



# PAISAJE DE BIENESTAR: UNA ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS EFICACES, SEGUROS Y ACOPLADOS A LOS CULTIVOS

Cecilia Tomalá, María Sotomayor, Cristóbal Domínguez,  
Bonny Bayot, Jenny Rodríguez

**XIX CONGRESO ECUATORIANO DE  
ACUICULTURA**

*Tecnologías para una producción sustentable*



# CONTENIDO

- **Introducción**

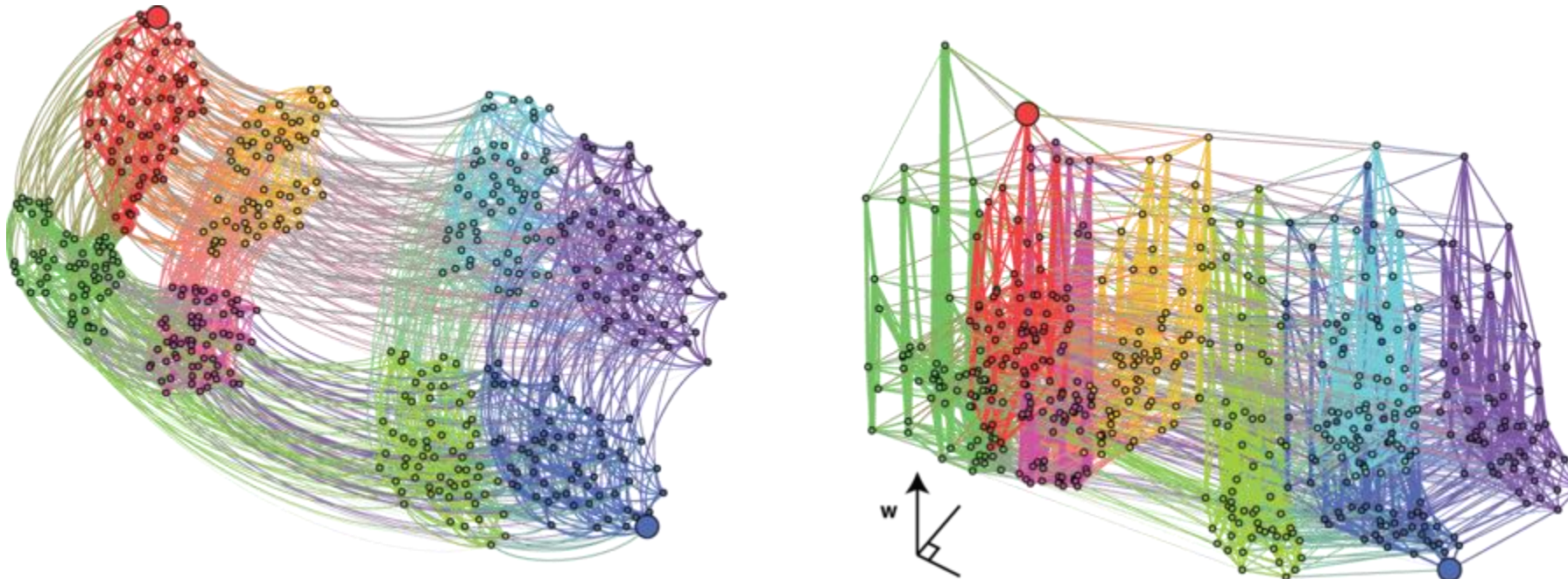
- Fitness landscape: Paisaje de aptitud
- Fitness landscape sistemas de cultivos
- AHPND y fitness landscape
- Principales vibrios en cultivo
- Probióticos

- **Metodología y Resultados**

- Colección de muestras
- Obtención de cepas
- Ensayos con cepas probióticas

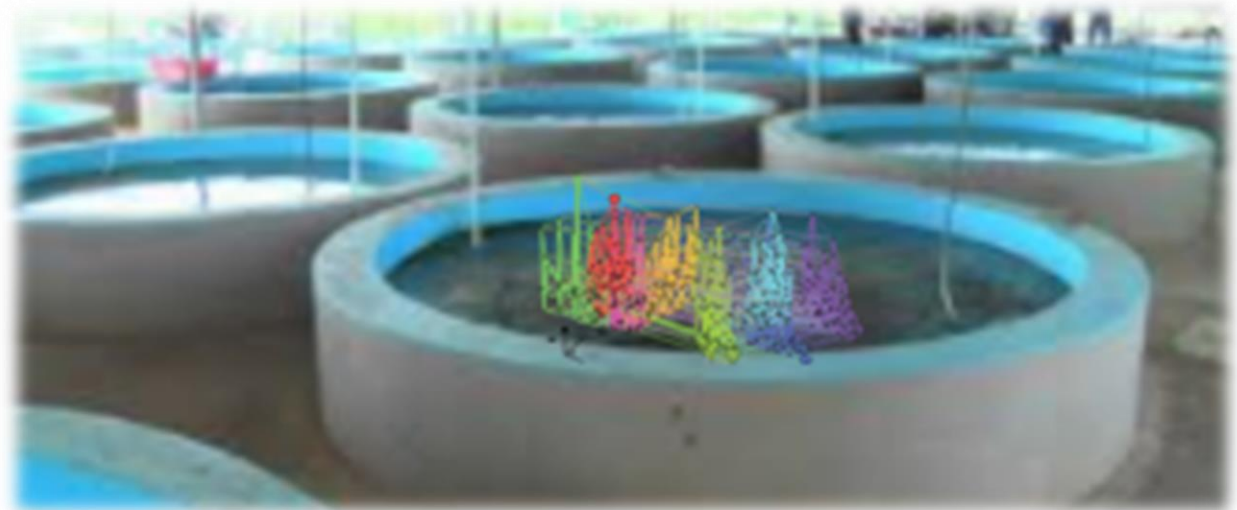
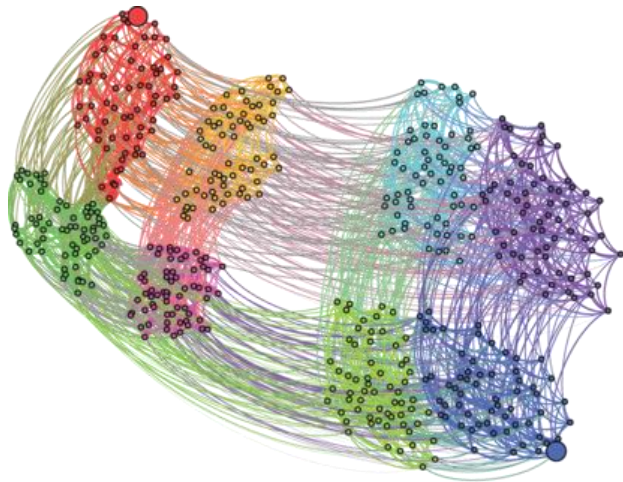
# Introducción

