



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**

**Facultad De Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas  
Oceánicas y Recursos Naturales**

**“Bacteria simbiótica marina *Pseudovibrio denitrificans*  
excluye vibrios patógenos y modifica la microbiota en  
camarón”**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Magister en  
Acuicultura**

**Presentada por: CECILIA TOMALÁ BELTRÁN**

**Guayaquil- Ecuador**

**2020**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por el invaluable regalo de la vida, y por ser mi pilar fundamental, a pesar de mis errores nunca me abandona.

A mi esposo (Yohandy) e hija (Rebeca) por el apoyo incondicional en esta etapa de estudios.

A mis Padres y hermanos, en especial a mi madre que me enseñó a luchar frente a cada adversidad para alcanzar nuestras metas. Gracias por su esfuerzo, amor y apoyo incondicional, durante toda mi vida.

Agradezco al SENESCYT y a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) por el financiamiento otorgado para llevar a cabo esta investigación.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su Director Ph.D. Stanislaus Sonnenholzner, por haberme brindado la oportunidad de realizar la tesis de postgrado y culminar una etapa de desarrollo profesional.

A Ph.D. Jenny Rodriguez por creer y confiar en mí para la realización de mi tesis, y guiarme con sabiduría y constancia por el camino del conocimiento y enriquecerme no solo como profesional sino como ser humano.

A mi amiga Irma Betancourt por su apoyo y sus sabios consejos además gracias por compartir sus conocimientos.

A mis compañeros, asistentes, tesisistas del laboratorio por su colaboración en la ejecución de este trabajo.

## **DEDICATORIA**

El esfuerzo a tu corta edad apoyándome a continuar tus logros y alegrías, te convierten en mi fuente de inspiración. porque gracias a ti he culminado grandes retos, uno de ellos esta etapa, finalizar mis estudios de maestría. Gracias, hija por todo el amor y apoyo incondicional.

A mi amada hija  
Leticia Rebeca

TRIBUNAL DE GRADUACION

---

María del Pilar Cornejo Rodríguez. Ph.D.  
Decana FIMCM-ESPOL

---

Jenny Antonia Rodríguez León. Ph.D.  
Directora de tesis

---

Aminael Sánchez Rodríguez. Ph.D.  
Codirector de tesis

---

Nardy del Valle Diez García. Ph.D.  
Miembro del tribunal 1

---

Bonny Narcisa Bayot Arroyo. Ph.D.  
Miembro del tribunal 2

## **DECLARACION EXPRESA.**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral - Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

---

Cecilia Tomalá Beltrán  
CI 0920608064

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>CAPITULO 1</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	3
1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN .....	3
1.2. OBJETIVO GENERAL .....	6
1.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6
1.4. MARCO TEORICO .....	7
1.4.1. Esponjas características .....	7
1.4.2. La microbiota de las esponjas.....	8
1.4.3. Distribución de bacterias pertenecientes al género <i>Pseudovibrio</i> .....	8
1.4.4. Asociación de <i>Pseudovibrio</i> spp con eukaryotes y mecanismos utilizados para interactuar con los hospederos y sus microbiomas.....	9
1.4.6. Probióticos en acuicultura.....	12
1.4.6.1. Competencia por el espacio.....	12
1.4.6.2. Producción de sustancias inhibitorias.....	13
1.4.6.3. Actividad antibacterial de probióticos.....	13
1.4.6.4. Probióticos y competencia por productos químicos o energía disponible. 14	
1.4.6.5. Mejorando la calidad del agua.....	14
1.4.6.6. Efecto Inmunomodulador de los probióticos .....	14
1.4.7. Enfermedades en sistemas de cultivos de camarón .....	15
1.4.7.1. Mecanismos de transferencia de ADN.....	15
1.4.7.2. AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda) .....	16
1.4.7.3. Cepas causantes de AHPND .....	17
<b>CAPITULO 2</b> .....	18
<b>METODOLOGÍA</b> .....	18
2.1. Sitio de colección de muestras de esponja .....	18
2.2. Colección de muestras de esponjas .....	18
2.3. Identificación del metagenoma de esponjas marinas .....	19

