En los adultos se observó una estructura diferente a la encontrada para las Proteobacterias en semillas, la diversidad fue mucho menor y mostró diferencias en cuanto a su composición según el sitio de engorda utilizado. En Bahía Magdalena, los géneros predominantes y que comparten las tres especies de ostreidos fueron *Burkholderia* y *Escherichia/Shigella*, aunque con diferencias en abundancias. El género *Delftia*, se encontró simultáneamente en *C. sikamea* y *C. corteziensis*, aunque esta última presentó además los géneros *Endozoicomonas* y *Aeromonas*. En *C. gigas* se detectó además la presencia de *Metylobacterium*, mediante pirosecuenciación y TGGE.

En los adultos engordados en Bahía Topolobampo, todas las especies de ostión compartieron la presencia de los géneros *Burkholderia*, *Escherichia/Shigella* y *Umboniibacter*. La presencia de *Pseudoalteromonas* y *Sphingomonas* se detectó en *C. corteziensis* y *C. sikamea*. En Bahía Topolobampo se observó una mayor diversidad que en Bahía Magdalena.

Al igual que lo ocurrido con las semillas, la descripción de los géneros relacionados a la microbiota residente, detectados por pirosecuenciación en estas especies de Ostreidos, es mayor a la reportada anteriormente, para especies similares de ostión. Gracias al uso de técnicas cultivo independientes la mayoría de los géneros identificados en la microbiota de ostiones adultos, ya han sido reportados anteriormente en *Crassostrea gigas* (Fernández-Piquer *et al.*, 2012) y otras especies como *Crassostrea iredale* (Green & Barnes, 2010), *Chama pacific* y *Chama savignyi* (Zurel *et al.*, 2011) y el mejillón *Bathymodiolus mussel* (Duperron *et al.*, 2007).

De igual modo a lo que informan Fernández-Piquer *et al.* (2012), Hernández & Olmos, 2006 y Zurel *et al.* (2011), los Bacteroidetes fueron detectados en los ostreidos estudiados. Sin embargo, la abundancia y diversidad encontrada fue mucho mayor en semillas que en adultos. Mientras en semillas se identificaron por pirosecuenciación 13 géneros distintos, en adultos solo se pudo identificar el género *Tenacibaculum*. La comunidad Bacteroidetes asociada a semillas fue muy similar entre las diferentes

especies de ostreidos. Los géneros más representativos y abundantes fueron *Lewinella*, *Tenacibaculum*, *Winogradskyella* y *Gilvibacter*, entre otros. La mayoría de los géneros identificados pertenecen a la clase Flavobacteria, datos comparables con los de Fernández-Piquer *et al.*, 2012 en adultos de *C. gigas*, investigación en donde se reportó, al igual que en este estudio una gran variedad de géneros asociados. Le siguen integrantes de la clase Sphingobacteria, específicamente los géneros *Ekhidna*, *Lewinella*, *Reichenbachiella* y *Roseivirga*, por último un único representante de la clase Bacteroidetes, el género *Marinifilum* (Ludwig *et al.*, 2008). A excepción de los géneros *Winogradskyella* y *Gilvibacter*, el resto de los identificados en este estudio no han sido reportados.

Representantes del phylum Actinobacteria fueron detectados en semillas y adultos, aunque en general, la abundancia fue mayor en adultos. A pesar de encontrarse por pirosecuenciación secuencias de esta phylum, en todas las especies de ostreidos sin importar etapa de crecimiento o sitio de cultivo, se pudieron identificar únicamente tres géneros: *Ilumatobacter* asociado únicamente a semillas de *C. corteziensis*; *Propionibacterium*, encontrado en abundancia asociada a los adultos de las tres especies de ostión y *Kocuria* presente únicamente en adultos de *C. gigas*. *Propionibacterium* fue detectado también mediante TGGE, en juveniles de *C. corteziensis*. Especies bacterianas pertenecientes a las Actinobacteria fueron detectados anteriormente en adultos de otras especies de ostreidos, si bien con diferencias en cuanto a los géneros identificados (Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Zurel *et al.*, 2011). *Propionibacterium* fue anteriormente reportado como integrante de la microbiota de *Saccostrea glomerata* en también en estado adulto (Green & Barnes, 2010).

También fueron detectados por pirosecuenciación y TGGE, integrantes del phylum Firmicutes, en todas las especies de ostreidos, en todos las etapas de crecimiento y en ambos sitios de cultivo. Especies bacterianas pertenecientes a este phylum, ya han sido descritas como miembros de la microbiota asociada a ostiones adultos (Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Green & Barnes, 2010; Hernández & Olmos, 2006; Pujalte *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2002; Zurel *et al.*, 2011). Sin embargo en nuestro estudio solo el género *Streptococcus* fue identificado en adultos de *C. gigas* mediante pirosecuenciación, mientras que el género *Bacillus* sp., pudo ser identificado por TGGE, en juveniles y adultos únicamente de *C. gigas*. En adultos de *Saccostrea glomerata* y *Ostrea edulis* y *C. gigas*, es el género *Bacillus* sp. el más frecuentemente detectado

(Green & Barnes, 2010; Hernández & Olmos, 2006). Específicamente, en el trabajo de Hernández y Olmos se explica que especies de *Bacillus* se adhieren a las branquias de *C. gigas* en estado adulto y recolectado en la costa oeste de México. Probablemente, la dificultad para identificar los géneros pertenecientes a el phylum Firmicutes detectados por pirosecuenciación, se deban a las limitaciones que este método posee en cuanto a la asignación taxonómica que ya fueron explicados anteriormente (Acinas, 2007; Kim *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2008; Peressutti *et al.*, 2010; Sundquist *et al.*, 2007).

Otro phylum detectado, aunque con diferencias en cuanto a abundancia, etapa de crecimiento, sitio de cultivo y especie de ostión, fue Fusobacteria. Al igual que lo ocurrido con los Firmicutes, pocas secuencias de las encontradas por pirosecuenciación pudieron ser identificadas. En semillas, se detectó el género *Fusobacterium*, mientras que en adultos fue *Psychrilyobacter*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Fernández-Piquer y colaboradores en 2012, quienes mediante la secuenciación de clonas del gen *16S ARNr* de adultos de *C. gigas*, detectaron estos mismos géneros bacterianos.

Las espiroquetas, han sido detectadas anteriormente en moluscos bivalvos, especialmente en ostiones (Margulis *et al.*, 1991; Tall & Naumann, 1981). Estas bacterias parecen formar parte importante de la microbiota de ostiones y está limitada a la colonización a los estilos cristalinos (barra de mucoproteínas de la glándula digestiva (Margulis *et al.*, 1991; Tall y Naumann, 1981). Sin embargo, la hipótesis de que espiroquetas asociadas al estilo cristalino juega un papel importante en el proceso de digestión enzimática extracelular de los moluscos bivalvos no ha sido probada hasta el momento (Husmann *et al.*, 2010). A pesar de los estudios que demuestran la importancia de este phylum bacteriano como componente de los ostreidos, en este trabajo de investigación, solo fueron detectadas en muy baja abundancia. Además las Spirochaetes fueron detectadas mediante la pirosecuenciación, particularmente asociadas a las semillas de *C. corteziensis* y *C. sikamea* y estuvieron ausentes en *C. gigas* y no fue posible a partir de dichas secuencias asignar un género. Mediante la técnica de TGGE, se detectó un OTU, que presentó una secuencia de 85% similitud con *Borrelia* spp y fue encontrado en juveniles de *C. corteziensis*. Aparentemente, en las especies de ostión incluidas en esta investigación, dicho phylum bacteriano no es un componente relevante como lo han reportado otros autores (Fernández-Piquer *et al.*, 2012; Green & Barnes, 2010; Margulis *et al.*, 1991; Tall & Naumann, 1981).

Nuestros resultados indican que existen otros Phylum minoritarios: Acidobacteria, Chloroflexi y Tenericutes. Se presentaron en muy baja abundancia y no se pudo establecer alguna relación con la etapa de crecimiento, sitio de cultivo o especie de ostión. De todos ellos, únicamente se pudo determinar un género, *Mycoplasma*, phylum Tenericutes, presente en adultos de *C. gigas*. Estos phylum ya han sido asociados a Ostreidos y a excepción de las acidobacterias que son microorganismos típicamente asociados al suelo (Kielak *et al.*, 2009; Quaiser *et al.*, 2003), los demás phylum se han reportado, aunque en baja abundancia, en ecosistemas marinos (Freitas *et al.*, 2012; Scmitt *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2011), particularmente en camarón (Chaiyapechara *et al.*, 2011) y esponjas (Taylor *et al.*, 2007). Gracias al uso de técnicas de biología molecular, Fernández-Piquer y colaboradores en 2012 encontraron, aunque en baja abundancia, especies bacterianas de los phylum Verrumicrobia, Tenericutes, entre ellos identificaron a *Mycoplasma*, asociados a *C. gigas* en estado adulto. Chloroflexi, fue reportado en Ostreidos por Green y Barnes (2010) y Zurel y colaboradores (2011), y como componente principal de la microbiota de esponjas por Schmitt *et al.* (2011).

En los últimos años, se ha descrito en comunidades microbianas marinas, que existen poblaciones de baja abundancia que representan la mayor parte de la diversidad observada (Acinas *et al.*, 2004; Sogin *et al.*, 2006). Estas comunidades bacterianas han sido detectadas gracias a la implementación de la pirosecuenciación como técnica para el estudio de ecosistemas microbianos. Acinas y colaboradores en 2004, denominaron este hallazgo, como microdiversidad, mientras Sogin y colaboradores en 2006 la describen como biosfera rara. Estos autores explican que en ambientes marinos hay un número relativamente pequeño de diferentes poblaciones bacterianas que dominan en la muestra, mientras que la microdiversidad está presente en menor número. Esta microdiversidad o microgrupo, no se explica por errores de PCR o por copias múltiples ribosomales y es independiente de la estrategia molecular utilizada (Acinas *et al.*, 2004; Acinas, 2007). En este trabajo de investigación, estos filotipos “raros”, fueron detectados en los phylum mencionados anteriormente y en la gran variabilidad encontrada en phylum más abundantes como por ejemplo proteobacterias, donde se observó una gran cantidad de géneros diferentes representados por muy pocas secuencias.

A pesar de que la composición de la microbiota asociada a las tres especies de ostreidos, mostró diferencias en cuanto a la composición según etapa de crecimiento y sitio usado

para su engorda, encontramos bacterias que se mantienen estables y son compartidas por todos los organismos. Bacterias como *Burkholderia* y *Escherichia/Shigella* se observaron fuertemente asociadas a *C. corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* durante todo el crecimiento del ostión y sin importar el lugar utilizado para su cultivo. El género *Burkholderia* fue el más abundante y fue identificada la especie involucrada, *Burkholderia cepacia* (Mahenthiralingam *et al.*, 2008), mediante secuenciación a partir de bandas cortadas del TGGE. Esta bacteria fue adquirida en los estadios larvarios y se mantuvo durante todo el crecimiento del ostión en ambas localidades de estudio, formando parte de la microbiota residente. Se mantuvo fuertemente asociada al tracto gastrointestinal, presumiblemente por algún atributo de dicha bacteria, tales como adhesión a la pared del intestino y no fue removida durante la depuración. No se vio influenciada o alterada por las condiciones de cultivo (alimento, temperatura, salinidad manejo de los organismos), lo que presumiblemente podría indicar que existe una asociación simbiótica entre ésta bacteria y su hospedador.

El género *Burkholderia*, es de relativa moderna descripción ya que por su estrecha relación fenotípica con las *Pseudomonas* eran clasificadas junto con ellas, hasta que análisis taxonómicos moleculares las colocaron dentro de un nuevo género (Yabuuchi *et al.*, 1992). Desde 1992, hasta la fecha numerosas especies han sido incorporadas, principalmente por los trabajos realizados por Peter Vandamme y colaboradores que en 1997, 2002 y 2003, redefinieron a este género. En las últimas dos décadas, numerosas investigaciones sobre *Burkholderia* la han relacionado a variados nichos ecológicos (Compant *et al.*, 2008). La plasticidad de su genoma y la capacidad de adaptarse rápidamente a cambios ambientales, le han permitido vivir en el suelo y asociadas a plantas (Brown y Balkwill, 2009; Estrada-DelosSantos *et al.*, 2001; Janssen, 2006, Salles *et al.*, 2002 y 2004), también en ambientes marinos (Coenye & Vandamme, 2003; Li *et al.*, 1999; Thompson y col, 2005), lagos e incluso dentro de los hospitales (Coenye & Vandamme, 2003). *Burkholderia cepacia* ya había sido aislada de la microbiota de *C. corteziensis*, por Campa y colaboradores en 2009. También se ha detectado, aunque en baja cantidad en el ostión del pacífico recolectado en Tasmania (Fernández-Piquer *et al.*, 2011) y en el tracto intestinal de camarón (Chaiyapechara *et al.*, 2011).