Fitness Landscape: Paisaje de aptitud



# Introducción

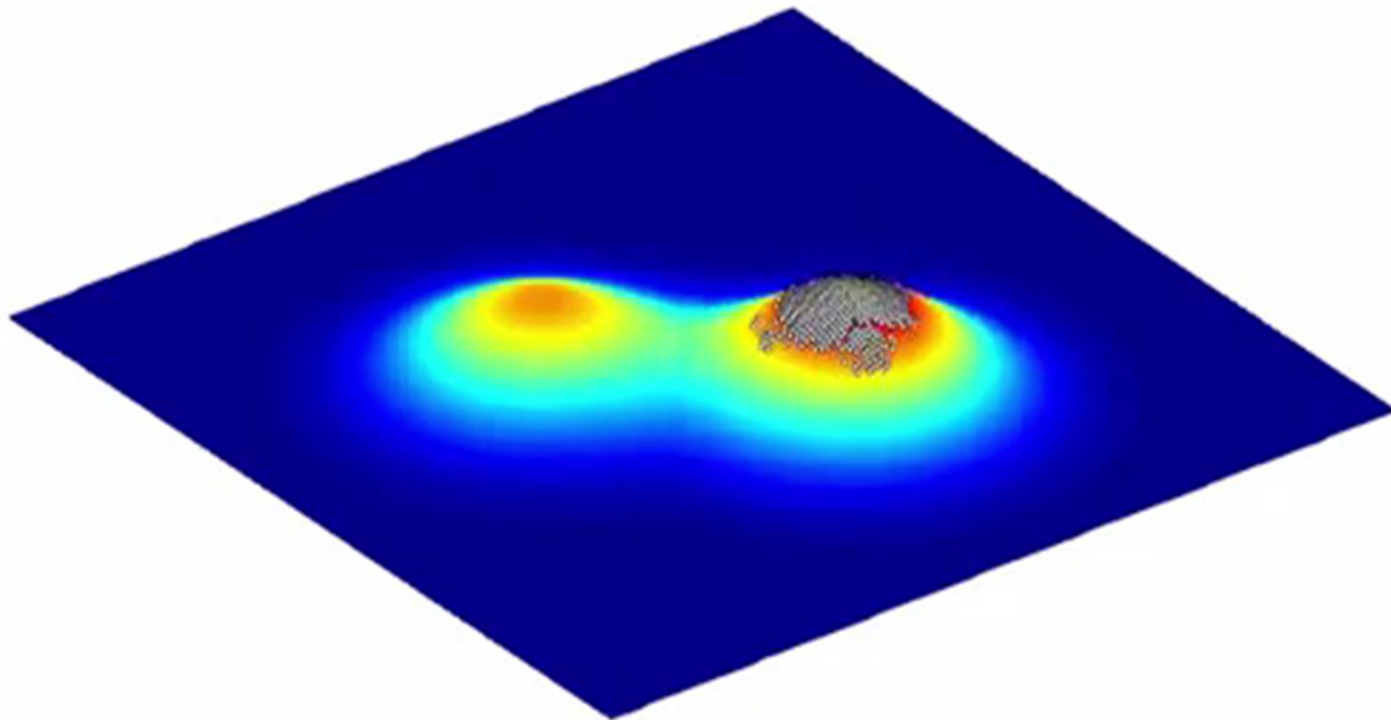
Fitness Landscape: Paisaje de aptitud





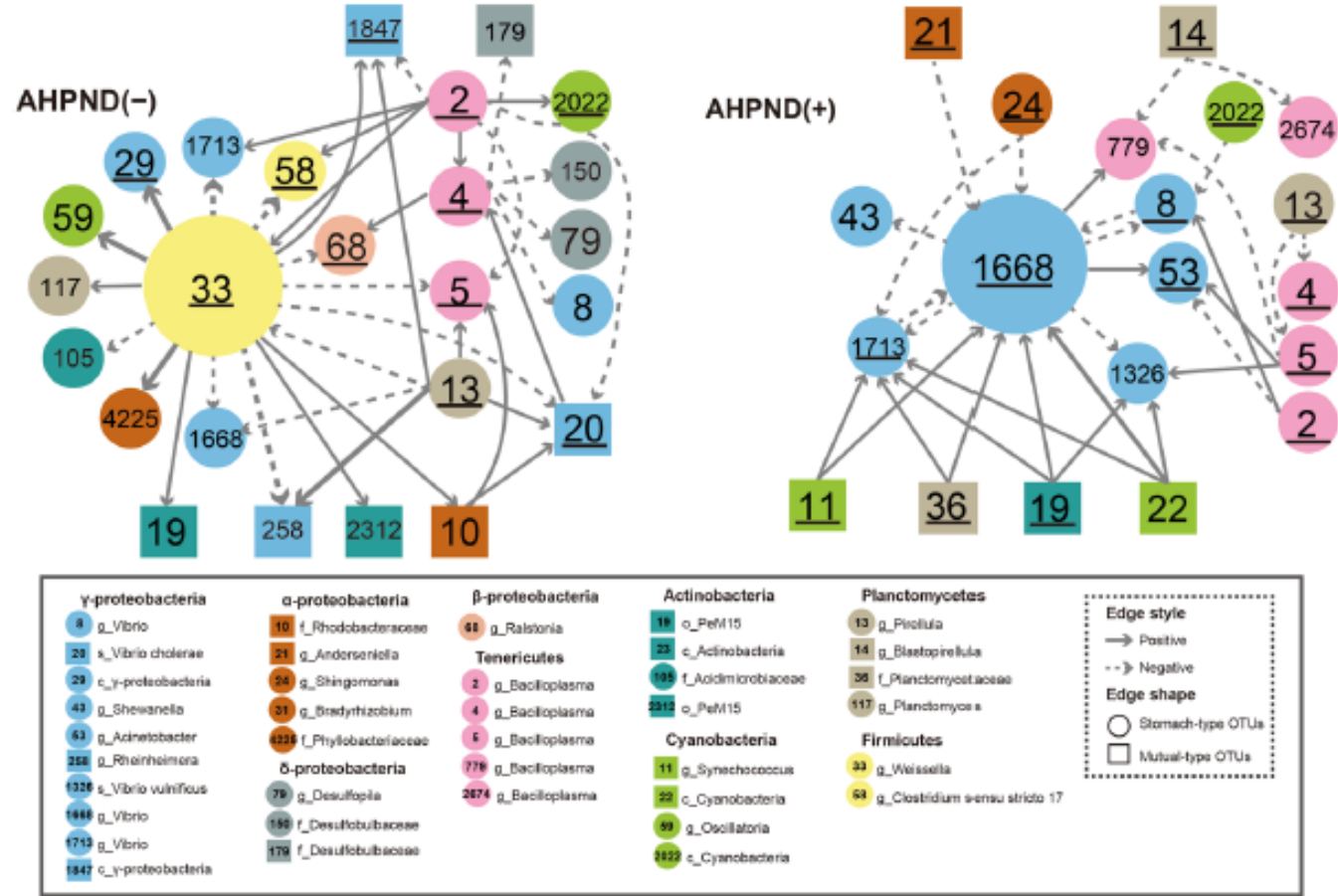
# Introducción

- Dinámica de cambio de población.





# Introducción



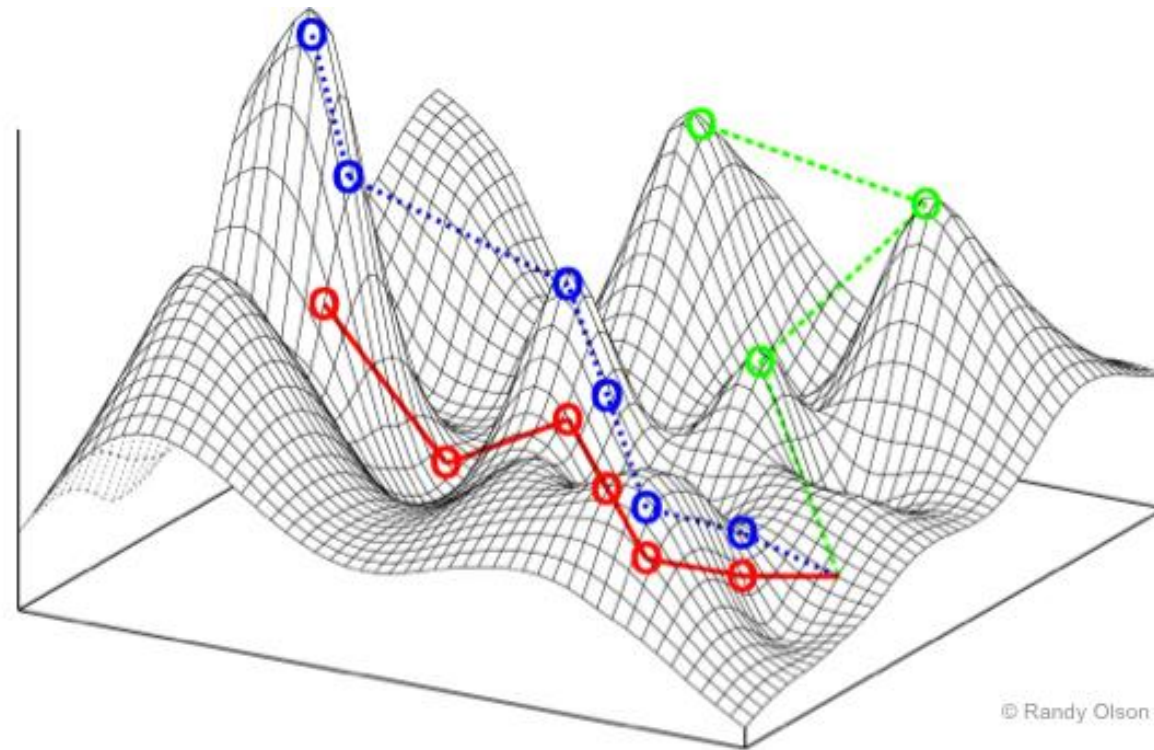
Vibrio impone su paisaje de aptitud.