2.3.1.	Análisis de la comunidad bacteriana utilizando el gen del ARNr 16S	19
2.3.2.	Procesamiento de secuencias y asignaciones taxonómicas.....	19
2.3.3.	Índices de diversidad y relación de las comunidades bacterianas con los morfotipos de esponja.....	20
2.3.4.	Potenciales géneros probióticos presentes en <i>Aplysina sp.</i> .....	20
2.4.	Caracterización e identificación de <i>Pseudovibrios denitrificans.</i> ....	20
2.4.1.	Aislamiento de bacterias .....	21
2.4.2.	Caracterización molecular de <i>P. denitrificans</i> .....	21
2.4.2.1.	Extracción y Amplificación de DNA por PCR .....	21
2.4.2.2.	Caracterización de cepas de <i>P. denitrificans</i> por RAPDs .....	22
2.4.3.	Determinación in-vitro de la actividad antivibrio de las cepas de <i>P. denitrificans</i> .....	22
2.5.	Evaluación de las cualidades de <i>P. denitrificans</i> para modular el microbioma en cultivos de camarón .....	23
2.5.1.	Evaluación de la capacidad colonizadora de <i>P. denitrificans</i> Ps17 en larvas de camarón .....	23
2.5.2.	Interacción P62 con <i>Pseudovibrio denitrificans</i> .....	23
2.5.3.	Colonización de <i>Pseudovibrio</i> en alimento.....	23
2.6.	Efecto de <i>P. denitrificans</i> Ps17 sobre juveniles de camarón <i>P.vannamei</i> desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> BA94C2.....	24
2.6.1.	Producción de <i>P. denitrificans</i> Ps17 .....	24
2.6.2.	Bioensayo con tratamientos de probióticos.....	24
2.6.3.	Desafío con <i>V. parahaemolyticus</i> BA94C2 de juveniles de <i>P. vannamei</i> tratados con <i>P. denitrificans</i> Ps11 y Ps 17.....	24
2.6.4.	Efecto de las cepas de <i>P. denitrificans</i> Ps11 y Ps17 sobre el microbiota de camarones <i>P. vannamei</i> .....	24
2.7.	Análisis estadístico de los datos de los bioensayos.....	25
3.	RESULTADOS Y DISCUSION .....	26
3.1.	Microbiota de <i>Aplysina sp.</i> .....	26
3.1.1.	Análisis metagenómico de la microbiota de la esponja <i>Aplysina spp.</i> ..	26
3.1.1.1.	Estimaciones de riqueza y $\alpha$ diversidad .....	26
3.1.1.2.	Composición de la comunidad bacteriana basada en el análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S .....	27
3.1.1.3.	Relación entre el morfotipo del huésped y las comunidades bacterianas	30

3.1.1.4.	OTUs bacterianos compartidos y específicos entre morfotipos.....	30
3.1.1.5.	Potenciales cepas probióticas presentes en <i>Aplysina spp.</i> .....	31
3.1.2.	Aislamiento de <i>Pseudovibrios spp.</i> .....	33
3.1.2.1.	Bioactividad de <i>Pseudovibrios spp.</i> .....	33
3.1.2.2.	Identificación molecular de <i>P. denitrificans</i> .....	36
3.1.2.3.	Diversidad de <i>P. denitrificans</i> (polimorfismo).....	36
3.2.	Cualidades probióticas de <i>P. denitrificans</i> .....	37
3.2.1.	Cualidades colonizadoras del simbionte marino <i>P. denitrificans</i> , <i>Ps 17</i> , en el ambiente de cultivo de camarón. ....	37
3.2.1.1.	Capacidad colonizadora de <i>P. denitrificans</i> <i>Ps11</i> Y <i>Ps17</i> en larvas de camarón. ....	38
3.2.1.2.	Interacción de <i>P. denitrificans</i> con el probiótico <i>Vibrio hepatarius</i> (P62). ....	39
3.2.1.3.	Ensayos de crecimiento de <i>P. denitrificans</i> <i>Ps 17</i> en alimento de camarón .....	40
3.2.2.	Ensayos de <i>P. denitrificans</i> y probiótico <i>Vibrio hepatarius</i> (P62) en camarones juveniles .....	41
3.2.2.1.	Análisis microbiológico de estómago e intestino.....	42
3.2.2.2.	Ensayo de desafío con <i>V. parahaemolyticus</i> BA94C2, causante de AHPND en camarones tratados con <i>P. denitrificans</i> <i>Ps17</i> y <i>Vibrio hepatarius</i> (P62) .....	42
3.2.2.3.	Microbiota del estómago de camarones tratados con <i>P. denitrificans</i> antes y después del desafío con <i>V. parahaemolyticus</i> .....	43
	CONCLUSIONES .....	52



## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Mecanismos de transferencia de ADN entre y dentro de bacterias. (A) Transducción: inyección de ADN en una bacteria por un fago. (B) Conjugación: el plásmido en una bacteria donante se transfiere a través de un pilus a una bacteria receptora; el plásmido puede integrarse en el cromosoma (1) o permanecer en el citoplasma (2); el plásmido puede transferirse entre ubicaciones citoplasmáticas y cromosómicas (3); el plásmido puede intercambiar secuencias de inserción o transposones con otros plásmidos (4) o el cromosoma. (C) Transformación: absorción de ADN desnudo del medio ambiente. Tomado de (Gyles & Boerlin, 2014) .....15
- Figura 2. La REMAPE en la provincial de Santa Elena, Ecuador (01°55, 9' S – 80°47,2' W). A) Localización de Ecuador en America del Sur (en verde).B) Localización del islote en Ecuador, C) Islote “El Pelado” cerca de las costas de Santa Elena, Ecuador. 3 .....18
- Figura 3.** Asignaciones taxonómicas en los niveles de phyla que muestran la abundancia relativa (%) de las secuencias del gen ARNr 16S de Ap\_verde, Ap\_amarillo, Ap\_morado y Ap\_café.....27
- Figura 4.** Asignaciones taxonómicas en los niveles clase que muestran la abundancia relativa (%) de las secuencias del gen del ARNr 16S de Ap\_verde, Ap\_amarilla, Ap\_morado y Ap\_cafe .....29
- Figura 5.** Asignaciones taxonómicas en los niveles de orden que muestran la cantidad de las OTUs generadas en las secuencias del gen del ARNr 16S de Ap\_verde, Ap\_amarillo, Ap\_morado y Ap\_café.....30
- Figura 6.** Análisis metagenómico en distintos morfotipos de Aplysinas. Gráficos de la microbiota de Ap\_amarilla, Ap\_verde, Ap\_café, Ap\_morada. Las variaciones explicadas se muestran en análisis de coordenadas principales.....30
- Figura 7.** Diagrama de Venn que muestra el número de OTUs compartidas y exclusivas en Ap\_Morada, Ap\_Café, Ap\_Amarilla y Ap\_verde.....31
- Figura 8.** Géneros de bacterias potencialmente probióticos encontrados en cuatro morfotipos de esponjas Aplysinas.....32
- Figura 9.** Árbol filogenético de *Pseudovibrio denitrificans*, y de los géneros Ruegeria y Microbulbifer, en base a la secuencia del gen del ARNr 16S. Para la construcción del árbol se empleó el método NJ con 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA.....36
- Figura 10.** Dendrograma que muestra el polimorfismo genético de aislados de pertenecientes presuntivamente al género *Pseudovibrio*. La relación entre los aislados se estimó en función de las proporciones de las bandas compartidas.....37