Algunas cepas del género *Burkholderia* han sido descritas como patógenos oportunistas que pueden causar enfermedades en humanos, animales y plantas, aunque en estas

últimas se ha visto muchas veces más efectos beneficiosos (Coenye y Vandamme, 2003; Valvano y col. 2005, 2006.). A pesar del gran interés por parte de los microbiólogos del estudio de *Burkholderia cepacia* por su rol patogénico (Coenye y Vandamme, 2003; Govan *et al.*, 1996; Mahenthiralingam *et al.*, 2008), varios otros han focalizado su interés en la capacidad de dicha bacteria por producir un gran número de metabolitos secundarios que inhiben a una amplia variedad de bacterias patógenas; tales sustancias antagonicas pueden ser antibióticos de amplio espectro o bacteriocinas (Fridlander *et al.*, 1993; Homma *et al.*, 2008; Saadoun & Hameed, 1999), productos del metabolismo como ácidos orgánicos y su uso en biorremediación de vertederos o suelos contaminados (Bhat *et al.*, 1994; Coenye y Vandamme, 2003; Govan *et al.*, 1996; Have & Reineke, 1993; Krumme *et al.*, 1993). Recientemente, Ángel Campa y colaboradores (2009), utilizaron como probiótico una cepa aislada desde *C. corteziensis* e identificada como *Burkholderia cepacia*, que presentaba efecto antagonico sobre cepas patógenas de (*Vibrio alginolyticus* y *V. harveyi*). Sería muy interesante, estudiar el posible rol benéfico que esta bacteria pudiera tener sobre la fisiología de los Ostreidos incluidos en este estudio. Quizás justamente su papel natural sea el de proteger a su hospedero de la colonización por microorganismos patógenos.

La otra bacteria encontrada en abundancia, detectada en semillas y adultos en las tres especies de ostreidos y en ambos sitios de cultivo fue el grupo *Escherichia/Shigella*. Estos dos géneros bacterianos no pueden ser diferenciados genéticamente debido a que poseen una similitud de secuencia del 99.8% y sólo pueden diferenciarse fenotípicamente (Clarridge, 2004; Janda & Abbott, 2007). Cabe destacar además que estos microorganismos no pudieron ser detectados mediante TGGE, probablemente debido a que el contenido de GC no lo permitió.

Innumerables estudios han reportado a *Escherichia coli* como bacteria asociada a moluscos bivalvos, especialmente ostreidos (Jones, 2008; Najiah *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011; Rose *et al.*, 2001; Rowse & Fleet, 1984; Thompson *et al.*, 2005). En menores ocasiones se ha detectado a *Shigella* en los tejidos de estos moluscos bivalvos (Rippey, 1994; Wittman & Flick, 1995). La mayoría de los autores consideran a *Escherichia* y *Shigella* como marcadores de contaminación fecal, relacionada fuertemente con localidades donde existe gran actividad antropogénica. A pesar de que no todas las cepas de *Escherichia coli* son patógenas para los humanos, su presencia en

los ostiones se relaciona indefectiblemente, como potencial causal de gastroenteritis y su impacto en salud pública (Jones, 2008; Najiah *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2005). Sin embargo, en este trabajo se encontró *Escherichia/Shigella* en semillas que fueron producidas en laboratorio bajo condiciones estrictamente controladas, lo que indica que esta bacteria se fijó en estadios tempranos del desarrollo de los ostiones y se mantuvo asociada hasta la etapa adulta. No se observaron diferencias claras en ostiones engordados en Bahía Topolobampo donde la actividad humana y contaminación es mucho mayor que en Bahía Magdalena. En algunas especies de ostión la abundancia relativa de *Escherichia/Shigella*, fue un poco mayor en Bahía Topolobampo, para *C. gigas* y *C. corteziensis*, mientras que en *C. sikamea* fue menor que la presentada en Bahía Magdalena. Desafortunadamente en este estudio, no se consideró determinar la composición del agua de mar donde estos ostiones fueron cultivados, datos que podrían ayudar a esclarecer este punto a pesar de que *Escherichia coli* es fácilmente eliminada durante el proceso de depuración (Najiah *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011; Rowse y Fleet, 1984), esto no fue posible en nuestros organismos. Las diferencias entre abundancia relativa de *Escherichia/Shigella*, de las muestras depuradas y no depuradas fue muy variable. Por ejemplo en *C. sikamea* no hubieron diferencias significativas entre los organismo depurados y los no depurados. Sin embargo, en *C. gigas* y *C. corteziensis* las abundancias relativas de estos géneros, dentro del Phylum Proteobacteria, fue de un máximo del 10 % en animales depurados, mientras que en organismos no depurados fue de entre un 40 a 60 %. Especies como *Salmonella* (Asakura *et al.*, 2002) y *Campylobacter* (Endtz *et al.*, 1997; Cappelier *et al.*, 1999), han sido detectados en ambientes donde no existe actividad ni contaminación humana, y actualmente son consideradas como parte de la microbiota normal de estos animales marinos. *E. coli* y *Shigella* no han sido reportado hasta el momento, como causante de enfermedades infecciosas en ostreidos (Paillard, *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005). Existe la incógnita, no resuelta en este trabajo, de la verdadera razón de la presencia de *Escherichia/Shigella* en estos ostreidos, ¿si serán componentes naturales en estos animales o simplemente están de paso por su tracto gastrointestinal debido a que existe contaminación fecal en los sitios de engorda?

Un microorganismo que llama la atención es *Propionibacterium*, el cual fue detectado en la etapa adulta de las tres especies de ostreidos y fue el género detectado más abundante dentro de las actinobacterias. Anteriormente, esta bacteria fue identificada

por Green y Barnes en el 2010, asociada a *S. glomerata*. Actinobacteria, son un grupo bacteriano Gram positivo, que en los últimos años ha adquirido relevancia porque se han encontrado en gran cantidad en ambientes acuáticos dulces y salados y por su uso biotecnológico, principalmente en la producción de quesos (Gontnag *et al.*, 2007; Ventura *et al.*, 2007). Entonces, probablemente, esta bacteria se encuentra en el ambiente marino donde se cultivaron estos ostiones y fue adquirida durante el proceso de engorda en ambos sitios de cultivo de juveniles y adultos. No obstante, cabe destacar que el género *Propionibacterium*, comúnmente se ha asociado como integrante de la microbiota cutánea en humanos, donde generalmente es un comensal inocuo (Ventura *et al.*, 2007). Bajo determinadas ocasiones, la especie *Propionibacterium acné*, se comporta como patógeno oportunista. En el trabajo de Green y Barnes (2010), la Actinobacteria, fue identificada mediante secuenciación, precisamente como *Propionibacterium acne*, dichos autores no explican dicho hallazgo.

Sería interesante determinar, mediante aislamiento bacteriano, cual es la especie asociada a los adultos de los ostiones estudiados aquí y su posible rol.

Vibrio y *Pseudomonas* son los géneros por excelencia asociados a la microbiota de ostreidos y moluscos bivalvos en general y se reconocen como simbioses marinos (Harris, 1993; Najjah *et al.*, 2008; Prieur *et al.*, 1990; Pujalte *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2004 a y b). No obstante, en este estudio, se detectaron Vibrios en baja abundancia y únicamente en la etapa de semilla de las tres especies de ostreidos. Las *Pseudomonas* fueron detectada también en muy baja abundancia en semillas de *C. corteziensis* y *C. sikamea* y en adultos de *C. gigas*. Tampoco fueron detectados estos microorganismos en los ostiones no depurados.

Tradicionalmente, los reportes de especies de estos géneros asociados a moluscos bivalvos, se ha realizado mediante el aislamiento, en medios de cultivo selectivos, a partir de tejidos de ostiones enfermos, esto último dado por la importancia de estas bacterias como posible agente infeccioso (DePaola *et al.*, 2000 y 2003; Paillard *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004 a y b). Se ha demostrado que la distribución de los Vibrios suele ser estacional con picos de abundancia que dependen de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura en el sitio de cultivo (DePaola *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004 a y b). Los ostiones recolectados para este estudio provenían de sitios de cultivo de agua caliente, condición que favorece la presencia de especies de *Vibrio* y además eran animales que no presentaron evidencia de infección.

En años recientes, algunos autores han sugerido que el *Vibrio* no necesariamente es predominante en la microbiota de la ostiones sanos (Avendaño *et al.*, 2001; Green & Barnes, 2010; Li *et al.*, 2010).

Diferencias entre la microbiota bacteriana asociada a organismos depurados y no depurados: descripción de la posible microbiota residente y transiente

La microbiota residente, constituye una comunidad bacteriana que ocupa permanentemente el intestino y no se elimina con la materia fecal, presumiblemente debido a que poseen atributos, como la adhesión a la pared intestinal que impiden su expulsión (Berg, 1996; Harris, 1993; Prieur, 1990). Bajo esta premisa, en este trabajo de investigación se depuraron los ostiones para barrer aquellas bacterias que no tiene la capacidad de mantenerse en el tracto gastrointestinal considerada como la microbiota transitoria y por tanto detectar las residentes. La eficiencia en la depuración está principalmente relacionada con el tamaño del bivalvo, actividad en la filtración, condiciones fisiológicas, temperatura y salinidad que se ocupa en el proceso (Jones *et al.*, 1991; Richards, 1988). En este estudio para realizar la depuración, los ostiones se mantuvieron en condiciones estables de temperatura y salinidad similar al ambiente de donde provenían, oxigenación constante para impedir la muerte y por tanto la putrefacción que pudiera alterar la microbiota bacteriana presente. La depuración se realizó durante 72 hrs, utilizando dos veces al día recambios del agua de mar previamente esterilizada. Posteriormente se realizó la disección del tracto gastrointestinal y se determinó la composición de la comunidad microbiana.

Nuestros resultados indican que existen diferencias claras, en cuanto a la composición de las muestras depuradas de las no depuradas. Particularmente, una de las diferencias que destacan, es la gran abundancia de Cianobacterias y microalgas en los ostiones no depurados, lo que indicaría que esta comunidad bacteriana es transiente. Las tres especies de ostión fueron capaces de ingerir dichas cianobacterias y estas se alojaron en el tracto gastrointestinal. Todos los ostiones no depurados mostraron una gran similitud en cuanto a la composición de su microbiota bacteriana, con pequeñas variaciones en abundancia de los microorganismos. El grupo principal encontrado fue la división GpIIa, seguido con menores abundancias por Bacillariophyta y Chlorophyta, en casos escasos se encontraron representantes de la división GpIV. Las cianobacterias habitan ambientes marinos y de agua dulce, además forman asociaciones simbióticas con

animales y plantas (Skulberg & Utkilen, 1999). Green y Barnes, 2010, describen la presencia de cianobacterias dentro de la glándula digestiva de *S. glomerata* y postulan que están asociadas a la microbiota natural de la glándula implicada en la digestión. Este tipo de asociación se ha descrito también en el camarón, *P. monodon* (Chaiyapechara *et al.*, 2011) y en esponjas (Charpy *et al.*, 2012). En estas últimas, los autores describen la asociación simbiótica entre las especies *Synechococcus* y *Prochlorococcus* y la esponja. Sin embargo este tipo de asociación simbiótica no parece estar presentes en los ostreidos aquí estudiados, ya que las cianobacterias fueron removidas en casi todos los casos por completo, entonces cabe preguntarse ¿qué están haciendo allí?. La alimentación por filtración, parece ser la vía más importante de exposición de la los animales acuáticos a las cianobacterias (Ibening & Haven, 2010). Las floraciones de microalgas, también conocidas como “blooms”, son eventos de multiplicación y acumulación de estos organismos planctónicos en períodos de horas a días. Son fenómenos naturales que ocurren ante determinadas condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de unas especies más que otras. El importante incremento en la frecuencia de aparición y duración de estos fenómenos a escala mundial está fuertemente asociado al incremento de las condiciones de eutrofización (alto contenido de nutrientes) de los cuerpos de agua (Hallegraeff, 1992; Paerl, 1996). Las floraciones de particularmente de Bacillariophyta y Chlorophyta, son una consecuencia del aumento de nutrientes, particularmente nitratos y fosforo. Algunas cianobacterias sintetizan metabolitos secundarios que tienen efectos tóxicos sobre la biota (Chorus & Bartram, 1999). Estos metabolitos tóxicos, denominados genéricamente cianotoxinas, comprenden un variado grupo de moléculas de diferentes características: neurotoxinas, dermatotoxinas, gastrotoxinas y hepatotoxinas. En el hombre pueden causar desde ligeros malestares digestivos hasta muerte por asfixia o deshidratación (Falconer, 1999; Sivonen, 1996). Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran que los bivalvos son bastante resistentes a diferentes toxinas de cianobacterias y esto ha sido demostrado en mejillones, ostiones y almejas (Ibeling & Haves, 2011; Vasconelos, 2001). La mayoría de los estudios relacionados con la presencia de cianobacterias en moluscos bivalvos Ostreidos están enfocados en la posible acumulación de estas toxinas, debido a su potencial riesgo de transporte vectorial a los depredadores, particularmente al hombre (Vasconcellos, 2001). Sin embargo, la mayoría de los reportes apuntan a que las

cianobacterias son rápidamente removidas de los tejidos de estos moluscos (Ibeling & Haves, 2011; Vasconelos, 2001).

Las cianobacterias son un componente importante del fitoplancton y algunos autores señalan que pueden ser usadas como una fuente de alimento por las larvas de bivalvos en su hábitat natural. Estas bacterias tienen una notable capacidad de almacenar nutrientes esenciales y metabolitos dentro de su citoplasma (Skulberg & Utkilen, 1999). Se ha demostrado en experimentos de laboratorio, que estas bacterias pueden ser ingeridas por las larvas de *Crassostrea virginica* y la almeja *Mercenaria mercenaria* (Baldwin 1995; Baldwin & Newell, 1991; Gallager *et al.*, 1994; Raby *et al.*, 1997).

Por las razones anteriormente mencionadas, y dada la escasa información existente sobre la presencia natural de cianobacterias en el tracto gastrointestinal de ostreidos sería interesante abordar estos puntos en futuras investigaciones.