Figure 6. *Vibrio*-related consensus interactions in the AHPND(-) and AHPND(+) stomach communities. The interaction strength was ranked among the top 1% of the entire network. The solid (or dashed) arrow represents the activation (or repression). The hub OTUs are underlined.<sup>1</sup>

- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. (2017). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Reports*, 7.

# Introducción

## Pasaje de aptitud en sistemas de cultivos



# Introducción



**Currently known distribution of EMS/AHPND**  
Confirmed: **China, Malaysia, Thailand, Vietnam**  
From scientific literature: **the Philippines, Mexico**  
Suspicion: **some Asian and LAC countries**

7/24/2017

International Technical Seminar/Workshop  
"EMS/AHPND: Government, Scientist and  
Farmer Responses"

24

Tests: pathogenic and nonpathogenic strains  
growth at:

- NaCl: 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 %
- pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0
- Temperature: 4.0, 20.0, 37.0, 44° C

24/06/2015

International Technical Seminar/Workshop "EMS/AHPND: Government,  
Scientist and Farmer Responses"

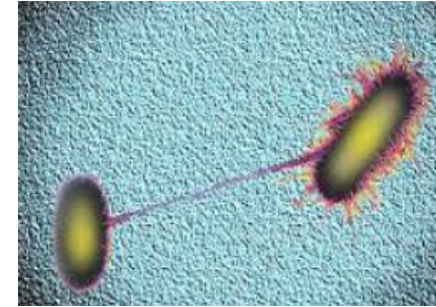
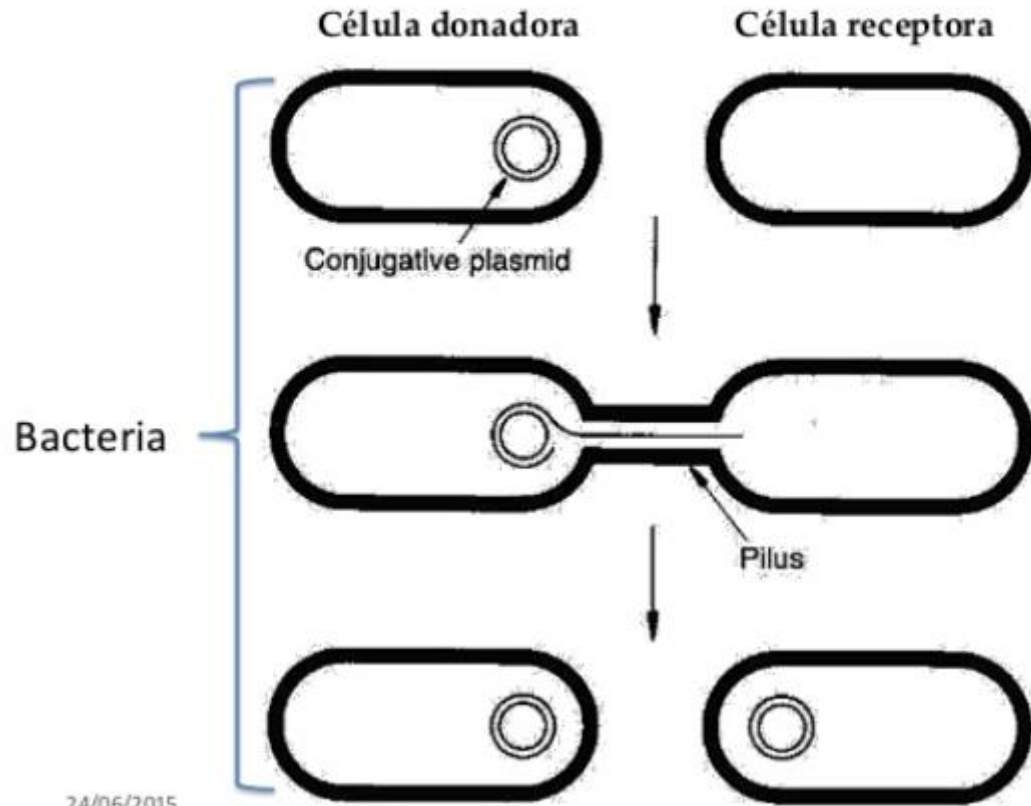
40

Sonia Soto Rodríguez, 2014



# Introducción

## Plásmidos conjugativos



= Infectar a células locales  
(Mas adaptadas al sistema de cultivo)

# Introducción

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by *pirAB*-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species

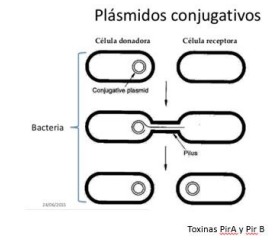
Received: 21 July 2016

Accepted: 06 January 2017

Published: 07 February 2017

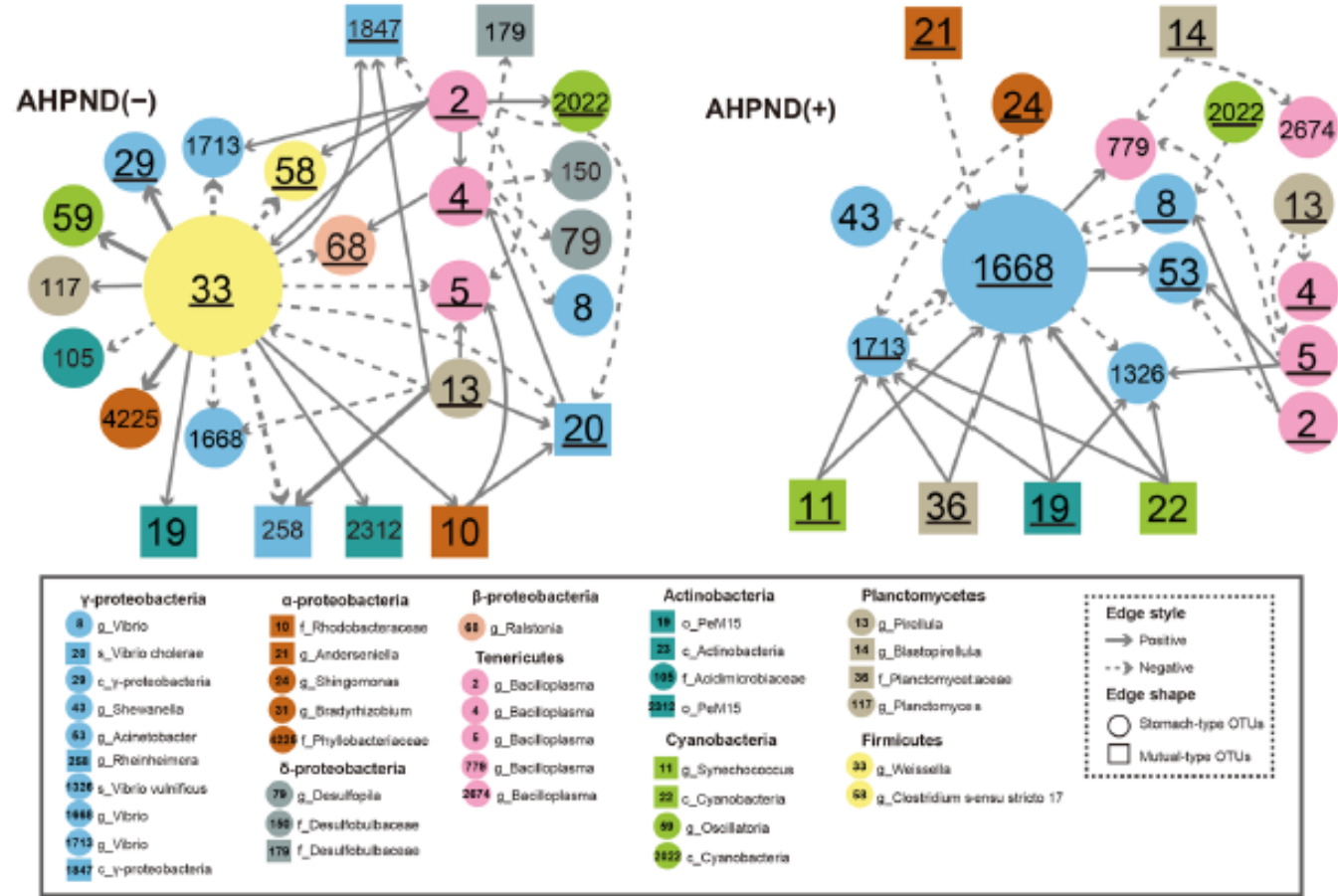
Jinzhou Xiao<sup>1</sup>, Liyuan Liu<sup>1</sup>, Yiyun Ke<sup>1</sup>, Xiefei Li<sup>1</sup>, Yunfei Liu<sup>1</sup>, Yingjie Pan<sup>1,2</sup>, Shuling Yan<sup>1,3</sup> & Yongjie Wang<sup>1,2</sup>