<b>Figura 11.</b> Colonización de <i>P. denitrificans</i> en estadios larvarios de camarón <i>P. vannamei</i> . <i>P. denitrificans</i> fenotipo Ps11 teñido con DAPI y fenotipo Ps17 teñido con naranja de acridina. Cada inóculo bacteriano estuvo a una concentración de $1 \times 10^6$ UFC/ml.....	39
<b>Figura 12.</b> Efecto de <i>Pseudovibrio denitrificans</i> sobre <i>Vibrio hepatarius</i> .....	40
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de <i>P. denitrificans</i> (Ps17) en alimento en combinación <i>V. hepatarius</i> (Probiótico P62).....	41
<b>Figura 14.</b> Colonización de <i>P. denitrificans</i> en juveniles (estómago).....	42
<b>Figura 15.</b> Ensayos de colonización de <i>P. denitrificans</i> con juveniles (intestino)....	42
<b>Figura 16.</b> Curvas de mortalidad de camarones juveniles tratados con <i>P. denitrificans</i> Ps17, desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> BA94C2.....	43
<b>Figura 17.</b> Microbiota del estómago de camarones juveniles tratados con <b>P. denitrificans Ps17</b> . A nivel de Orden.....	44
<b>Figura 18.</b> Géneros bacterianos encontrados en el estómago de camarones juveniles tratados con <i>P. denitrificans</i> Ps17 .....	45
<b>Figura 19.</b> Microbiota encontrado en el estómago de camarones juveniles tratados con <i>P. denitrificans</i> Ps17 y desafiados con AHPND.....	46
<b>Figura 20.</b> Distribución de los valores del índice de diversidad de Chao1 para muestras de camarones tratados <i>Pseudovibrios</i> : <b>a)</b> Camarones antes de infección con AHPND , <b>b)</b> Camarones después de infección con AHPND.....	47
<b>Figura 21.</b> Beta diversidad para muestras de camarones tratados con <i>P. denitrificans</i> <b>a)</b> Camarones antes de infección con AHPND , <b>b)</b> Camarones después de infección con AHPND. ....	48
<b>Figura 22.</b> Mapa de calor que muestra la abundancia de comunidades bacterianas detectadas en cultivo de camarón producidos con <i>P. denitrificans</i> (Ps11, Ps17, Mezcla),.....	50
<b>Figura 23.</b> Mapa de calor que muestra la abundancia de comunidades bacterianas detectadas en cultivo de camarón producidos con <i>P. denitrificans</i> (Ps11, Ps17, Mezcla) y desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> .....	51

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Vibrios patógenos de camarón utilizados en los ensayos de bioactividad de las cepas de <b>P. denitrificans</b> .....	22
Tabla 2. Halos de inhibición de Pseudovibrio frente a cepas patógenas de camarón	34
<b>Tabla 3.</b> Pesos promedios de camarones juveniles tratados con <i>Pseudovibrio denitrificans</i> . .....	41

## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
±	Desviación estándar
µg	Microgramos
µl	Microlitro
AHPND	Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
g	Gramos
Kg	Kilogramos
L	litro
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MRSA	meticilina
NaCl	Cloruro de sodio
NRPS	Péptido Sintetasa No Ribosómicos
nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
OD	Densidad óptica
UCF	Unidades formadoras de colonias
TDA	ácido tropoditético
PL	Postlarvas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TBE	Buffer de Tris -ácido orico- edta
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
Z1	Zoea 1
Z2	Zoea 2
M	Misis

## RESUMEN

Combatir la vibriosis como la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), en sistemas de cultivo de camarón es una prioridad en la actualidad para asegurar la sostenibilidad de la industria. Una estrategia para combatir vibriosis es mediante cepas probióticas de origen marino. Los complejos microbiomas de invertebrados marinos pueden marcar pautas en la construcción de holobiontes saludables. Cepas bacterianas del simbiote marino *Pseudovibrio* presentes en esponjas marinas, son metabólicamente muy versátiles y capaces de crecer en muy diversos sustratos, incluso en aguas oligotróficas. *Pseudovibrio* posee además, capacidades antimicrobianas que lo convierten en una herramienta muy eficaz para combatir vibriosis en camarón. Bajo la hipótesis de que *Pseudovibrio* constituya una especie clave en las defensas antibacteriana de las esponjas, en una primera etapa se estudió la microbiota de esponjas del género *Aplysina*, hospedero natural de *Pseudovibrio spp.* El análisis de comunidades microbianas identificadas demostró una microbiota rica y compleja relacionada al color del morfotipo de la esponja. Los vibrios fueron minoritarios en todas las esponjas, indicando la capacidad de la microbiota de las esponjas para mantener bajos niveles de este género potencialmente patógeno. En *Aplysina* se determinó la existencia de varias cepas potencialmente probióticas, tales como *Aeromonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudovibrio*, principalmente en morfotipos de *Aplysinas* de color morado y verde. Las cepas del género *Bacillus* se presentaron en *Aplysinas* de color amarillo. En términos de bacterias cultivables, la gran mayoría pertenecieron al género *Pseudovibrio*. Se seleccionaron 41 aislados con características bioquímicas y moleculares de *Pseudovibrio denitrificans*. La diversidad fenotípica de *P. denitrificans* se confirmó mediante bioquímica, bioactividad y RAPDs. Doce bacterias (30%) expresaron alta bioactividad (zona de exclusión  $\geq 10$  mm) contra *V. Parahaemolyticus* (Ba94), *V. campbelli*, *V. vulnificus*, *V. Parahaemolyticus* CI *V. harveyi*, 21 (48%) mostraron bioactividad frente a uno a cuatro de los patógenos analizados y 9 (22%) no mostraron bioactividad considerable (halos  $<$  de 10mm o sin inhibición). Mediante RAPDs se evidenciaron 16 grupos polimórficos. Entre los aislados más activos, se escogieron Ps11 yPs17 para ensayos *in vivo* de colonización, exclusión de *V. parahaemolyticus* en alimento (cepa BA94). En un bioensayo de desafío con juveniles se evaluó el efecto sobre la supervivencia y la composición microbiana en el tracto digestivo de *P. vannamei*, En estos ensayos se utilizó además el vibrio probiótico P62 (*Vibrio hepatarius*). *P. denitrificans* fue capaz de colonizar los camarones y de excluir *V. parahaemolyticus* en alimento. En el bioensayo, luego del desafío contra *V. parahaemolyticus*, la supervivencia de los camarones tratados fue significativamente ( $p < 0,02$ ) superior a los del control, 50 % para el tratamiento Ps17 y para el tratamiento Ps11. La composición microbiana analizada mediante microbiología clásica mostró que *P. denitrificans* puede convivir y actuar