Por otro lado, debemos destacar que se observaron otras diferencias en cuanto a la composición de la microbiota asociada a ostreidos depurados y no depurados, que nos ayudaron a plantear la hipótesis de la existencia clara de microbiota transiente y residente. Un ejemplo de ello es lo recientemente abordado sobre la presencia de cianobacterias en gran abundancia en ostiones no depurados que probablemente no se fijaron al tracto gastrointestinal y fueron eliminados durante el proceso de depuración o fueron rápidamente digeridos. Esto se observó también con la Actinobacteria *Illumatobacter*, bacteria que a diferencia de *Propionibacterium* (muy abundante en adultos de las tres especies de ostión) fue removida durante la depuración. Lo mismo sucedió con *Stenotrophomonas*, bacteria abundante en ostiones depurados pero ausente en aquellos que no lo fueron.

La presencia de bacterias que fueron comunes a todos los ostiones como *Burkholderia*, *Escherichia /Shigella*, *Propionibacterium* y *Pseudomonas*, estuvieron presentes en abundancias similares tanto en muestras depuradas como no depuradas. Esto indica que durante el proceso de depuración no hubo gran alteración de la microbiota natural presente en los ostreidos y que estas bacterias podrían ser consideradas como residentes. La presencia de bacterias en muestras no depuradas fue escasa y se restringió a los géneros *Delfia* y *Sphingomonas*, presentes solamente en *C. corteziensis* y *C. gigas*. Quizás estas bacterias fueron detectadas porque aumentó su abundancia debido a una mayor proliferación en el proceso dadas las condiciones en la depuración.

Bacterias patógenas asociadas a la microbiota residente de los Ostreidos

Un factor restrictivo para el desarrollo sostenible de la ostricultura es la presencia de enfermedades bacterianas generadas principalmente, por bacterias oportunistas asociadas a la microbiota. Cuando los organismos de cultivo están expuestos a un estrés provocado por: malas condiciones de calidad ambiental, altas densidades de siembra, alimentación inadecuada o malas técnicas de gestión; se genera un desequilibrio fisiológico y ecológico en los animales, causando mortalidades masivas (Ruangpan y Kitao, 1991; Lafferty *et al.*, 2004). En los últimos años se ha reportado el impacto de las enfermedades en ostras y su repercusión en el decline de las poblaciones naturales y del éxito técnico-económico de la ostricultura (Wittman & Flick, 1995; Lafferty *et al.*, 2004). Revisando la literatura internacional, se puede observar que las bacterias son las que provocan mayores índices de mortandad en Ostreidos y que en muchos casos, pueden provocar la pérdida completa del lote de producción anual en un día (Boettcher *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2008; Lafferty *et al.*, 2004). Además, las infecciones bacterianas pueden afectar indistintamente a larvas, juveniles y adultos (Garnier *et al.*, 2007; Lafferty *et al.*, 2004). Las infecciones causadas por consumo de alimentos contaminados son la mayor causa de hospitalización y morbilidad a nivel mundial y las ostras son las que ocupan el primer lugar como organismos transmisores de agentes infecciosos (Rippey, 1994; Wittman y Flick, 1995; Boettcher y col., 2000; Lafferty y col., 2004; Potasman *et al.*, 2002; Thompson y col., 2005). El tracto gastrointestinal de los animales y en particular, las ostras son el hábitat natural de una gran diversidad de organismos y un amplio rango de ellos están relacionados con bacterias patógenas (Schulze *et al.*, 2006; Spite *et al.*, 2000).

Numerosos estudios han demostrado que las bacterias potencialmente patógenas no siempre son eficientemente eliminadas en el proceso de depuración de moluscos bivalvos (Oliveira *et al.*, 2011; Rippey, 1994; Scott, 1994; Soon y Fleet, 1980; Tamplin & Capers, 1992; Wittman y Flick, 1995) y este estudio no es la excepción. A pesar de que los organismo fueron depurados y no presentaban evidencia alguna de infección, se encontraron varias bacterias con potencial patógeno, asociadas a la microbiota residente: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Chlamydia*, *Escherichia*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Streptococcus* y *Vibrio*. Dentro de estas, destaca la gran abundancia de Clamidias, encontradas únicamente el *Crassostrea sikamea*. Estas fueron detectadas en baja abundancia en semillas, sin embargo su cantidad aumentó de

forma significativa en adultos engordados en ambos sitios de cultivo. Los microorganismos tipo Clamidias han sido reportadas por varios autores, como parásitos de un diverso grupo de moluscos bivalvos, sin embargo a pesar de que se han descrito lesiones a nivel epitelial, los reportes por mortalidades en cultivo de adultos bivalvos son escasos (Johnson & Le Pennec, 1995; Renault y Cochenec, 1995; Paillard, 2004; Romalde y Barja, 2010). La infección intracitoplasmática por organismos tipo Clamidias se han detectado en el epitelio de sifón, branquias y manto de individuos adultos de *C. gigas*, *Argopecten irradians* y *Pecten máximos* (Paillard, 2004; Renault & Cochenec, 1995), mientras que en *Loripes lucinali* se hallaron en el epitelio de la glándula digestiva (Johnson & Le Pennec, 1995). Nuestro hallazgo sería el primer reporte de microorganismos tipo Clamidia asociada al tracto gastrointestinal de semillas y adultos de *C. sikamea*. Sería interesante determinar cuál es la naturaleza de esta asociación, debido a que en nuestro caso no se evidenció presencia de lesiones y no existió mortalidad a pesar de la gran abundancia de estas bacterias. Análisis histológicos o de FISH (Hibridación in situ usando fluorescencia), pueden ayudar a para determinar la localización específica de estos microorganismos potencialmente patógenos. Es de gran importancia determinar además el potencial impacto de estos agentes infecciosos en ostreidos y/o potencial riesgo para los humanos al consumir estos ostiones contaminados.

Existen numerosas etapas críticas que impiden a los acuicultores lograr un completo éxito en la producción de semillas. Una de estas etapas es el traspaso de las post-larvas al medio natural, ya que durante este período se produce un significativo descenso en el número de post-larvas. En este contexto diversos son los factores que provocan la mortalidad de moluscos bivalvos en el medio ambiente, entre ellos se encuentran la cantidad y calidad del alimento, aparición de microorganismos patógenos, cambios en los factores abióticos y condiciones locales de las corrientes (Avendaño *et al.*, 2001; Romalde & Borja, 2010). Varios autores han declarado que el estado larval y postlarval es más susceptible a la infección por potenciales patógenos (Romalde y Batja, 2010). Nuestros resultados indican que en el estado de semilla se encontró más cantidad de microorganismos potencialmente patógenos, factor que puede ser limitante en la producción a nivel de cultivo de estos organismos. Especies de *Vibrio*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Alteromonas*, se encontraron asociadas a las semillas de las tres especies de ostreidos incluidos en este estudio. Estos organismos

comúnmente asociados con el sedimento marino, miembros por ejemplo del género *Vibrio* y *Aeromonas* (Dumontet *et al.*, 2000), se han encontrado albergando estos animales, causando además evidentes mortalidades principalmente en larvas (Romalde & Barja, 2010). Especies consideradas como contaminación fecal (e.g., *Escherichia* y *Shigella*) son reconocidas como contaminantes de estos animales marinos y como una importante causa de los brotes asociados al consumo de alimentos (Feldhusen, 2000; Grimes *et al.*, 1986; Paillard *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005). Subsecuentes publicaciones han documentado la patogenia de las vibriosis y su relevante importancia en los decaimientos de la producción de adultos y semillas de moluscos bivalvos, especialmente en ostiones (Brown 1973, Elston & Leibovitz, 1980, Elston *et al.*, 1981, Elston, 1993; Elston *et al.*, 2008; Hasegawa y col., 2008, Thompson y col., 2004). La vibriosis es una enfermedad oportunista que afecta a larvas de varias especies de moluscos bivalvos, ha sido observada y estudiada en laboratorios de producción de semilla y por lo general está relacionada con un manejo inadecuado de los organismos (Elston, 1993; Romalde & Barja, 2010). Las distintas especies de *Vibrio* son habitantes naturales del ambiente acuático y la mayoría de las infecciones se deben al contacto con este ambiente o a la ingestión de alimentos del mar (Borroto, 1998; Kelly *et al.*, 1991; Rippey, 1994; Potasman *et al.*, 2002; Scott, 1994). La mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* o *Vibrio vulnificus* (Dalsgaard, 1998; Oliver & Kaper, 1997; Potasman *et al.*, 2002; Thompson y col., 2004). Hasta la fecha, la enfermedad de *V. vulnificus* asociada a los mariscos se ha vinculado casi exclusivamente a ostreidos (Dalsgaard *et al.*, 2001; Oliver & Koper, 1997, Thompson ket al., 2004).

Las infecciones por miembros de los géneros *Mycoplasma* se han descrito en una variedad de moluscos bivalvos adultos, tales como ostiones, vieiras, almeja, mejillón, y berberecho (Elston 1986; Renault & Cochenec, 1995; Paillard *et al.*, 2004; Romalde & Barja, 2010). Son considerados patógenos potenciales y se ha descrito daño tisular en su hospedero, además de eventos de mortalidad asociado a la infección por estos microorganismos. El grupo *Mycobacterium* está representado con varios patógenos humanos, incluyendo agentes de la tuberculosis, enfermedades de la piel y una creciente diversidad de patógenos en peces y otros animales marinos, que pueden transmitir dicho patógeno a humanos (Thompson *et al.*, 2005). Por esta razón, tiene relevancia el

hallazgo encontrado en este estudio de *Mycoplasma* como componente de la microbiota residente en adultos de *C. gigas*.

Composición de la comunidad Arquea asociada a ostreidos

Como se dijo anteriormente, tuvimos varios inconvenientes para pirosecuenciar la librería de amplicones de Arqueas, por lo que los resultados aquí expuestos deben tomarse como resultados muy preliminares y que no permiten concluir sobre la microbiota Arquea asociada a estos organismos marinos.

Todas las secuencias obtenidas, pertenecieron al grupo Euryarchaeota, dentro del cual se identificaron dos géneros *Haloarcula* y *Halobacterium*. El orden Halobacteriales, consta de un amplio grupo de microorganismos aeróbicos que viven y crecen en ambientes hipersalinos como el Gran Lago Salado y el Mar Muerto (Girard, 2006), son colectivamente considerados como halófilos extremos. El género *Halobacterium*, comprende células móviles, de respiración aeróbica, crecen en a temperaturas entre 15-55°C, halófilos extremos, quimiorganotróficos, requieren aminoácidos para su crecimiento y muchos presentan actividad proteolítica (Oren *et al.*, 2009). El género *Haloarcula*, comprende células móviles y no móviles, halófilos extremos, son de respiración aeróbica, alguno son anaerobios en presencia de nitratos, crecen en a temperaturas entre 20-55°C, son quimiorganotróficos, no requieren aminoácidos para su crecimiento (Oren *et al.*, 2009).

Los dos géneros encontrados en este estudio como parte de la población asociada a Ostreidos, son descritos como halófilos extremos, es decir necesitan para desarrollarse concentraciones de sal por lo menos 10 veces mayores que las del agua de mar. Por esta razón, su presencia dentro del tracto gastrointestinal de los ostiones es sorprendente, debido a que las condiciones no están dadas para el establecimiento de dichas arqueas en estos tejidos. A pesar de que la literatura pertinente sobre Arqueas asociada a organismos marinos, es prácticamente escasa (Taylor *et al.*, 2007), Van Deer Maarel y colaboradores, en el año 1998, describen a *Halobacterium halobium*, como parte de la microbiota asociada a peces. Sin embargo, estos autores no explican el porqué dicha asociación. La naturaleza exacta del porqué existen arqueas asociadas a organismos marinos sigue siendo desconocida y para ello nuevos estudios deben ser desarrollados para esclarecer esta incógnita. Se deberá además, disponer de medios de cultivo que permitan aislar dichos microorganismos.

Consideraciones finales: Posible rol de la microbiota residente asociada a estos ostreidos y perspectivas futuras.

Este trabajo de investigación permitió describir por primera vez, la comunidad bacteriana asociada a *C. corteziensis* y *C. sikamea*, especies de alto valor comercial regional y además, estudiar al detalle la composición de la microbiota asociada a *C. gigas* una especie de importancia comercial mundial. A diferencia de otros estudios, se trabajó con animales que no presentaban signos de infección y que fueron depurados y no depurados, lo que permitió determinar las poblaciones bacterianas naturales asociadas a estos animales y además establecer alcances preliminares sobre la posible microbiota residente y transitoria.

En general la mayoría de los reportes anteriores sobre microbiota asociada a ostreidos se limitan a establecer en rasgos muy generales la comunidad bacteriana natural en homogenados tisulares de estos animales, lo que no permite establecer si estas son transitorias o residentes y la localización tisular de la microbiota. Nosotros aquí, estudiamos la microbiota residente en el tracto gastrointestinal de estos moluscos y establecimos de forma preliminar algunas diferencias en cuanto a la microbiota residente y transitoria en el tracto gastrointestinal. No obstante, dados algunos reportes que señalan la presencia de simbioses en branquias, sería interesante analizar los aspectos relacionados con la posible ubicación de estas bacterias residentes en otros tejidos y particularmente compartimentar el trato gastrointestinal para determinar la localización bacteriana específica dentro del tracto gastrointestinal.