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is a newly emerging shrimp disease caused by *pirAB* toxins encoded by a plasmid found in *Vibrio parahaemolyticus*. The *pirAB* toxins are the homologs of the *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins. Here, we report the complete sequences of the AHPND-causing plasmid isolated from *V. owensii*, as well as those of its 11 siblings (pVH family). In addition, we also included 13 related plasmids (pVH-r family) without the *pirAB* genes isolated from a variety of species within the *Vibrio* Harveyi clade. Furthermore, the *pirAB*-Tn903 composite transposon was identified in pVH, and both ends of the transposon appeared to have inserted simultaneously into the ancestor plasmid at different sites. The homologue counterparts of *pirAB* were also detected in a non-pVH plasmid in *V. campbellii*. Taken together, our results provide novel insights into the acquisition and evolution of *pirAB* as well as related plasmids in the *Vibrio* Harveyi clade.



= Inyectar a células locales  
(Mas adaptadas al sistema de cultivo)

# Introducción



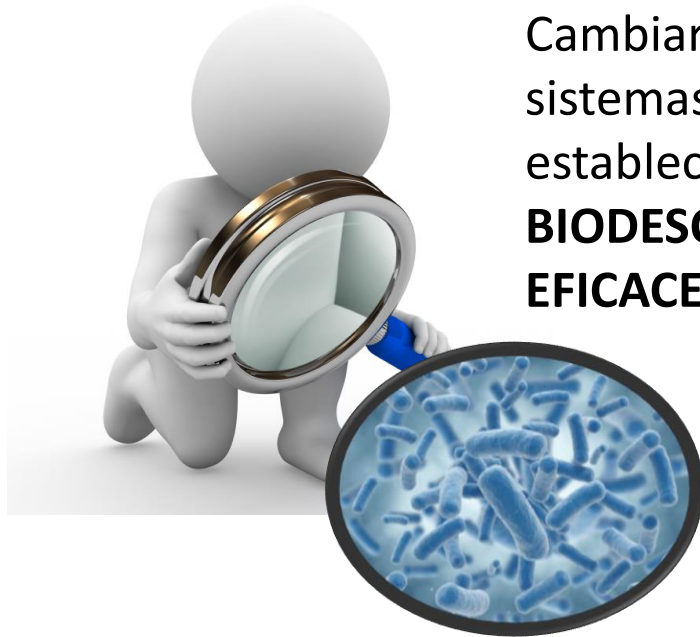
Vibrio impone su paisaje de aptitud.

Figure 6. *Vibrio*-related consensus interactions in the AHPND(-) and AHPND(+) stomach communities. The interaction strength was ranked among the top 1% of the entire network. The solid (or dashed) arrow represents the activation (or repression). The hub OTUs are underlined!

- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. (2017). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Reports*, 7.

# Introducción

Cambiar el paisaje de aptitud de los sistemas de cultivo de camarón y establecer un microbioma benéfico = **BIODESCUBRIMIENTO DE PROBIOTICOS EFICACES**





# Introducción

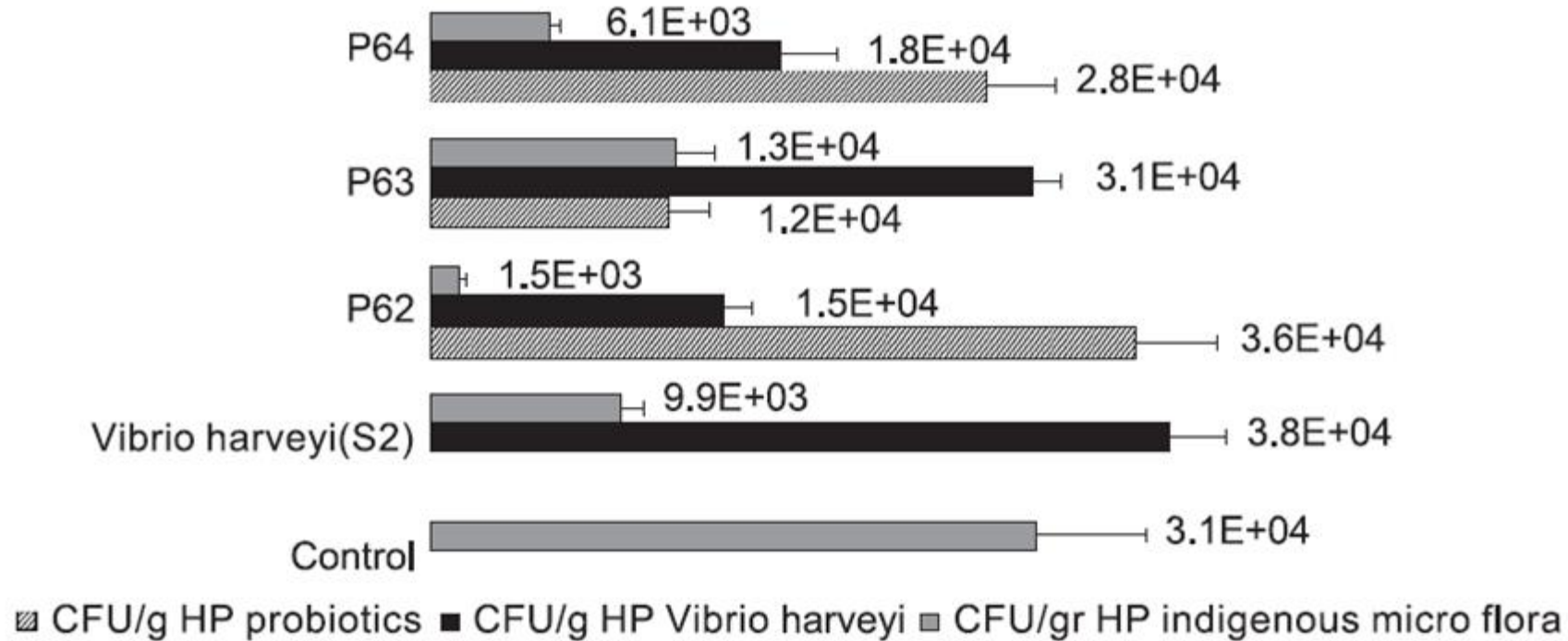
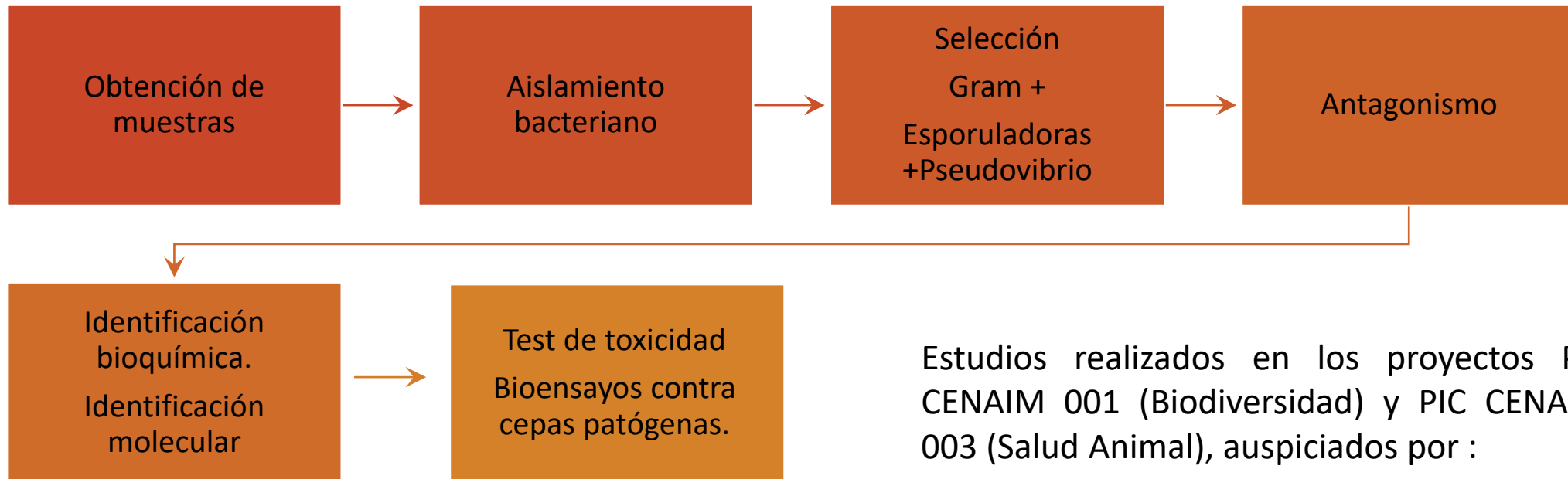


Fig. 2. Bacterial concentration reached by *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 and *Bacillus* P64 in the interaction experiment against *Vibrio harveyi* (S2), in *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas.

Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1), 1-14.

# METODOLOGÍA

## BIODESCUBRIMIENTO



Estudios realizados en los proyectos PIC CENAIM 001 (Biodiversidad) y PIC CENAIM 003 (Salud Animal), auspiciados por :



Secretaría de  
**Educación Superior,  
Ciencia y Tecnología**

# Obtención de muestras



SCUBA



10 – 15 m.



Ambientes marinos



Ambientes estuarinos

# Aislamiento bacteriano



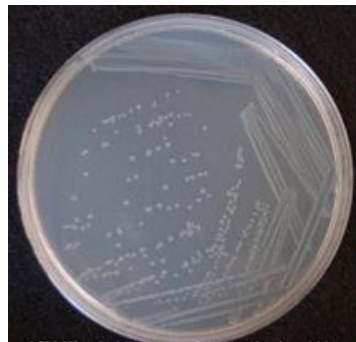
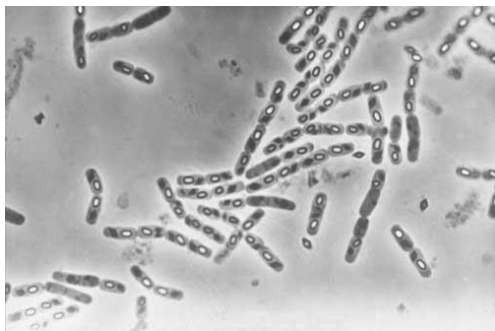
Invertebrado Marino, Sedimento e intestinos



$10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$



Diluciones seriadas



Cultivos puros



-Incubación normal  
-anaerobiosis 28°C /  
24-48 h (Bacillus)

Bacillus: Siembra en superficie y al vacío (Bacillus)  
Otras bacterias: diferentes medios de selección







# Caracterización bioquímica



Test	Componente activo	Test	Componente activo	Test	Componente activo
1 GLY	GLYcerolo	19 SOR	D-LACTosa	37 GLYG	GLIcógeno
2 ERY	ERYtritolo	MD		38 XLT	XiLiTol
DAR		20 M	Metil- $\alpha$ D-Manopiranosida	39 GEN	GENtiobiosa
3 A	D-ARAbinosio	Metil- $\alpha$ D-		40 TUR	D-TURanosa
LAR		21 MDG	Glucopiranosida	41 LYX	D-LIXosa
4 A	L-ARAbinosio	22 NAG	N-AcetilGlucosamina	42 TAG	D-TAGatosa
5 RIB	D-RIBosio	23 AMY	AMigdalina	43 DFUC	D-FUCosa
DXY		24 ARB	ARButina	44 LFUC	L-FUCosa
6 L	D-XILOsio	25 ESC	ESCulina	45 DARL	D-Arabitol
LXY		26 SAL	SALicina	46 LARL	L-Arabitol
7 L	L-XILOsio	27 CEL	D-CELObiosa	47 GNT	GlucNa
8 ADO	D-ADONitolo	28 MAL	D-MALtosa	48 2KG	2-CetoGluconato
9 MDX	Metil- $\beta$ D-Xilopiranoside	29 LAC	D-SORbitol	49 5KG	5-CetoGluconato
10 GAL	D-GALactosa	30 MEL	D-MELlibiosa		
11 GLU	D-GLUcosa	31 SAC	D-SACarosa		
12 FRU	D-FRUctosa	32 TRE	D-TREhalosa		
13 MNE	D-MamNosa	33 INU	INUlina		
14 SBE	L-SorBosa	34 MLZ	D-MeLeZitosa		
15 RHA	L-RHAMnosa	35 RAF	D-RAFinosa		
16 DUL	DULcitol	36 AMD	Almidón		
17 INO	INOsitol				
18 MAN	D-MALtosa				



Gram	Método K(OH)
Catalasa	
Oxidasa	
Esporas	



# Caracterización bioquímica



Tinción Gram

Uso de aminoácidos (arginina, ornitina y lisina)

Uso de carbohidratos (sucrosa, manosa y glucuronato)

Uso de citrato

Formación de diacetyl (VP)

Producción de indol

Determinación del metabolismo (fermentativo u oxidativo)



Gram-negativo

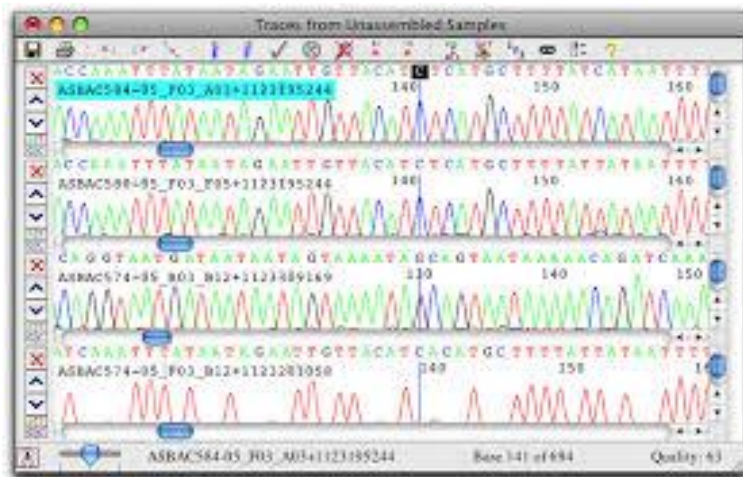


Gram-positivo

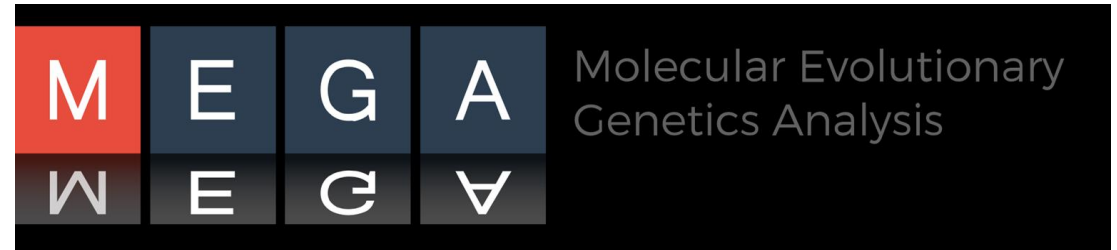


# Secuenciación y análisis filogenético

**CodonCode Corporation**  
*Better Software for DNA Sequencing*



Análisis de secuencias



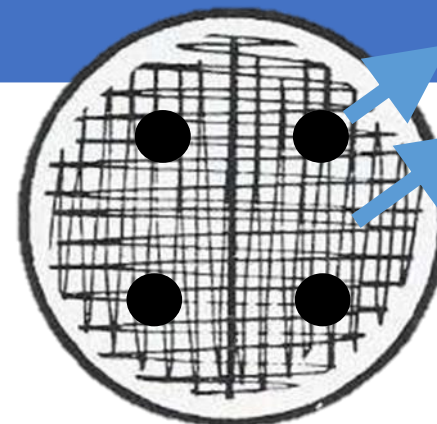
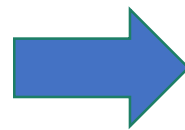
Árboles filogenéticos

# Determinación in-vitro de la bioactividad antibacteriana

Patógenos	Características
<i>V. harveyi</i>	Cepa L29, aislada local.
<i>V. campbellii</i>	Cepa luminiscente aislada de larvas de camarón que presentaron mortalidad.
<i>V. parahaemolyticus</i> cepa1	Cepa ATCC 27969, aislada de colección transmitida al humano por consumo de especies marinas contaminadas
<i>V. parahaemolyticus</i> cepa2	Aislado local de camarones juveniles que presentaron mortalidad.
<i>Pseudomona</i> <i>aureginosa</i> y <i>Aeromona</i>	Aislado local de larvas que presentaron alta mortalidad.