sinérgicamente con P62. Los dos probióticos modificaron la diversidad bacteriana de los tractos digestivos de camarón. En los camarones del control se encontraron ordenes bacterianos Vibrionales y Rhodobacteriales, considerados "indicadores de enfermedad". Además se evidencio Flavobacteriales, Acidimicrobiales y Alteromonadales considerados indicadores de salud, en los camarones tratados. Los ambientes marinos poseen diversidad de microorganismos con capacidades biosintéticas que pueden ser potenciales probióticos en acuicultura. La diversidad metabólica y funcional, además de sus propiedades antimicrobianas hacen de *P. denitrificans* una herramienta muy útil para modificar la microbiota de los ambientes de cultivo de *P. vannamei*.

# CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

En Ecuador el cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* es la principal actividad acuícola, siendo el camarón el primer producto no petrolero más exportado. Durante 2018 se exportaron 1018071,91 libras, equivalentes a 2'933.877,352 de USD (CNA, 2018). La producción camaronera mundial no ha estado exenta de dificultades y problemas patológicos. En años recientes las enfermedades provocadas por bacterias del género *Vibrio* han tomado impulso en los sistemas de cultivo de camarón. Entre las vibriosis más agresivas está la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés), provocada por toxinas (PirA/PirB) codificadas en plásmidos que tienen la particularidad de transferirse de manera horizontal entre los vibrios (Lightner et al., 2012). La AHPND provoca mortalidades de hasta el 100%, durante los primeros 10-30 días de cultivo en piscina y pocos días después de los primeros signos de la enfermedad. Los vibrios tienen una alta capacidad de adaptación a los sistemas de cultivos marinos (Thompson, Thompson, Iida, & Swings, 2016). Vandenberghe et al., (1999) indicaron que los sistemas de cultivo de camarón están dominados por vibrios. En efecto los vibrios son muy exitosos creciendo en materia orgánica, abundante en los sistemas de cultivo y en las cutículas, abundantes en los sistemas de cultivo de camarón, en particular en las larviculturas (Thompson et al., 2016). En su mayoría, los vibrios encontrados en las larviculturas de camarón pertenecen al clado *Vibrio harveyi* (Sotomayor et al., 2019), grupo taxonómico caracterizado por poseer especies muy virulentas. Estudios recientes utilizando metagenómica muestran que *V. parahaemolyticus* (perteneciente al clado de *V. harveyi*) modifica el microbiota de los cultivos disminuyendo la diversidad bacteriana en favor de los vibrios (Chen, Ng, Wu, Chen, & Wang, 2017). Combatir las vibriosis que afectan a los cultivos de camarón ha conllevado al uso indiscriminado de antibióticos (Kanjana et al., 2017). Sin embargo, al paso de los años la pobre eficacia de los antibióticos y las restricciones a su uso impuestas por el mercado, empujan a la industria acuícola a buscar otras estrategias para el manejo de las vibriosis. Los objetivos de estas estrategias incluyen, la inhibición de microorganismos patógenos, bloqueo de toxinas, aumento de la respuesta inmune (Pandiyani 2013), estrategias antivirulencia en base a productos naturales (Coutteau, 2014; Reverter, Bontemps, Lecchini, Banaigs, & Sasal, 2014) y la modulación del microbiota del tracto digestivo y del ambiente de cultivo, usando probióticos (Zorriehzahra et al., 2016). El probiótico *Vibrio alginolyticus* (Ili) es capaz de modular la microbiota del ambiente de cultivo de las larviculturas de camarón, dominadas por vibrios del clado harveyi (Restrepo, Bayot, Bajaña, Betancourt, &