La composición de la microbiota intestinal en el huésped es de gran interés en la acuicultura, en particular cuando hay bajas en la productividad y/o pérdidas por mortalidades masivas causadas por microorganismo oportunistas asociados a dicha microbiota, sin embargo escasos son los estudios de la microbiota normal en organismos sanos. Mediante las metodologías utilizadas, especialmente la pirosecuenciación y el RFLP, se logró establecer diferencias de la microbiota en distintas etapas de crecimiento del ostión y particularmente realizar el primer reporte sobre los cambios que sufre la microbiota asociada una vez incorporada la semilla en el sitio de cultivo en el ambiente natural.

Además al igual que otros reportes se estableció aquí la particular dependencia de la composición de la microbiota con las condiciones ambientales y del manejo del sitio

usado para la engorda de estos moluscos, situación que está relacionada con el flujo de agua que pasa por el tracto digestivo de estos organismos. No obstante, falta esclarecer cuales condiciones abióticas, temperatura, salinidad, impacto de corrientes y características concernientes al manejo en el sitio de cultivo, como el estrés causado por mala manipulación, hacinamiento, calidad del alimento entre otros, afectan a la microbiota y en qué medida. Una limitante de este estudio fue no considerar esos parámetros y principalmente no haber tenido muestras de agua que permitieran establecer diferencias o similitudes entre la comunidad bacteriana presente en el agua y la que finalmente forma parte de la microbiota del ostión

La colonización del sistema digestivo de animales marinos por microorganismos se ve influenciado por una serie de factores algunos relacionados con el huésped y otro con factores externos. En este estudio pudimos observar, que los factores aportados por el huésped pueden tener un importante rol sobre la composición de la microbiota, ya que a pesar de estar todos los ostiones bajo las mismas condiciones, se observaron diferencias en la población bacteriana asociada según la especie de ostión involucrada. Particularmente, esto fue observado en *Crassostrea gigas*, quien presentó una variabilidad intraespecífica muy grande. Las razones que explican dicha variación quedan aún por resolver.

La técnica de pirosecuenciación permitió tener conocimiento detallado de la comunidad bacteriana presente en estos ostiones, que demostró ser muy diversa y compleja y además detectar microorganismos nunca antes reportados en asociación con ostreidos. Se observó una gran diversidad de géneros bacterianos involucrados particularmente en las semillas.

La estabilidad de la microbiota asociada en estos ostiones parece ser multifactorial y depender de la variabilidad genética del hospedador, susceptibilidad a la colonización, capacidad de filtración e historia de adaptación al ambiente de cultivo. Pero a pesar de las diferencias encontradas, existen determinados phylum comunes a todos los ostreidos que son obviamente los más importantes en el ambiente marino (Gioannoni, 2004). Si hacemos un análisis de los estudios publicados recientemente y que utilizan técnicas cultivo independiente para determinar composición de la microbiota, podemos observar que en general coinciden en los phylum que han mostrado estar asociados a estos organismos marinos (ver Tabla XVIII). Proteobacterias, Bacteroidetes, Fusobacteria y

Actinobacteria, se describen como poblaciones bacterianas comunes en los moluscos bivalvos ostreidos.

En el año 1993, Jean Harris en una revisión realizada sobre la microbiota asociada a invertebrados marinos opinaba casi textualmente lo siguiente, “hay evidencia de que algunos invertebrados acuáticos albergan comunidades bacterianas intestinales, que son distintas en términos de la presencia, tipos y características fisiológicas, de las que se encuentran en el hábitat circundante o en la dieta. Por lo tanto, el ambiente intestinal proporciona un lugar específico y la actividad bacteriana en el intestino no es simplemente un continuo de la que se encuentra en el medio ambiente”. Si tomamos en cuenta dicha observación podemos pensar que más allá de la especie de ostreidos de que se trate, sitio geográfico donde se encuentre, condiciones ambientales en las que crezca parece haber una microbiota residente asociada que esencialmente no cambia. Esto quizás sea una adaptación evolutiva, como producto de una selección de aquellos microorganismos comunes en el ambiente marino y que tienen algún beneficio para el huésped (Giovannoni, 2004; Pommier *et al.*, 2012).

En términos generales las Proteobacterias son el grupo más relevante asociado a la microbiota en términos de diversidad y abundancia, principalmente los grupos γ y β seguido en menor proporción por las clases α y δ . Dentro del dominio Bacteria, las Proteobacterias son el grupo más diverso y abundante en la naturaleza y son conocidas en términos generales como las Gram negativas. Incluye grupos metabólicos muy diferentes: fotótrofos, heterótrofos y quimiolitótrofos, además de aerobios y anaerobios (Gupta, 2000; Kersters *et al.* 2006; Madigan *et al.*, 2006), por lo que abordar una discusión del rol de las proteobacterias en estos ostreidos es algo muy difícil.

TABLA XVIII. Comparación de la microbiota asociada a ostreidos respecto a antecedentes publicados. Resumen de resultados obtenidos recientemente por otros autores, utilizando técnicas cultivo independiente.

Especie de Ostreido	Localización Geográfica	Proteobacterias	Bacteroidetes	Firmicutes	Fusobacteria	Actinobacteria	Spirochaetes	Cyanobacteria	Chloroflexi	Tipo Muestra	Autores
<i>Saccostrea glomerata</i>	Australia	Alpha+++ Gamma+								Gándula Digestiva Adulto	Green y Barnes, 2010
		Gamma+++ Alpha++ Delta++	NOD	++	NOD	+	+	+	+	No Depurado Branquias Adulto	
<i>Chama pacific</i>	Israel	Gamma+++ Alpha++ Delta++	++	++	NOD	+	NOD	NOD	NOD	No Depurado Branquias Adulto	Zurel <i>et al.</i> , 2011
<i>Chama savignyi</i>	Israel	Beta+++ Alpha, Delta+	++	++	NOD	++	+	NOD	+	No Depurado Branquias Adulto	Zurel <i>et al.</i> , 2012
		Gamma+++ Alpha, Beta+	+	+	NOD	NOD	NOD	NOD	NOD	No Depurado Gándula Digestiva Adulto	
<i>Crassostrea gigas</i>	México	Gamma+++ Alpha, Beta+	NOD	+	NOD	NOD	NOD	NOD	NOD	No Depurado Homogenado Adulto	Hernández and Olmos, 2006
		Alpha+++ Beta, Gamma+ Delta +								No Depurado Adulto	
<i>Crassostrea gigas</i>	Tasmania	Alpha+++ Gamma++ Beta, Delta+ Beta+++	++	+	++	NOD	+	++	NOD	Semilla Homogenado Depurado Adulto Tracto Gastrointestinal Depurado	Fernández-Piquer <i>et al.</i> , 2011 Este Estudio
<i>Crassostrea gigas</i>	México	Gamma+++ Alpha++ Delta+	+	+	+	++	NOD	±	±	Semilla Homogenado Depurado Adulto Tracto Gastrointestinal Depurado	Este Estudio
		Alpha+++ Beta, Delta+ Gamma+++	+++	++	+	+	±	NOD	±	Semilla Homogenado Depurado Adulto Tracto Gastrointestinal Depurado	
<i>Crassostrea corteziensis</i>	México	Beta++ Alpha++ Delta+	+	+	+	+++	NOD	±	±	Semilla Homogenado Depurado	Este Estudio
<i>Crassostrea sikamea</i>	México	Gamma++ Alpha+++ Beta, Delta+	+++	++	++	+	±	NOD	NOD	Semilla Homogenado Depurado Adulto Tracto Gastrointestinal Depurado	Este Estudio
		Gamma+++ Alpha++ Beta, Delta+	+	+	++	++	NOD	±	NOD	Semilla Homogenado Depurado	

NOD: No detectado, los símbolos + ++: Muy Abundante; ++: Abundante; +: Poco Abundante con respecto a otros Phylum en el mismo estudio.

Los géneros *Neptuniibacter* y *Marinicella* fueron las más abundantes gamma-proteobacterias en asociación con los ostiones. *Neptuniibacter* fue descubierto recientemente en el ambiente marino, es ligeramente halófila, estrictamente aeróbica y quimiorganotrófica (Arahal *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). Es capaz de asimilar taurina y nitrógeno, compuestos excretados por la orina en mamíferos e invertebrados marinos (Krejcyck *et al.*, 2008). El género *Marinicella* es también aeróbica, no móvil y quimiorganotrófica descubierta también muy recientemente y solo en ambientes costeros marinos (Romanenko *et al.*, 2010) y asociada a el tracto gastrointestinal de camarón (Meziti *et al.*, 2012.). Los reportes preliminares, indican que no es capaz de degradar celulosa, agar o quitina, por lo que su rol en el ambiente marino aún es desconocido (Romanenko *et al.*, 2012).

El segundo grupo en abundancia asociada a los ostreidos aquí estudiados, son las Beta proteobacterias. El género *Burkholderia* fue el más representativo de este grupo hallado en los ostiones. Dicho género contiene aproximadamente 30 especies reportadas y ocupa una gran diversidad de nichos, incluido el marino. Por la abundancia y distribución de *Burkholderia* en *C. corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*, esta bacteria probablemente es simbiote, con un tipo de interacción de mutualismo, está aún por determinarse. Metabólicamente es un organismo extremadamente versátil, algunas de las especies, particularmente la identificada en este estudio *Burkholderia cepacia* es capaz de usar más de 100 compuestos diferentes, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, tricarboxílicos, alcoholes, polialcoholes, glicoles, compuestos aromáticos entre otros (Coenye y Valdamme, 2003; Madigan *et al.*, 2006). Esta gran capacidad metabólica puede cumplir un rol fundamental en asociación con su hospedero, beneficiándole en mucho aspectos. Se ha demostrado también, la capacidad de esta bacteria de producir compuestos antibióticos (Coenye & Valdamme, 2003), por lo que quizás también cumpla un rol antagónico contra organismos patógenos defendiendo al hospedero, de la colonización por bacterias que le puedan hacer daño.

Por su parte el género *Escherichia*, es una bacteria móvil, con requerimientos de azúcar relativamente simples y que se caracteriza por ser anaerobio facultativo y fermentar

diferentes compuestos generando una gran diversidad de productos finales (Madigan *et al.*, 2006).

La clase alfa Proteobacteria está compuesto por grupos muy diversos, que incluyen fotótrofos anaerobios, como *Rhodolovum* (Straub *et al.*, 1999) y *Oceanicola* descubierta recientemente en ambientes marinos (Cho & Giovannoni, 2004; Lin *et al.*, 2007). Esta última se caracteriza por acumular PHB (poly- β -hydroxybutirato), polímero denominado plástico biodegradable y que es producida por estas bacterias como polímero de reserva.

Sphingomonas fue la más abundante α -Proteobacteria encontrada en adultos de las tres especies de ostión. El género *Sphingomonas* fue descrito por Yabuuchi *et al.* (1990) para acomodar a bacterias estrictamente aeróbicas, quimioheterótrofas, de pigmentación amarilla, Gram-negativas, que contienen glicosfingolípidos (GSL) como componentes de la envoltura celular. Incluye especies inicialmente de origen clínico y en los últimos años aisladas en ambientes marinos (Takeuchi *et al.*, 2001; Yabuuchi *et al.*, 1990). En las últimas dos décadas, su estudio ha tomado mayor relevancia por su capacidad de degradar ciertos pesticidas (Wittich *et al.*, 1992) y compuestos aromáticos (Fredrickson *et al.*, 1995), entre otros (Takeuchi *et al.*, 2001).

Otro componente común de *C. corteziensis*, *C. sikamea* y *C. gigas*, encontrado principalmente en gran abundancia y diversidad en semillas, pero también asociado a adultos en ambos sitios de cultivo, fueron los Bacteroidetes. Es un filo muy diverso que en los últimos años ha cambiado de nombre varias veces. Colonizan varios ambientes, entre ellos el marino y el tracto gastrointestinal de varios animales (O'Sullivan *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2011). En particular son bien conocidos por degradar polímeros de materia orgánica (Lau *et al.*, 2005) y tienen un importante rol en la degradación de componentes de la pared vegetal como la celulosa y pectinas, entre otros (Thomas *et al.*, 2011). Quizás éste sea el principal rol que juegan estos microorganismos en el tracto gastrointestinal de los ostreidos. *Flavobacterium* es el género frecuentemente relacionado como gran componente del ambiente marino, pero no fue identificado en este trabajo, otros géneros de reciente descripción fueron los detectados, como es el caso de *Tenacibaculum* en adultos y semillas.

Los Firmicutes, comprenden el grupo de Gram positivas de bajo contenido de GC, más relevante en el medio acuático, son microorganismos aerobios o anaerobios facultativos. Lo integran actualmente más de 270 géneros y muchos tienen la capacidad de esporular (Madigan *et al.*, 2006). Los géneros tipo son: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Mycoplasma*. En este estudio no fue posible determinar el género en la mayoría de las secuencias obtenidas. El principal rol reconocido a este filo bacteriano, es su capacidad probiótica, es decir que afecta beneficiosamente al hospedero modulando su microbiota intestinal y particularmente, incrementando la resistencia a la infección por microorganismos patógenos (Fuller, 1992; Collins & Gibson, 1999). Probablemente, este sea el rol natural y principal que cumple en asociación con estos ostiones (Gatesoupe, 1999; Prado *et al.*, 2010; Kesakordi *et al.*, 2012).

Las Fusobacterias otro grupo encontrado asociado a los ostiones aunque en menor abundancia que los anteriormente mencionados comprende a bacterias estrictamente anaerobias, el género más representativo *Fusobacterium* forma parte del tracto gastrointestinal de varios animales, principalmente en humanos. Poco se conoce del rol de estas bacterias en ambientes acuáticos o en asociación con organismos marinos.