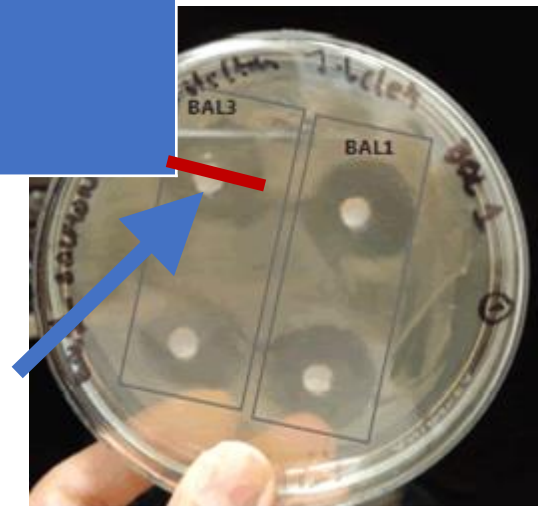
Patógenos

“Probiótica”



Patógeno

“Probiótica”





# Pruebas en *P. vannamei*

## Test de Inocuidad

Zoea	Post larvas
+ Cepas de invertebrados marinos.	Cepas de Estuario y sedimentos marinos
Control sin bacterias	Control sin bacterias

+ Se realizaron dos muestreos en diferentes tiempo



Infección contra patógenos *in-vivo*

\* Se infectaron juveniles de 0.24 gramos con cepa patógena (Protocolo *Tran et al., 2013*), ***V.parahaemolyticus*** por doce horas , con exposición de 10 minutos.

\* *Postlarvas* Infectaron con *Vibrio harveyi* a cocncentraciones  $10^6$ UFC/ml



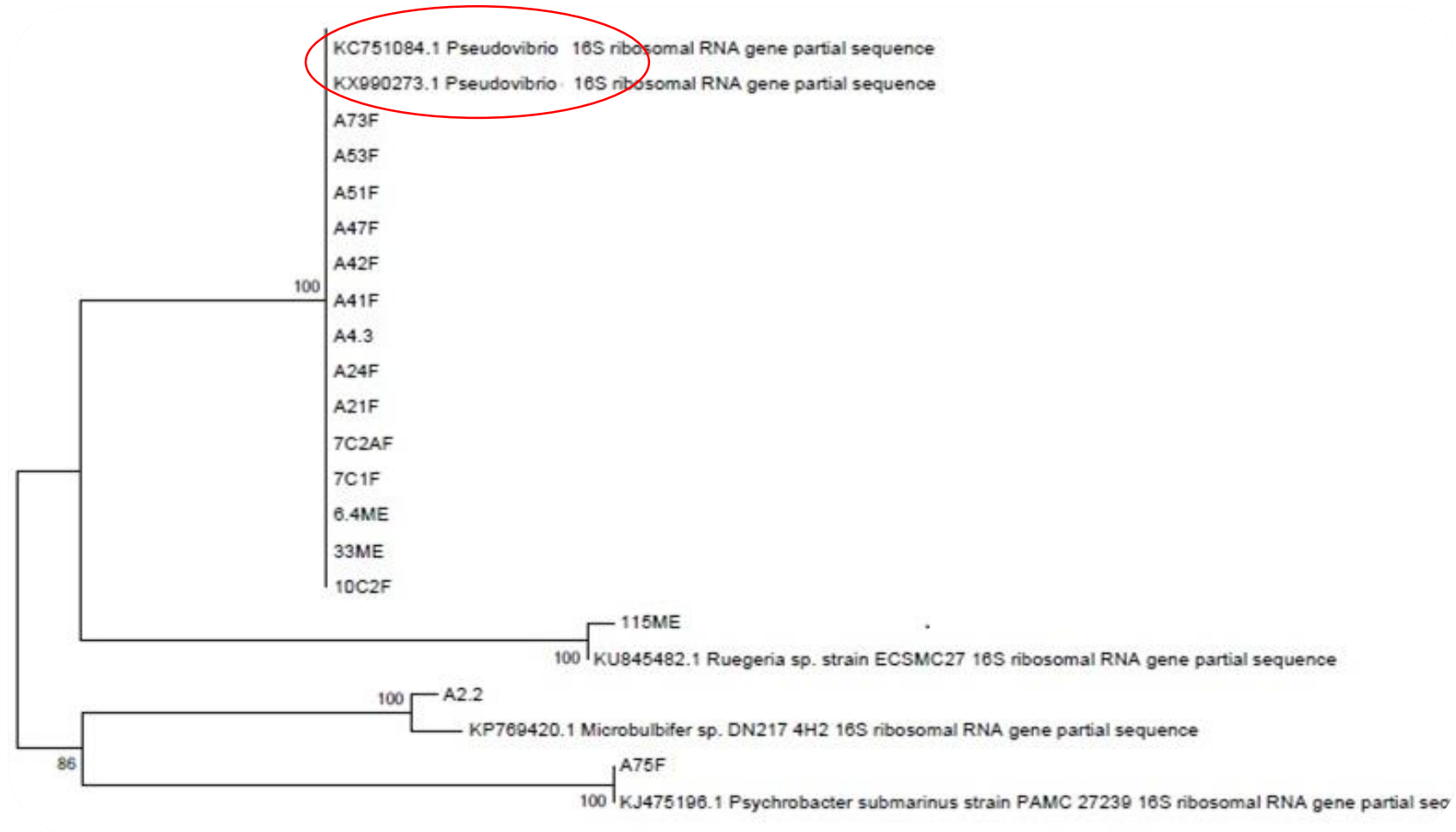
# Resultados

## Aislamiento de bacterias y selección de *cepas potencialmente probióticas*

Fuentes de cepas bacterianas	Número de cepas aisladas	Aislados <i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudovibrio</i> seleccionadas
Estanque de camarón <i>P. vannamei</i>	48	27 (3 intestino y 24 sedimento)
Estanque de policultivo <i>P. vannamei</i> y <i>Oreochromis</i> spp.	35	10 (4 intestino y 6 sedimento)
Ambientes marinos	63	47 (6 sedimento, 41 invertebrado marino)
Total		

# Resultados

## Identificación de cepas aisladas de invertebrado marino





# Resultados

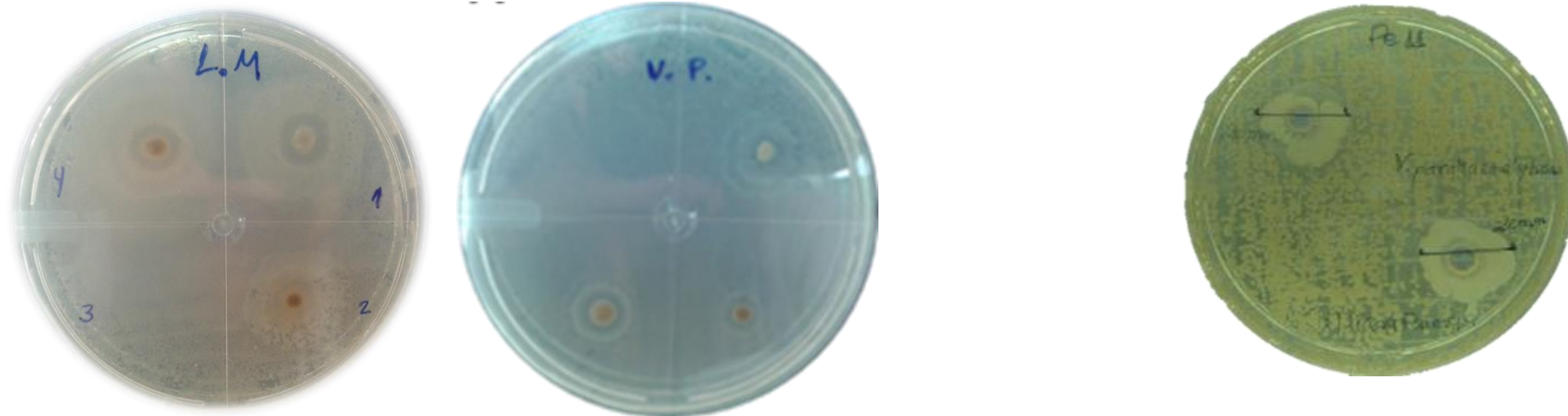
**Identificación de cepas aisladas de ambientes marinos y estuarinos.**