Dos papeles importantes y reconocidos desde hace tiempo que puede cumplir la microbiota bacteriana de invertebrados marinos son: 1. la capacidad de degradar la celulosa y agar, componentes principales del alimento que consumen estos moluscos bivalvos. Como se dijo anteriormente, se encontraron varios géneros bacterianos con esta actividad asociados a las tres especies de ostreidos. En segundo lugar, se considera importante la posible asociación entre el tracto gastrointestinal de moluscos bivalvos y poblaciones bacterianas capaces de fijar nitrógeno (Harris, 1993; Newell, 2004; Pieur, 1990). Géneros principalmente del phylum Firmicutes, como *Bacillus*, *Clostridium* y de las Proteobacterias como especies de *Vibrio*, *Klebsiella*, *Desulfobibrio* y detectados en este estudio poseen dicha capacidad en el ambiente marino (Zehr *et al.*, 1995). La fijación de nitrógeno tiene una vital importancia, debido a que es un componente esencial de todos los organismos para su crecimiento, forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pero no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes (Madigan

et al., 2006). Solo un pequeño grupo de organismos que incluye a las bacterias y las algas, son capaces de reducir y fijar este nutriente esencial para que pueda ser reutilizado por los demás en la trama trófica. De allí radica la importancia de estudiar este mecanismo que puede estar presente en la microbiota de los ostreidos incluidos en este estudio.

Como se puede observar los grupos bacterianos encontrados como parte la microbiota residente de los ostreidos, componen un grupo complejo y muy versátil metabólicamente, lo que hace difícil comprender su rol como simbioses de estos organismos marinos. Muchas de las bacterias encontradas dentro de las poblaciones bacterianas asociadas a *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*, han sido descritas por primera vez en este trabajo de investigación. Algunas de ellas han sido descubiertas recientemente y sus capacidades son casi desconocidas. Queda mucho por comprender y es un desafío interesante establecer en posteriores estudios el tipo de asociación y posible rol de dicha comunidad bacteria-ostión.

CONCLUSIONES

- Se describe por primera vez, la composición de la microbiota gastrointestinal asociada a *Crassostrea corteziensis* y *C. sikamea* y se reporta con mayor detalle la comunidad bacteriana asociada a *C. gigas*.
- Existe gran similitud en la composición de la comunidad bacteriana asociada a las semillas de las tres especies de ostreidos, probablemente debido a las condiciones controladas de alimentación, temperatura y salinidad durante la producción en laboratorio.
- Existen diferencias en cuanto a la composición de la comunidad asociadas en las tres etapas de crecimiento. Las semillas presentan mayor diversidad de su microbiota asociada que los adultos de la misma especie.
- El traspaso de la semilla al sitio de engorda impacta sobre la población bacteriana, sin embargo, las condiciones del sitio de cultivo pueden magnificar o minimizar dicho impacto.
- Las condiciones y características del sitio de cultivo influyen sobre la composición de la microbiota. *Crassostrea corteziensis* y *C. sikamea*, presentan una microbiota muy similar cuando son engordadas en el mismo sitio de cultivo, pero entre el sitio de cultivo en Bahía Magdalena es diferente a la encontrada en Bahía Topolobampo.
- Las características particulares del hospedero puede tener un importante rol sobre la comunidad microbiana asociada debido a que las diferentes especies presentan pequeñas variaciones con respecto a la composición bacteriana. No obstante esto fue muy evidente en *C. gigas*, donde la microbiota presentó variabilidad intraespecífica.
- La microbiota asociada a los ostiones mostró una gran diversidad en cuanto a composición y diferencias claras en cuanto a abundancias relativas. No obstante los Phylum Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria fueron componentes comunes en todas las especies de ostreidos aunque presentaron diferencias en cuanto a composición y abundancia dependiendo de la etapa de crecimiento y sitio usado para la engorda.

- Se detectaron bacterias claramente transientes como cianobacterias, *Illumatobacter* y *Stenotrophomonas*. Mientras que la microbiota residente estuvo integrada por bacterias del género *Burkholderia*, *Escherichia/Shigella*, *Pseudomonas*, *Nevskia* y *Propionibacterium*.
- En organismos depurados se detectaron microorganismos potencialmente patógenos tanto para los ostreidos como para los humanos que consuman dichos animales. La contaminación por organismos patógenos fue mayor en semillas. Destaca la presencia de Clamidia en *C. sikamea*, quien adquirió dicha bacteria durante la producción de semilla en laboratorio y ésta se mantuvo colonizando en abundancia el tracto gastrointestinal hasta el estado adulto en ambos sitios de cultivo.
- Las arqueas componen parte de la microbiota asociada a los ostiones y los resultados preliminares indican que los géneros *Haloarcula* y *Halobacterium* están presentes.
- Existen bacterias simbiotes como *Burkholderia* y *Escherichia/Shigella*, que colonizan en etapas tempranas del desarrollo y se mantiene fuertemente asociadas al tracto gastrointestinal durante todo el crecimiento de estos ostiones. Esta asociación, no se ve afectada por las condiciones ambientales o de manejo del sitio utilizado para la engorda de estos animales. En adultos *Propionibacterium* fue un componente común en estado adulto en ambos sitios de cultivo en el ambiente natural.
- Debido a la alta complejidad mostrada por la comunidad bacteriana asociada y sus gran diferencias en cuanto a capacidades metabólicas hacen muy difícil determinar el posible rol de la microbiota asociada a *C. corteziensis*, *C. sikamea* y *C. gigas*. Sin embargo, se identificaron bacterias con capacidad de degradar celulosa y agarosa, microorganismos fijadores de nitrógeno y bacterias con capacidad de inhibir la colonización de ciertos organismo patógenos. El potencial rol beneficioso de las poblaciones bacterianas residentes detectadas en asociación con estos animales marinos debe ser abordada en posteriores estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- Acinas SG. 2007.** Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. Actualidad SEM - Bol Inf Soc Esp Bol. 44: 24-9.
- Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Pharino C, Ceraj I, Distel DL, Polz MF. 2004.** Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. Nature. 430: 551-554.
- Acinas SG, Sarma-Rupavtarm R, Klepac-Ceraj V, Polz MF. 2005.** PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample. Appl Environ Microbiol. 71: 8966-8969.
- Acosta J, Ruíz A. 2007.** Variación en la cobertura, distribución y estructura de los manglares del complejo lagunar Bahía Magdalena - Bahía Almejas (1990-2005). En: Funes-Rodríguez R, Gómez-Gutiérrez J, Palomares-García R (eds) Estudios ecológicos en Bahía Magdalena. CICIMAR IPN, La Paz, Baja California Sur, México, p 127-141.
- Alcina M, Anicet RB. 1994.** A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J Appl Bacteriol. 56: 79-85.
- Anderson IC, Rhodes M, Kator H. 1979.** Sublethal stress in *Escherichia coli*: A function of salinity. Appl Environ Microbiol. 38: 1147-1152.
- Andrews J. 1980.** A review of introductions of exotic oysters and biological planning for new importations. Mar Fish Rev. 42: 1-11.
- Arahal DR, Lekunberri I, González JM, Pascual J, Pujalte MJ, Pedros-Alio C, Pinhassi J. 2007.** *Neptuniibacter caesariensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine genome-sequenced gammaproteobacterium. Intern J Systematic Evolut Microbiol. 57: 1000-1006.
- Araya R, Jorquera M, Riquelme C. 1999.** Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. Rev Chil His Nat. 72: 261-71.
- Asakura H, Watarai M, Shirahata T, Makino S. 2002.** Viable but nonculturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine treated mice. J Infect Dis. 186: 1526-29.
- Austin B. 2006.** The bacterial microflora of fish, revised. Sci World J. 6:931-945.
- Avendaño Herrera R, Dekovic M, Riquelme C. 2001a.** Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en cultivo masivo. Rev Biol Marina Oceanog. 36: 31-41.
- Avendaño R, Riquelme C. 1999.** Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. Aquacul Res. 30: 893-900.

- Avendaño R**, Riquelme C, Escribano R, Reyes N. **2001b**. Postlarval survival and growth of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) in Bahía Inglesa, Chile: effects of origin, distribution in the bay and larval bacterioflora. *Rev Chilena Hist Nat.* 74: 669-79.
- Avendaño R**, Riquelme C, Silva F. **2002**. Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en un hatchery comercial. *Rev Biol Marina Oceanog.* 37: 35 – 41.
- Badillo-Salas CE**, Valenzuela-Espinoza E, Gonzalez ME, Pares-Sierra G, Ley-Lou F, Garcia-Esquível S. **2009**. Comparative growth of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) postlarvae with microfeed and microalgal diets. *Aquacult Int.* 17: 173–186.
- Baker GC**, Smith JJ, Cowan DA. **2003**. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* 55: 541-555.
- Baldwin BS**. **1995**. Selective particle ingestion by oyster larvae (*Crassostrea virginica*) feeding on natural seston and cultured algae. *Mar Biol.* 123: 95-107.
- Baldwin BS**, **Newell RI**. **1991**. Omnivorous feeding by planktotrophic larvae of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol Prog Ser.* 78: 285-301.
- Bhat MA**, Tsuda M, Horike K, Nozaki M, Vaidyanathan CS, Nakazawa T. **1994**. Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl Environ Microbiol.* 60: 307-312.
- Beier S**, Witzel KP, Marxsen J. **2008**. Bacterial Community Composition in Central European Running Waters Examined by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol.* 74: 188-199.
- Benbouza H**, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G. **2006**. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 10: 77–81.
- Berg R**. **1996**. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4: 430-5.
- Beuret C**, Baumgartner A, Schluep J. **2003**. Virus-Contaminated Oysters: a Three-Month Monitoring of Oysters Imported to Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 69: 2292–97.
- Boettcher KJ**, Barber BJ, Singer JT. **2000**. Additional Evidence that Juvenile Oyster Disease Is Caused by a Member of the *Roseobacter* Group and Colonization of Non affected Animals by *Stappia stellulata*-Like Strains. *Appl Environ Microbiol.* 66: 3924–3930.
- Borroto RJ**. **1998**. Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geocológica. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 6: 371-374.
- Bower SM**, **McGladdery SE**. **2003**. Disease interactions between wild and cultured shellfish. In: Fisheries and Oceans Canada (ed) A scientific review of the potential environmental effects of aquaculture in aquatic ecosystems. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci.* 2:1–5.

- Brands DA, Inman AE, Gerba CP, Mare JC, Billington SJ, Saif LA, Levine JF, Joens LA. 2005.** Prevalence of *Salmonella* spp. in Oysters in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 71: 893–97.
- Brown C. 1973.** The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster *Crassostrea virginica*. *J Invertebr Pathol.* 21: 215–33.
- Brown MG, Balkwill DL. 2009.** Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb Ecol.* 57: 484–93.
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA. 1996.** Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture.* 151: 315-31.
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R. 2003.** Erosión branquial en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el NW de México. *Boletín del PRONALSA. Programa Nacional de Sanidad Acuicola.* pp: 15-18.
- Camara MD, Davis JP, Sekino M, Hedgecock D, Li G, Langdon C, Evans S. 2008.** The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the northern ariake sea, Japan. *J Shellfish Resear.* 27: 313–322.
- Campa-Córdova AI, González-Ocampo H, Luna-González A, Mazón-Suástegui JM, Ascencio F. 2009.** Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. *Hidrobiol.* 19: 151-157.
- Cappelier JM, Magras C, Jouve JL, Federighi M. 1999.** Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *Food Microbiol.* 16: 375–83.
- Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Ovreas L, Diez B, Goddard VJ, Gasol JM, Joint I, Rodriguez-Varela F, Pedros-Alió C. 2002.** Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol.* 4: 338–348.
- Cáceres-Martínez J. 2000.** Resultados de los análisis patológicos efectuados a ostiones del Pacífico relacionados con mortalidades masivas. *Foro Regional sobre la Problemática del Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México.* Hermosillo, Sonora.
- Castillo-Durán A, Chávez-Villalba J, Arreola-Lizárraga A, Barraza-Guardado R. 2010.** Comparative growth, condition, and survival of juvenile *Crassostrea gigas* and *C. corteziensis* oysters cultivated in summer and winter. *Cienc Mar* 36: 29–39.
- Chaiyapechara S, Rungrassamee W, Suriyachay I, Kuncharin Y, Klanchui A, Karoonuthaisiri N, Jiravanichpaisal P. 2011.** Bacterial Community Associated with the Intestinal Tract of *P. monodon* in Commercial Farms. *Microb Ecol.* 6: 33-39.

- Chao A. 1984.** Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian J Statistics*. 11: 265-270.
- Chao A, Lee SM. 1992.** Estimating the number of classes via sample coverage. *J American Statistical Association*. 87: 210-217.
- Charpy L, Casareto BE, Langlade, MJ, Suzuk Y. 2012.** Cyanobacteria in Coral Reef Ecosystems: A Review. *J Marine Biology*. 2012: 3-9.
- Chávez-Villalba J, López-Tapia M, Mazón-Suástegui JM, Robles-Mungaray M. 2005.** Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquacul Res*. 36: 1337-44.
- Chávez Rosales S. 2006.** El papel de los manglares en la producción de las comunidades acuáticas de Bahía Magdalena, BCS. En: Funes-Rodríguez R, Gómez-Gutiérrez J, Palomares-García R (eds) *Estudios ecológicos en Bahía Magdalena*. CICIMARIPN, La Paz, Baja California Sur, México, pp: 127-41.
- Chen MH, Sheu SY, Chiu TF, Chen WM. 2012.** *Neptuniibacter halophilus* sp. nov., isolated from a salt pan, and emended description of the genus *Neptuniibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62: 1104-1109.
- Cho JC, Giovannoni SJ. 2004.** *Oceanicola granulosa* gen. nov., sp. nov. and *Oceanicola batsensis* sp. nov., poly- β -hydroxybutyrate-producing marine bacteria in the order 'Rhodobacterales'. *Internat J Systematic Evolution Microbiol*. 54: 1129–1136.
- Chorus I, Bartram J. 1999.** Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization. 416 pg.
- Clarridge III JE. 2004.** Impact of 16S rRNA Gene Sequence analysis for Identification of bacterial on *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. *Clinical Microbiol Rev*. 17: 840-862.
- Coenye T, Vandamme P. 2003.** Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol*. 5: 719–29.
- Colburn KG, Kaysner CA, Abeyta C, Wekell MM. 1990.** *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl Environ Microbiol*. 56: 2007–11.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B. 2009.** The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl Acids Res*. 37: 141–145.
- Collins MD, Gibson GR. 1999.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr*. 69:1052–1057.
- Colombo LA, Pickering D, Belvedere P, Shreck CB. 1990.** Stress inducing factors and stress reaction in aquaculture. *Spec Publ Eur Aquacult. Soc*. 12:93–121.
- Colwell RK. 2005.** EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species for samples. Version 7.5. Persistent URL <purl.oclc.org/estimates>

- Colwell R, Huq A. 1994.** Vibrios in the environment: Viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. En: Kaye Wachsmuth I, Blake P, Olsvik Ø, eds. *Vibrio cholerae and cholera: Molecular to global perspectives*. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp: 117–33.
- Colwell R, Liston J. 1960.** Bacteriological study of the natural flora of the Pacific Oysters, (*Crassostrea gigas*). *Appl Microbiol.* 8: 104–9.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Barka EA. 2008.** Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 607-26.
- Cook T, Folli M, Klinck J, Ford S, Miller J. 1998.** The relationship between increasing sea surface temperature and the northward spread of *Perkinsus marinus* (Dermo) disease epizootics in oysters. *Estuar Coast Shelf Sci.* 40: 587–97.
- Cruz-Romero M, Kelly AL, Kerry JP. 2008.** Influence of packaging strategy on microbiological and biochemical changes in high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*). *J Sci Food Agric* 88: 2713–2723.
- DeLong EF. 2003.** Oceans of *Archaea*. *ASM new.* 69: 503-511.
- DeLong EF, Taylor LT, Marsh TL, Preston CM. 1999.** Visualization and Enumeration of Marine Planktonic *Archaea* and *Bacteria* by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent in Situ Hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 65: 5554–63.
- DeLong EF. 1992.** Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci.* 89: 5685-89.
- Denev S, Staykov Y, Moutafchieva R, Beev G. 2009.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Int Aquat Res.* 1: 1-29
- DePaola A, Kaysner C A, Bowers J, Cook D W. 2000.** Environmental Investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters after Outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol.* 66: 4649–654.
- DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW. 2003.** Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1521–26.
- DeSantis TZ, P. Hugenholtz N, Larsen M, Rojas EL, Brodie K, Keller T, Huber D, Dalevi P Hu, Andersen GL. 2006.** Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069-72.
- Devaraja TN, Yusoff FM, Shariff M. 2002.** Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquacul.* 206: 245–56.
- Dong H. 2008.** Microbial Life in Extreme Environments: Linking Geological and Microbiological Processes. Y. Dilek *et al.* (eds.), *Links Between Geological Processes, Microbial Activities & Evolution of Life*, Springer Science, Business Media B.V. pp: 237-80.

- Douillet P, Langdon C. 1993.** Effects of marine bacteria on the culture of axenic oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biological Bulletin*. 184: 36–51.
- Dumontet S, Krovacek K, Svenson SB, Pasquale V, Baloda SB, Figliuolo G. 2000.** Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of southern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 23: 53–72.
- Duperron S, MacGregor BJ, Fisher CR, Kuypers M, Sibuet M, Dubilier N. 2007.** Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology*. 9: 1423–1438.
- Duperron S, Laurent MCZ, Gaill F, Gros O. 2008a.** Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiol Ecol*. 63: 338–349.
- Duperron S, Lorion J, Halaré S, Sibue M, Gaill F. 2008b.** Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). *Environmental Microbiology*. 10: 433–445.
- Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA. 2003.** *Archaea* and Their Potential Role in Human Disease. *Inf Immun*. 71: 591–96.
- Elston RA. 1993.** Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ann Rev Fish Dis*. 259-276.
- Elston RA, Hasegawa H, Humphrey K L, Polyak I K, Häse C C. 2008.** Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases Aquatic Organisms*. 82: 119–134.
- Elston R, Leibovitz L. 1980.** Experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J Fish Aquat Sci*. 37:964–978.
- Elston R, Leibovitz L, Relyea D, Zatila J. 1981.** Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic, a case history. *Aquacul*. 24:53–62.
- Erasmus JH, Cook PA, Coyne VE. 1997.** The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*. 155. 377-86.
- Essinger SD, Rosen GL. 2010.** Benchmarking BLAST accuracy of Genus/phyla classification of metagenomic reads. *Pacific Symposium on Biocomputing*. 15: 10-20.
- Estrada-De Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero- Mellado J. 2001.** Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol*. 67: 2790–98.
- Falconer I. 1999.** An overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ Toxicol*. 14: 5-12.

- Falconer IR, Choice A, Hosja W. 1992.** Toxicity of the edible mussel *Mytilus edulis* growing naturally in an estuary during a water-bloom of the blue-green alga *Nodularia spumigena*. *J Env ToxicoWater Quality*. 7: 119- 123.
- Farías, A. 2008.** Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 297–308.
- Faust MA, Aotaky AE, Hargadon MT. 1975.** Effect of physical parameters on the in situ survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. *Appl Microbiol*. 30: 800–806.
- Feldhusen F. 2000.** The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect*. 2: 1651–60.
- Fernández-Piquer J, Bowman JP, Ross T, Tamplin ML. 2012.** Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. *Applied Microbiol*. 112: 1134–1143.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2009.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación. Roma, Italia.
- Food and Drug Administration (FDA). 1992.** Scheduled Depuration Process. National Shellfish Sanitation Program.
- Fredrickson JK, Balkwil DL, Drake GR, Romine MF, Ringelberg DB, White DC. 1995.** Aromatic-Degrading *Sphingomonas* Isolates from the Deep Subsurface. *Applied Environ Microbiol*. 58: 1917-1922.
- Freitas S, Hatosy S, Fuhrman JA, Huse SM, Mark Welch DB, Sogin ML, Martiny AC. 2012.** Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *ISME Journal*. 6: 1499-1505.
- Fridlander M, Inbar J, Chet I. 1993.** Biological control of soilborne plant pathogens by a /3- 1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol Biochem*. 25: 1211 -1222.
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvette S, Gillet F, Aragno M, Rossi P. 2002.** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol*. 4: 634–43.
- Fuhrman JA, Ouverney CC. 1998.** Marine microbial diversity studied via 16S rRNA sequences: cloning results from coastal waters and counting of native archaea with fluorescent single cell probes. *Aquatic Ecology*. 32: 3–15.
- Fuller R. 1992.** Probiotics: the scientific basis. London: Chapman & Hall.
- Gallager SC, Waterbury JB, Stoecker DK. 1994.** Efficient grazing and utilization of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. by larvae of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Mar Biol*. 119: 251-259.

- Garland CD, Nash GV, McMeekin TA. 1982.** Absence of surface associated microorganisms in adult oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl Environ Microbiol.* 44: 1205–1211.
- Garnier M, Labreuche Y1, Garcia C, Robert M, Nicolas J-L. 2007.** Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecolo.* 53: 187-196.
- Gatesoupe FJ. 1999.** The use of probiotics in aquaculture. *Aquacul.* 180: 147–65.
- Gavin GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt DA. 2005.** Statistical Analyses of Complex Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles. *J Clin Microbiol* 43: 3971–78.
- Green TJ, Barnes AC. 2010.** Bacterial diversity of the digestive gland of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* infected with the paramyxean parasite, *Marteilia Sydney*. *Appl Microbiol.* 109: 613-22.
- Girard AD. 2006.** Phylogenetic relationships within the order Halobacteriales inferred from 16S rRNA gene sequences. *Internat J Systemat Evolution Microbiol.* 56: 1223–1227.
- Gibson LF, Woodworth J, George AM. 1998.** Probiotic activity of *Aeromonas media* on the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquacul.* 169: 111-20.
- Giovannoni, S. 2004.** Evolutionary biology: oceans of bacteria. *Nature* 430, 515–516.
- Gómez-Gil B, Roque A, Turnbull J F. 2000.** The use and selection of probiotic bacteria in the larval culture of aquatic organisms. *Aquacul.* 191: 259–70.
- Gontang EA., Fenical W, Jensen PR. 2007.** Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 73: 3272–3282
- Govan JRW, Hughes E, Vandamme P. 1996.** *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol.* 45: 395-407.
- Grimes DJ, Atwell RW, Brayton PR, Palmer LM, Rollins DM, Roszak DB, Singleton FL, Tamplin ML, Colwell RR. 1986.** The Fate of Enteric Pathogenic Bacteria in Estuarine and Marine Environments. *Microbiol Scien.* 3: 324–29.
- Grizzle JM, Brunner CJ. 2009:** Infectious Diseases of Freshwater Mussels and Other Freshwater Bivalve Mollusks, *Reviews in Fisheries Science.* 17:425-467.
- Guo X, Yongping W, Lingling W, Lee J-H. 2008.** *Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals.* Oyster. Berlin Heidelberg: T. D. Kocher, C. Kole (Eds.) Springer-Verlag pp: 23-36.
- Gupta R. 2000.** The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 367-402.
- Hallegraeff G. 1992.** A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia:* 32: 79-99.

- Hammer** Ø, Harper DAT, Ryan PD. **2001**. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electrónica* 4: 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Hammer** Ø, **Harper** DAT. **2006**. *Paleontological Data Analysis*. Blackwell.
- Hansen** GH, **Olafsen** JA. **1999**. Bacterial infections in early life stages of marine cold water. *Microb Ecol.* 38: 1-26.
- Harris** JM. **1993**. The presence nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb Ecol.* 25:195–231.
- Hasegawa** H, Lind EJ, Boin MA, Häse CC. **2008**. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Appl Environ Microbiol.* 74: 4101–4110.
- Have** J, **Reineke** W. **1993**. Degradation of Aroclor 1221 in soil by a hybrid pseudomonad. *FEMS Microbiol Lett.* 108: 339-353.
- Heck** KL, Belle G, Simberloff D. **1975**. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology.* 56: 1459–1461.
- Helm** MM, Bourne N, Lovatelli A. **2006**. Cultivo de Bivalvos en Criadero. Un manual Práctico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 471. Roma, Italia, FAO. pp: 184.
- Hernández-Zárate** G, **Olmos-Soto** J. **2006**. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Appl Microbiol.* 100: 664–67.
- Hofmann** E, Ford S, Powell E, Klinck J. **2001**. Modeling studies of the effect of climate variability on MSX disease in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) populations. *Hydrobiol.* 460: 195–212
- Homma** Y, Sat Z, Hirayama F, Kanno K, Shirahama H, Suzui T. **1989**. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborn plant pathogens. *Soil Biol Biochem.* 21: 723-728.
- Huber** JA, Welch DBM, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA. **2007**. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science.* 318: 97-100.
- Hughes** K A. **2003**. Influence of seasonal environmental variables on the distribution of presumptive fecal coliforms around an Antarctic research station. *Appl Environ Microbiol.* 69: 4884–4891.
- Hughes** JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJM. **2001**. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol.* 67: 4399-4406.
- Huse** SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin M. **2008**. Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genet* 4:1-11.
- Husmann** G, Gerdts G, Wichels A. **2010**. Spirochetes in crystalline styles of marine bivalves: group-specific PCR detection and 16 s rRNA sequence analysis. *J Shellfish Res.* 29:1069–1075.

- Huss HH. 1980.** Distribution of *Clostridium botulinum*. Appl Environ Microbiol. 39: 764–769.
- Ibeling BW, Havens KE. 2010.** Chapter 32: Cyanobacterial toxins: a qualitative meta-analysis of concentrations, dosage and effects in freshwater, estuarine and marine biota. Pp: 675- 732
- Imam SH, Greene RV, Griffin HL. 1990.** Adhesive properties of a symbiotic bacterium from a wood-boring marine shipworm. Appl Env Microbio1. 56: 1317-1322.
- Jahncke ML, Spencer GE, Reilly A, Martin RE, Cole E. 2002.** Public Animal and Environmental Aquaculture Health Issues. John Wiley and Sons, USA, pp: 204.
- Janda MJ, Abbott SL. 2007.** 16S rRNA Gene Sequencing for bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J Clinical Microbiol. 45: 2761-2764.
- Janssen PH. 2006.** Identifying the dominant soil bacteria taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Appl Environ Microbiol 72: 1719–28.
- Jensen S, Duperron S, Birkeland NK, Hovland M. 2010.** Intracellular Oceanospirillales bacteria inhabit gills of Acreta bivalves. FEMS Microbiol Ecol. 74: 523–533
- Johnson MA, Lepennec M. 1995.** Association between the mollusk bivalve *Loripes lucinalis* and a chlamydia-like organism, with comments on its pathogenic impact, life-cycle and possible mode of transmission. Mar Biol. 123: 523–530.
- Jones SH. 2008.** Environmental sources of microbial contaminants in shellfish and their public health significance. J Foodservice. 19: 238–244.
- Jones SH, Howell TL, O’Neill KR. 1991.** Differential elimination of indicator bacteria and pathogenic *Vibrio* spp. from eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1971) in a commercial controlled purification facility in Maine. J Shellfish Res. 10: 105-112.
- Jorquera MA, Silva FR, Riquelme CE. 2001.** Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aqua Internat. 9: 285–303.
- Kelly MT, Hickman FW, Farmer JJ III. 1991.** Manual of clinical microbiology. 5 ed. Washington DC: American Society for Microbiology. pp: 384-95.
- Kemp PF, Aller JY. 2004 a.** Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. FEMS Microbiol Ecol. 47: 161–177.
- Kemp PF, Aller JY. 2004b.** Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough. Limnol Oceanogr Methods 2: 114–125.
- Kendall MM, Wardlaw GD, Tang CF, Bonin AS, Liu Y, Valentine DL. 2007.** Diversity of *Archaea* in Marine Sediments from Skan Bay, Alaska, Including Cultivated Methanogens, and Description of *Methanogenium boonei* sp. nov. Appl Enviro Microbiol. 73: 407–14.