Código de la cepa	Especie
Pe11	<i>B amyloliquefaciens</i>
Pmrs19	<i>B licheniformis</i>
Mrs13	<i>B lentus</i>
Mrs11	<i>B micoyde</i>



# Resultados

## Pruebas de antagonismo con cepas patógenas



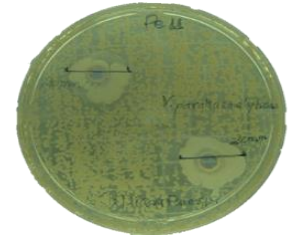
Prueba de bioactividad de *Pseudovibrio* frente a *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus*

Antagonismo *V. parahaemolyticus* código interno C15. 17.5 y cepa probiótica *Bacillus* sp. 1

# Resultados

## Pruebas de antagonismo con cepas patógenas

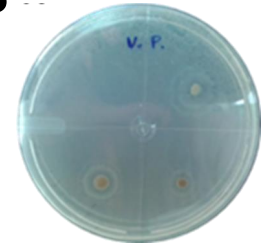
Código de la cepa	Origen de la cepa	Especie	Diámetro de halos de inhibición (mm)			
			V. parahaemolyticus	P.aeruginosa	V. campbellii	Promedio ponderado
Pe11	Sedimento marino	B amyloliquefaciens	19	8	19	16,3
Pmrs19	Policultivo	B licheniformis	20	9	10	14,9
Mrs13	Camaronera	B lentus	13	12	9	11,8
Mrs11	Camaronera	B micoyde	12	12	8	10,8



# Resultados

## Pruebas de antagonismo de *Pseudovibrio* con cepas patógenas

### Primer muestreo

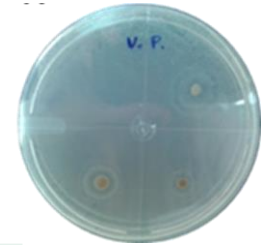


Código	Diámetro de halos de inhibición (mm)				
	V. vulnificus	V. parahaemolyticus	V.harveyi	P. aureginosa	Aeromonas
Bact 11	14	11	11	16	12
Bact 17	13	11	12	17	11
Bact 18	12	11	10	15	11

# Resultados

## Pruebas de antagonismo de *Pseudovibrio* con cepas patógenas

### Segundo muestreo



Código	Diámetro de halos de inhibición (mm)				
	V. vulnificus	V. parahaemolyticus	V.harveyi	V. parahaemolyticus	V. campbelli
6.4 ME	8	7	10	15	15
11.3 ME	9	15	15	10	13
A24	0	6	0	0	15
A43	15	11	18	8	18





# Resultados

## Inocuidad PL10 (Supervivencia)

Supervivencia de postlarvas *P. vannamei* PL30 al finalizar la prueba de toxicidad de potenciales probióticos. Promedios ( $\pm$  desviación estándar) con distintas letras son significativamente diferentes a  $P < 0.05$ , basado en el análisis de ANOVA y prueba de comparación de pares de tratamientos de Tukey.

Tratamientos	Supervivencia (%)
<b>Pe11</b>	97.5 $\pm$ 3.0 a, b
<b>Pmrs19</b>	97.5 $\pm$ 2.5 a, b
<b>Mrs13</b>	88.5 $\pm$ 13.9 a, b
<b>Pe11 + Pmrs19</b>	94.5 $\pm$ 5.5 a, b
<b>Pe11 + Mrs13</b>	97.0 $\pm$ 2.6 a, b
<b>Pmrs19 + Mrs13</b>	96.5 $\pm$ 1.9 a, b
<b>Pe11 + Pmrs19 + Mrs13</b>	79.5 $\pm$ 15 a
<b>Control sin bacterias</b>	98.5 $\pm$ 3.0 b



# Resultados

## Inocuidad Zoea (Supervivencia)

### Primer ensayo

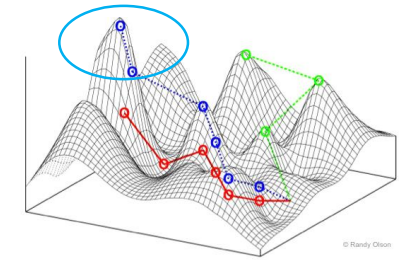
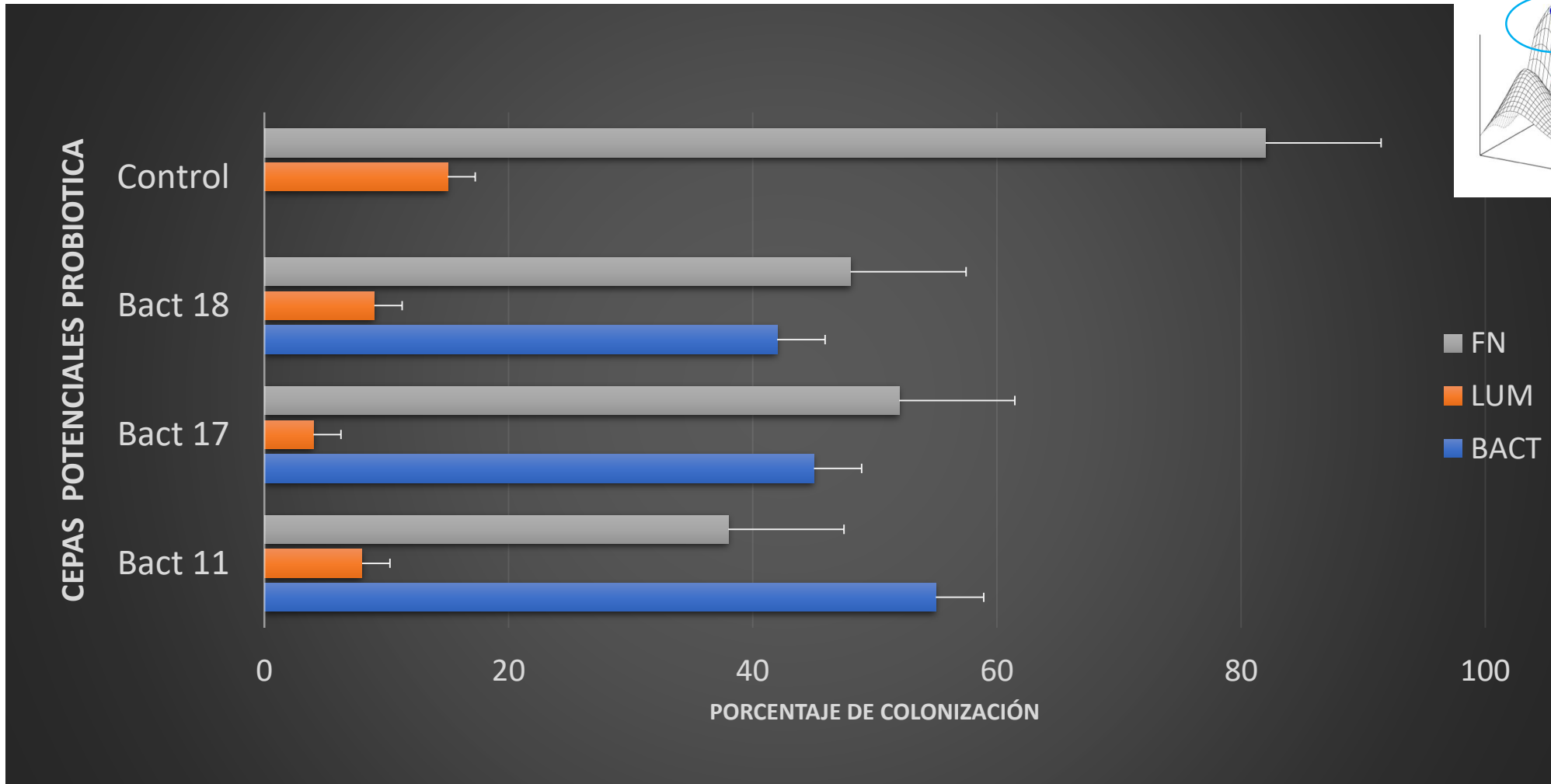
Cepas de <i>Pseudovibrios sp.</i> ( $10^6$ UFC/ml)				
Códigos	Bac 11	Bac 17	Bac 18	Control
Supervivencia (%)	98 ± 3	97,4 ± 3	96,9 ± 3	96,9 ± 4,1