- Kerstens K**, de Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P, Stackenbrandt E. **2006**. Introduction to the Proteobacteria. *Prokaryotes* 5: 3-37.
- Kesarcodi Watson A**, Philippe M, Jean-Louis N, Rene R. **2012**. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquacul.* 344–349.
- Kielak A**, Pijl AS, Van Veen JA, Kowalchuk GA. **2009**. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *The ISME Journal.* 3: 378–382.
- Kim BS**, Kim BK, Lee JH, Kim M, Lim YW, Chun J. **2008**. Rapid phylogenetic dissection of Prokaryotic Community Structure in tidal flat using pyrosequencing. *J Microbiol.* 46: 357-363
- Knittel K**, Losekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. **2005**. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol.* 71: 467–79.
- Krebs CJ.** **1989**. Ecological methodology. Harper Collins Publ. 654 pp.
- Krejcyck Z**, Denger K, Weinitschke S, Hollemeyer K, Paces V, Cook A, Smits THM. **2008**. Sulfoacetate released during the assimilation of taurine-nitrogen by *Neptuniibacter caesariensis*: purification of sulfoacetaldehyde dehydrogenase. *Arch Microbiol.* 190: 159–168.
- Krumme ML**, Timmis KN, Dwyer DF. **1993**. Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 59: 2746-2749.
- Krzanowski WJ.** **2000**. Principles of multivariate analysis. A user's perspective. Oxford University Press, Oxford.
- Kueh C**, Chan K. **1985**. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oysters. *J Appl Bacteriol.* 59: 41– 47.
- Lacoste A**, Jalabert F, Malham SK, Cueff A, Poulet S. **2001**. Stress and Stress-Induced Neuroendocrine Changes Increase the Susceptibility of Juvenile Oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2304-09.
- Lafferty KD**, Porter JW, Ford SE. **2004**. Are diseases increasing in the ocean? *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 35: 31–54.
- Lan Y**, Wang Q, Cole JR, Rosen GL. **2012**. Using the RDP classifier to predict taxonomic novelty and reduce the search space for finding novel organisms. *PLoS One.* 2012; 7:e32491
- Lange M**, Westermann P, Ahring BK. **2005**. *Archaea* in protozoa and metazoa. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66: 465–74.

- LaValley** KJ, Steve Jones LA, Gómez-Chiarri M, Dealteris J, Rice M. **2009**. Bacterial community profiling of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): comparison of culture-dependent and culture-independent outcomes. *J Shellfish Res.* 28:827–835.
- Lau** KNK, Connie YM, Ren J, Lau SCL, Qian PY, Wong PK, Lau TC, Wu M. **2005**. *Owenweeksia hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum ‘Bacteroidetes’. *Internat J Systematic Evolution Microbiol.* 55: 1051–1057.
- Lee** R, Lovatelli T, Ababouch A (2008). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects., FAO, Fisheries Technical Paper, Food and Agriculture Organization, Rome, N° 551: pp 11–39
- Li** L, Kato C, Horikoshi K. **1999**. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity Conserv.* 8. 659-77.
- Li** Q, Zhang Y, Juck D, Fortin N, Greer CW, Tang Q. **2010**. Phylogenetic analysis of bacterial communities in the shrimp and sea cucumber aquaculture environment in northern China by culturing and PCR–DGGE. *Aquacult Int* .18: 977–990.
- Lin** KY, Sheu SH, Chang PS, Cho JC, Chen WM. **2007**. *Oceanicola marinus* sp. nov., a marine alphaproteobacterium isolated from seawater collected off Taiwan. *Internat J Systematic Evolutionary Microbiol.* 57: 1625–1629.
- Liu** Z, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. **2008**. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research.* 36: 2-11.
- Loosanoff** VL, **Davis** HC. **1963**. Rearing of bivalve mollusks. In: *Advances in Marine Biology*, 1 (ed FS Russel), Academic Press Inc., Londres. pp 1-136.
- Ludwig** W, Euzéby J, Whitman WB. **2008**. Draft Taxonomic Outline of the *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Dictyoglomi*, and *Gemmatimonadetes*. pp.1-96.
- Madigan** MT, Martinko J, Parker J. **2006**. Brock, *Biología de los microorganismos*. 10 edición. Pearson educación. Pp 1011.
- Maeda-Martínez** AN. **2008**. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 91–100.
- McCracken** VJ, Simpson JM, Mackle RI, Gaskins HR. **2001**. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *J Nutrition.* 131: 1862–1870.
- Magne** F, Abely M, Boyer F, Morville P, Pochart P, Suau A. **2006**. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol.* 57: 128–38.

- Magurran AE. 1988.** Ecological Diversity and its measurement. Prenceton University Press, New Jersey.
- Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson, CG. 2008.** *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. J Applied Microbiol. 104: 1539-51.
- Maki JD, Rittschof O, Samuelsoon U, Szewzky A, Yule B, Kjelleberg S, Costlow JD, Mitchell R. 1990.** Effect of marine bacteria and their exopolymers on the attachment of barnacle cypris larvae. Bulletin of Marine Science. 46: 499-511.
- Margot CA, Toril E, Amils R, Fernández Puentes EL. 2002.** Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. Marin Biol. 140: 739–45.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Chen SB, Dewell L Du, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage JB, Kim JR, Knight JR, Lanza JH, Leamon SM, Lefkowitz M, Lei J, Li KL, Lohman H, Lu VB, Makhijani KE, McDade MP, McKenna EW, Myers E, Nickerson JR, Nobile R, Plant BP, Puc MT, Ronan, GT, Roth GJ, Sarkis JF, Simons JW, Simpson M, Srinivasan KR, Tartaro A, Tomasz KA, Vogt GA, Volkmer SH, Wang Y, Wang MP, Weiner P, Yu RF, Begley D, Rothberg JM. 2005.** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature. 437: 376-380.
- Margulis L, Nault L, Sieburth JM. 1991.** *Cristispira* from oyster styles--complex morphology of large symbiotic spirochaetes. Symbiosis. 11: 1-18.
- Marques A, Ollevier F, Verstraete W, Sorgeloos P, Bossier P. 2006.** Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. J Appl Microbiol. 100: 903-18.
- Martin DE, Hall S. 2006.** Oyster shucking technologies: past and present. Inter J Food Sci Technol. 41: 223–32.
- Martínez OC, Montoya Rodríguez J. 2003.** Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Moluscos Bivalvos para la Inocuidad Alimentaria. Mazatlán, Sinaloa, México: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SAGARPA. pp363.
- Mazón-Suástegui JM. 1996.** Cultivo del Ostión Japonés *Crassostrea gigas*. En: Casas, V.; Ponce, D.G., eds. Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Baja California Sur, México, 625-650
- Mazón-Suástegui JM, Parres-Haro A, Ruiz-Ruiz KM, Rodríguez-Jaramillo C, Saucedo P. 2009.** Influence of hatchery diets on early grow-out of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* in Sinaloa, Mexico. Aquacul Res. 40: 1908-1914.
- Mazón-Suástegui JM, Ruíz-García MC, Chávez-Villalba J, Rodríguez-Jaramillo C, Saucedo PE. 2011** Analysis of growth and first reproduction of hatchery-reared juvenile Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*) in northwestern Mexico: Proposal of a minimal fishing size. Aqua Res. 42:1–11

- Mazón-Suástegui JM, Ruiz-Ruiz KM, Parres-Haro A, Saucedo P. 2008.** Combined effects of diet and stocking density on growth and biochemical composition of spat of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* at the hatchery. *Aquacul.* 284: 98–105.
- McHardy AC, Rigoutsos I. 2007.** What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples *Current Opinion in Microbiology.* 10: 499–503.
- Meziti A, mente E, Kormas KA. 2012.** Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. *Systematic Applied Microbiol.* Available October.
- Montaño I, Peraza R, Páez F. 2007.** The tidal hydrodynamics modeling of the Topolobampo coastal lagoon system and the implications for pollutant dispersion. *Environ Pollut.* 147: 282-90.
- Moriarty DJW. 1997.** The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquacul.* 151: 333–49.
- Moriarty DJW. 1990.** Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Lésel R. (ed.), *Microbiology in Poecilotherms.* Elsevier, Paris.
- Muller-Feuga A. 2000.** The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J Appl Phycology* 12: 527–534.
- Murchelano R, Brown C. 1968.** Bacteriological study of the natural flora of the Eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *J Invert Pathol.* 11: 519–20.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitierlinden AG. 1993.** Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Muyzer G, Smalla K. 1998.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek Int J Gen Microbiol.* 73: 127–141.
- Najiah M, Nadirah M, Lee KL, Lee SW, Wendy W, Ruhil HH, Nurul FA. 2008.** Bacteria flora and heavy metals in cultivated oysters *Crassostrea iredalei* of Setiu Wetland, East Coast Peninsular Malaysia. *Vet Res Commun.* 32: 377–381.
- Nayak SK. 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac Res.* 41: 1553–1573.
- Newell RIE. 2004.** Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension feeding Bivalve mollusc: a review. *J Shellfish Res.* 23: 52-61.
- Oliveira J, Cunha A, Castilho F, Romalde JL, Pereira MJ. 2011.** Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives e A mini-review. *Food Control.* 22: 805-816
- Oficina Internacional de Epizootias (OIE). 2008.** Código Sanitario para Animales Acuáticos. 11a Ed. pp 567-568.

- Oren A, Arahal DR, Ventosa A. 2009.** Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae. *Internat J Systemat Evolution Microbiol.* 59: 637–642.
- O’Sullivan LA, Fuller KA, Thomas EM, Turley CM, Fry JC, Weightman AJ. 2004.** Distribution and culturability of the uncultivated ‘AGG58 cluster’ of the Bacteroidetes phylum in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology.* 47: 359-370.
- Osuna Flores I, Riva MC. 2002.** Organochlorine Pesticide Residue Concentrations in Shrimps, Sediments, and Surface Water from Bay of Ohuira, Topolobampo, Sinaloa, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol.* 68: 532–39.
- Paerl H. 1996.** A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia.* 35: 25-35.
- Páez Osuna F, Ruiz Fernández JI, Botello AV, Ponce Velez G, Osuna López JI, Frías Espiruceta MG, López López G, Zazueta Padilla HM. 2002.** Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific coast of Mexico: an overview. *Marine Pollution Bulletin.* 44: 1303-08.
- Paillard C, Le Roux F, Borrego JJ. 2004.** Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat Living Resour.* 17: 477–498.
- Palacios-Fest MR., Mazón-Suástegui, JM, García-Sandoval S, Diego-Peralta M, Estrada-Ortega JC, Altamirano-Saucedo AA, Pérez-Flores J. 1988.** Manual Técnico para la Operación de los Centros Acuícolas Productores de Ostión. Secretaría de Pesca, Dirección Gral. Comunicación Social. México D.F., 324 pp.
- Pape T, Hoffmann F, Quéric V N, von Juterzenka K, Reitner J, Michaelis W. 2006.** Dense populations of Archaea associated with the demosponge *Tentorium semisuberites* Schmidt, 1870 from Arctic deep-waters. *Polar Biol.* 29: 662–667.
- Pearce CM, Bourget E. 1996.** Settlement of larvae of the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin), on various artificial and natural substrata under hatchery-type conditions. *Aquaculture.* 141: 201-221.
- Peressutti SR, Costagliola M, Artigas LF, Hozbor C. 2010.** Estudio comparativo de la estructura del bacterioplancton en aguas del Mar Argentino mediante el método de pirosecuenciación 454 *tag*. *Revista Argentina de Microbiología.* 42: 288-297
- Pérez-Enríquez R, Ávila S, Ibarra AM. 2008.** Population genetics of the oyster *Crassostrea corteziensis* in the Gulf of California. *Ciencias Marinas.* 34: 479–490.
- Pernthale A, Preston CM, Pernthaler J, DeLong EF, Amann R. 2002.** Comparison of Fluorescently Labeled Oligonucleotide and Polynucleotide Probes for the Detection of Pelagic Marine Bacteria and Archaea. *Appl Environ Microbiol.* 68: 661–667.
- Petti CA. 2007.** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis* 44: 1108-1114.

- Playne MJ. 1995.** Probiotic microorganisms. *Rec Adv Microbiol.* 3: 215-254.
- Pommier T, Canbäck B, Riemann L, Boström KH, Simu K, Lundberg P. 2007.** Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol.* 16: 867-80.
- Poonam SDP, Tomar SK, Sachinandan D, Singh R. 2012.** Multifaceted attributes of dairy propionibacteria: a review. *World J Microbiol Biotechnol.* 11: 3081-3095.
- Potasman I, Paz A, Odeh M. 2002.** Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. *Clinical Infect Diseases.* 35:921–928.
- Prado S, Romalde JL, Barja JL. 2010.** Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology.* 145: 187–197.
- Prieur D. 1981.** Nouvelles donnees sur les relations entre bacteries et bivalves marins. *Haliotis.* 11: 251-260.
- Prieur D, Mvel G, Nicolas J-L, Plusquellec A, Vigneulle M. 1990.** Interactions between bivalve mollusks and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev.* 28: 277–352.
- Prübe E, Quast C, Knittel KF, Ludwig BM, Peplies J, Glöckner FO. 2007.** SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research.* 35: 7188-7196.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J. 2007.** SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl Acids Res.* 35: 7188-96.
- Pujalte MJ, Ortigosa M, Macián MC, Garay E. 1999.** Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int Microbiol.* 2: 259–266.
- Qiu X, Wu L, Huang H, . McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J. 2001.** Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol.* 67: 880–887.
- Quaiser A, Ochsenreiter T, Lanz C, Schuster S, Treusch AH, Eck J, Schleper C. 2003.** Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol Microbiol.* 50: 563–575.
- Raby D, Mingelbier M, Dodson JJ, Klein B, Lagadeuc Y, Legendre L. 1997.** Food-particle size and selection by bivalve larvae in a temperate embayment. *Marine Biology.* 127: 665-672.
- Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. 2004.** Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13:4596–4601.
- Renault T, Cochenne N. 1995.** Chlamydia-like organisms in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis Aquat Org.* 23: 153–159.

- Richards GP. 1988.** Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *J Food Prot.* 51: 218-251.
- Richards GP, Watson MA, Crane EJ, Burt IG, Bushek D. 2008.** *Shewanella* and *Photobacterium* spp. in Oysters and Seawater from the Delaware Bay. *Appl Environ Microbiol.* 74: 3323–3327.
- Ringo E, Birkbeck TH. 1999.** Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquacult Res.* 30: 73–93.
- Rippey SR. 1994.** Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin Microbiol Rev.* 7: 419–425.
- Riquelme C, Araya R, Vergara N, Rojas A, Guaita M, Candia M. 1997.** Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture.* 154: 17–26.
- Riquelme C, Araya R y Escribano R. 2000.** Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture.* 181: 25-36.
- Riquelme C E y Avendaño-Herrera RE. 2003.** Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 725-736.
- Riquelme C, Jorquera M, Rojas A, Avendaño R, Reyes N. 2001.** Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture.* 192: 111-119.
- Robles MM, Salinas OD. 1993.** Producción de larvas. En: López, E. A.; Cáceres, M. C.; Hoyos, C. F.; Rivera, Z. J.; Valdez, P. J.; Salinas, O. D.; Robles, M. M.; Serrano.
- Romalde JL, Barja JL. 2010.** Bacteria in molluscs: good and bad guys. In: Current Research, Technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Mendez –Vila ed, Spain. pp: 136-147.
- Romanenko LA, Tanaka N, Frolova GM, Mikhailov VV. 2010.** *Marinicella litoralis* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from coastal seawater. In *J Sys Evol Microbiol.* 60, 1613–1619.
- Romero J y Espejo RT. 2001.** The prevalence of non cultivable bacteria in oysters (*Ostrea chilensis*, Philippi, 1845). *J Shell Res.* 20: 1235-40.
- Romero J, García-Varela M, Lacleite JP, Espejo RT. 2002.** Bacterial 16S rRNA Gene Analysis Revealed That Bacteria Related to *Arcobacter* spp. Constitute an Abundant and Common Component of the Oyster Microbiota (*Tiostrea chilensis*). *Microb Ecol.* 44: 365–71.
- Rose JB, Epstein PR, Lipp EK, Sherman BH, Bernard SM, Patz JA. 2001.** Climate variability and change in the United States: Potential impacts on water- and foodborne diseases caused by microbiologic agents. *Environ Health Perspect.* 109: 211–221.

- Rowse AJ, Fleet GH. 1984.** Effects of Water Temperature and Salinity on Elimination of *Salmonella* and *Escherichia coli* from Sydney Rock Oysters (*Crassostrea commercialis*). *Appl Environ Microbiol.* 48: 1061-1063.
- Rozen Y, Belkin S. 2001.** Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev.* 25: 513–529.
- Ruangpan L, Kitao T. 1991.** *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *J Fish Dis.* 14: 383–88.
- Rudi K, Skulberg OM, Larsen F, Jacoksen KS. 1997.** Strain classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from variable regions V6, V7 and V8. *Appl Environ Microbiol* 63: 2593–99.
- Ruesink JL, Lenihan HS, Trimble AC, Heiman KW, Micheli F, Byers JE, Kay MC. 2005.** Introduction of non-native oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 36: 643–89.
- Saadoun I, Hameed KM. 1999.** Antibacterial activity of *Orobancha cernua* extract. *J Basic Microbiol.* 39: 377-380.
- Salles JF, De Souza FA, Van Elsas JD. 2002.** Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 68: 1595–1603.
- Salles JF, Van Veen JA, Van Elsas JD. 2004.** Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4012–20.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed. New York, pp 377-412.
- Savage D. 1977.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Rev Microbiol.* 31: 107-33.
- Schulze AD, Alabi AO, Tattersall-Sheldrake AR, Miller KM. 2006.** Bacterial diversity in marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture.* 256: 50-73.
- Scott RR. 1994.** Infection diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin Microbiol Rev.* 34: 419-25.
- Shao P, Chen Y, Zhou H, Qu L, Ma Y, Li H, Jiao N. 2004.** Phylogenetic diversity of Archaea in prawn farm sediment. *Marine Biology.* 146: 133–142.
- Schmitt S, Deines P, Behnam F, Wagne M, Taylor MW. 2011.** *Chloroflexi* bacteria are more diverse, abundant, and similar in high than in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology.* 78: 497–510.
- Sivonen K. 1996.** Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia.* 35: 12-24.
- Skulberg OM, Utkilen H. 1999.** Chapter 2. Cyanobacteria in the environment. En: *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* Chorus and Jamie Bartram

- Soergel** DWA, Dey N, Knight R, Brenner SE. **2012**. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME Journal*. 6: 1440–1444.
- Sogin** ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ: **2006**. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 12115-12120.
- Son** TH, **Fleet** GH. **1980**. Behavior of Pathogenic Bacteria in the Oyster, *Crassostrea commercialis*, During Depuration, Re-laying, and Storage. *Appl Environ Microbiol*. 40: 994-1002.
- Speksnijder** AG, Kowalchuk GA, De Jong S, Kline E, Stephen JR, Laanbroek HJ. **2001**. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*. 67: 469–472.
- Spite** AR, Wilbur AE, Cary C. **2000**. Bacterial Symbiont Transmission in the Wood-Boring Shipworm *Bankia setacea* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl Environ Microbiol*. 66. 1685-1691.
- Straub** KL, Rainey FA, Widdell F. **1999**. *Rhodovulum iodourum* sp. nov. and *Rhodovulum robiginosum* sp. nov., two new marine phototrophic ferrous-iron-oxidizing purple bacteria. *Internat J Systematic Bacteriol*. 49. 729-735.
- Sundquist** A, Bigdeli S, Jalili R, Druzin M, **Waller** S, Pullen KM, El-Sayed YY, Taslimi MM, Batzoglou S, Ronaghi M. **2007**. Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. *BMC Microbiology*. 7: 1-11.
- Sweijd** NA, Bowie R, Lopata AL, Marinaki AM, Harley EH, Cook PA. **1998**. A PCR technique for forensic, species-level identification of Abalone tissue. *J Shellfish Res*. 17: 889-895.
- Takeuchi** M, Hamana K, Hiraishi A. **2001**. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Internat J Systematic Evolutionary Microbiol*. 51: 1405–1417.
- Tall** BD, **Nauman** RK. **1981**. Scanning electron microscopy of *Cristispira* species in Chesapeake Bay oysters. *Appl Environ Microbiol*. 42:336–343.
- Tamplin** ML, **Capers** GM. **1992**. Persistence of *Vibrio vulnificus* in Tissues of Gulf Coast Oysters, *Crassostrea virginica*, Exposed to Seawater Disinfected with UV Light. *Appl Environ Microbiol*. 58: 1506-1510
- Tamura** K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. **2011**. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biology Evol*. 28: 2731-2739.
- Tanaka** R, Ootsubo M, Sawabec T, Ezurac Y, Tajima K. **2004**. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis bulmes*) determined by culture-independent techniques. *Aquaculture*. 241: 453-63.

- Taylor** MW, Radax R, Steger D, Wagner M. **2007**. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Molecular Biology Rev.* 71: 295-347.
- Thomas** F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czjzek M, Gurvan M. **2011**. Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology.* 2: 1-16.
- Thompson** JR, Marcelino LA, Polz MF. **2002**. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Res.* 30: 2083–2088.
- Thompson** JR, Marcelino LA, Polz MF. **2005**. Diversity, Sources, and Detection of Human Bacterial Pathogens in the Marine Environment. *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Edited by Belkin and Colwell, Springer, New York. Cap.2, Pp: 29-68.
- Thompson** JR, Randa MA, Marcelino LA, Tomita-Mitchell A, Lim E, Polz MF. **2004a**. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4103–4110
- Thompson** FL, Tetsuya I, Swings J. **2004b**. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biology Reviews.* 68: 403–431.
- Tinh** NTN, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. **2008**. A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain. *Marine Biotech.* 10: 1-12.
- Torkildsen** L, Lambert C, Nylund A, Magnesen T, Bergh Ø. **2005**. Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival. *Aquaculture International.* 13: 575-592.
- Tringe** SG, **Rubin** EM. 2005. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nat Rev Genet.* 6: 805-814.
- Valley** KJ, Steve Jones LA, Gómez -Chiari M, Dealteris J, Rice M. **2009**. Bacterial community profiling of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): comparison of culture-dependent and culture-independent outcomes. *J Shellfish Res.* 28: 827–35.
- Valvano** MA. **2006**. Infections by *Burkholderia* spp.: the psychodramatic life of an opportunistic pathogen. *Future Microbiol.* 1: 145–149.
- Valvano** MA, Keith KE, Cardona ST. **2005**. Survival and persistence of opportunistic *Burkholderia* species in host cells. *Curr Opin Microbiol.* 8: 99–105.
- Vanbelle** M, Teller E, Focant M. **1990**. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch Anim Nutr.* 40: 543-567.
- Vandamme** P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S. **1997** Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1188–1200.
- Van Der Maarel** MJC, Artz R E, Haanstra R, Forney LJ. **1998**. Association of Marine Archaea with the Digestive Tracts of Two Marine Fish Species. *Appl Environ Microbiol.* 64: 2894–98.

- Vasconcelos V. 2001.** Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica* 20: 45-58.
- Vasconcelos GJ, Lee JS. 1972.** Microbial flora of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Applied Microbiol.* 23: 11-16.
- Vázquez-Yeomans R, Cáceres-Martínez J, García Ortega AM. 2004.** Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología.* 75: 237-243.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen D. 2007.** Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Applied Environ Microbiol.* 71: 495–548
- Vetriani C, Jannasch HW, McGregor BJ, Stahl DA, Reysenbach AL. 1999.** Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4375– 4384.
- Wagner M, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH. 1993.** Probing activated sludge with proteobacterias specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol.* 59: 1520–1525.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007.** Naive bayes classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73: 5261–5267.
- Wang GCY, Wang Y. 1997.** Frequency of formation of chimeric molecules is a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol.* 63:4645-4650.
- Webster NS, Cobb RE, Soo R, Anthony SL, Battershill CN, Whalan S, Evans-Illidge E. 2011.** Bacterial Community Dynamics in the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile* Under In Situ and Ex Situ Cultivation. *Mar Biotechnol.* 13: 296–304.
- Ward DM, Weller R, Bateson MM. 1990.** 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* 3415: 63–65.
- Westram R, Bader K, Prübe E, Kumar Y, Meier H, Glöckner FO, Ludwig W. 2011.** ARB: a software environment for sequence data. In: (F.J. de Bruijn, ed.) *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, Wiley-Blackwell.
- Wittich WM, Wilkesh, Sinnwell V, Francke W, Fortnagell P. 1992.** Metabolism of Dibenzo-p-Dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *Applied Environ Microbiol.* 58: 1005-1010.
- Wittman RJ, Flick GJ. 1995.** Microbial contamination of shellfish: Prevalence, Risk to Human Health, and Control Strategies. *Annu Rev Public Health.* 16: 123-40.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. 1992.** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new

genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 36: 1251–1275.

Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, Hashimoto Y, Ezaki T, Yamamoto H. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol Immunol.* 34: 99-119.

Zehr JP, Mellon M, Braun S, Litaker W, Steppe T, Paerl HW. 1995. Diversity of Heterotrophic Nitrogen Fixation Genes in a Marine Cyanobacterial Mat. *Applied Environ Microbiol.* 61: 2527-2532.

Zurel D, Benayahu Y, Or A, Kovacs A, Gophna U. 2011. Composition and dynamics of the gill microbiota of an invasive Indo-Pacific oyster in the eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol.* 13: 1467–1476.