### Segundo ensayo

Cepas de <i>Pseudovibrios sp.</i> ( $10^6$ UFC/ml)					
Códigos	11.3 ME	A43	6.4 ME	A24	Control
Supervivencia (%)	98 ± 4	96 ± 5	90 ± 10	94 ± 9	94 ± 5

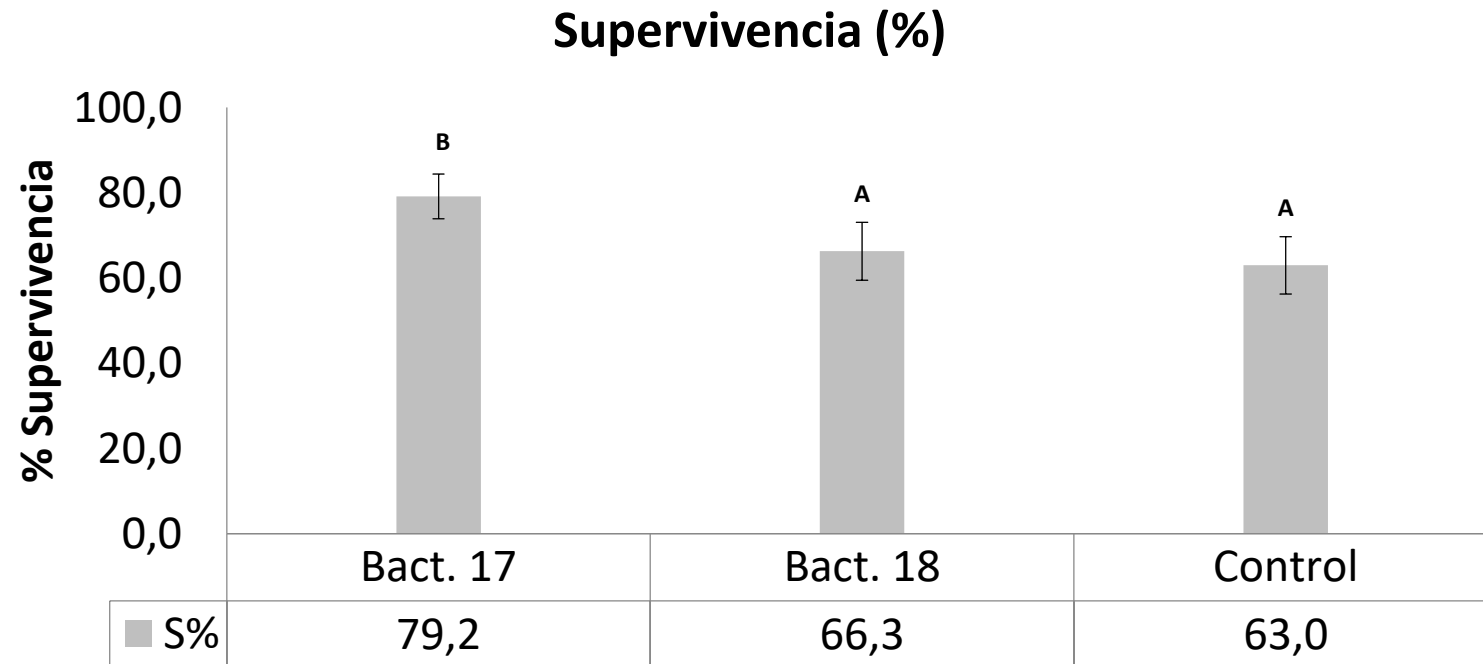
Supervivencia de Zoeas *P. vannamei* al finalizar la prueba de toxicidad de potenciales probióticos.  
Promedios (± desviación estándar)

- Capacidad de desplazar Vibrios luminiscentes in vivo en PIs de bacterias con potencial probiótico (Psuedovibrio)



# Resultados

## Cepas potencialmente probiótica en campo



Supervivencia final de cosecha. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

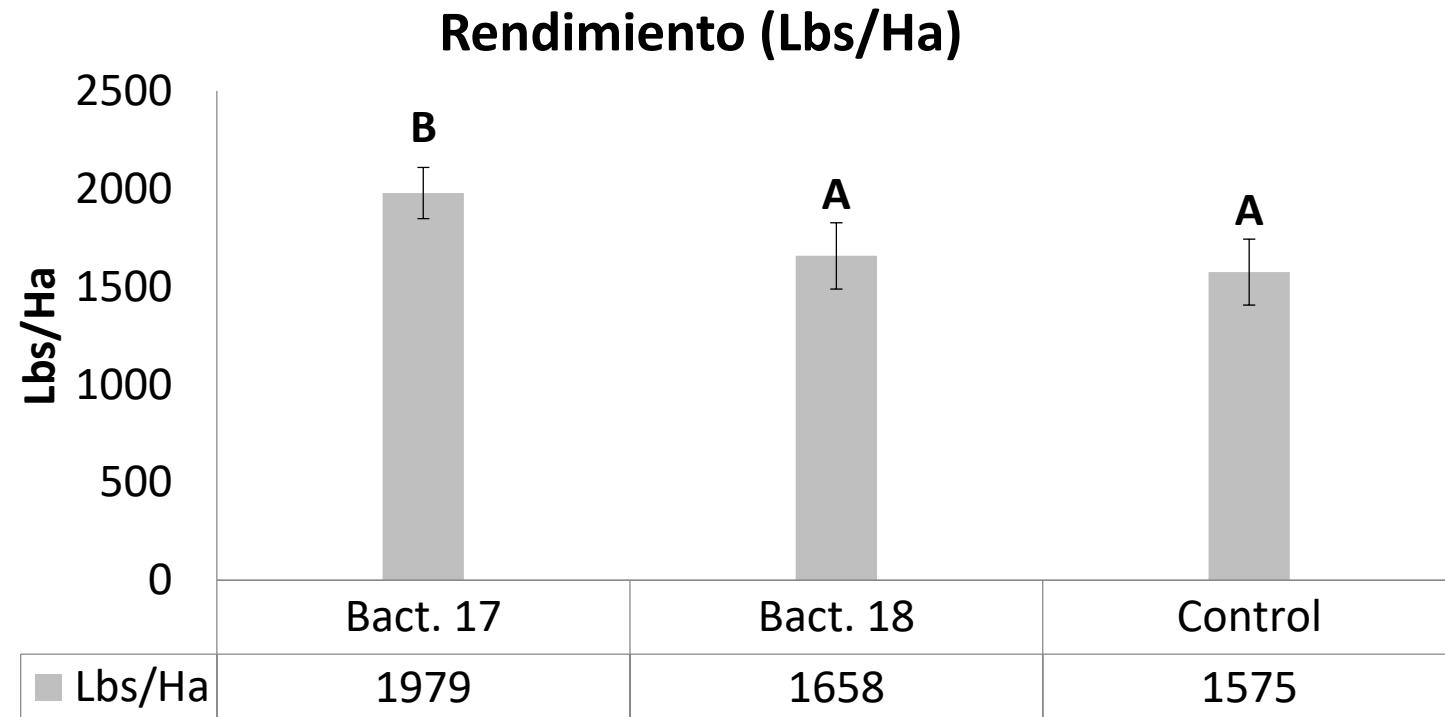




# Resultados

## Cepas potencialmente probiótica en campo

Datos de rendimiento,  
proyección de libras  
por hectárea.  
Diferentes letras  
indican diferencias  
significativas ( $p < 0.05$ )





# Conclusión

- Considerar el paisajes de aptitud permite encontrar probióticos capaces de colonizar y reproducirse en los sistemas de cultivos.
- La obtención de probióticos autóctonos puede ser una herramienta importante para el control efectivo de enfermedades bacterianas en los sistemas de cultivo de camarón del Ecuador.
- La cepa Pe11 y Bact 17, aislada del ambiente naturales, se perfila como un potencial probiótico a ser usada en los sistemas de cultivo de camarón.

# GRACIAS POR SU ATENCIÓN



## XIX CONGRESO ECUATORIANO DE ACUICULTURA

*Tecnologías para una producción sustentable*