Reyes Muñoz, 2019). Los ambientes de piscina de tierra presentan mayor diversidad en la microbiota y requiere la búsqueda de especies clave para modularlos.

La gran diversidad de cepas probióticas que existen en el mercado para acuicultura, pertenecen al género *Bacillus* (Kuebutornye, Abarike, & Lu, 2019), aisladas de suelo y agua y en muchas ocasiones de ambientes terrestres (Vargas-Albores et al., 2017). Independientemente de los beneficios de estas bacterias, en ocasiones su éxito en los cultivos marinos es cuestionable, debido en parte a los factores ambientales (bacterias terrestres en medio marino) y al poco éxito de estos probióticos compitiendo contra vibrios en los cultivos (Vargas-Albores et al., 2017). Los invertebrados marinos, constituyen una fuente poco explorada de probióticos para controlar vibriosis en camarón (Ninawe & Selvin, 2009). Se sabe que los organismos marinos tienen una relación específica con numerosos microorganismos. Las esponjas marinas poseen una microbiota rica. Las relaciones de las esponjas marinas y la microbiota marina, que puede servir como alimento o convivir de forma permanente o temporal con su hospedero son muy complejas (Hentschel, Piel, Degnan, & Taylor, 2012). Parece probable que las esponjas hayan alojado microorganismos asociados desde la primera aparición del filo hace más de 500 millones de años (Wilkinson, 1984). La microbiota asociada a las esponjas está ubicada tanto intracelularmente como extracelularmente (Nicole S. Webster & Thomas, 2016). Algunas comunidades se encuentran en las capas externas de esponjas y otras residen permanentemente en el mesohyl de la esponja, lo que apunta a la estrecha interacción entre el huésped y las bacterias asociadas (Nicole S. Webster & Thomas, 2016). Debido a que las asociaciones esponja-microbios están ampliamente distribuidas entre los taxones de esponja y en algunos casos, de manera exclusiva, se cree que muchas de estas asociaciones son verdaderamente mutualistas y permanentes (Schmitt et al., 2012). Muchos roles fisiológicos y ecológicos se han atribuido a los microorganismos endosimbiontes de las esponjas. Estos incluyen mejoras nutricionales estabilización del esqueleto de esponja producción de metabolitos secundarios defensa (Pita, Rix, Slaby, Franke, & Hentschel, 2018).

Las esponjas pueden albergar una gran variedad de microorganismos, incluidas las cianobacterias (Burgsdorf et al., 2015), diversas bacterias heterotróficas (Graça et al., 2013), algas unicelulares (Jensen & Pedersen, 1994), hongos (G. Wang, 2006) y zoochlorellae (Jensen & Pedersen, 1994) e incluso bacterias del género *Vibrio* sin que estas últimas provoquen enfermedad en las esponjas (Alex, Silva, Vasconcelos, & Antunes, 2013). Otro género bacteriano encontrado en asociación recurrente con esponjas en todo el mundo es el género *Pseudovibrio*. Este género es metabólicamente muy versátil y capaz de crecer en muy diversos sustratos, incluso en aguas oligotróficas. Fukunaga et al., (2006); Kraft et al., (2014) indican la presencia de distintas subpoblaciones de *Pseudovibrio* en el mismo huésped, sugiriendo que un cierto grado de diferenciación metabólica permita que múltiples cepas ocupen diferentes nichos y coexistan dentro del microbioma del huésped.



*Pseudovibrio spp* mantiene una asociación benéfica con tejidos saludables de la esponja, poseyendo además compuestos antimicrobianos contra patógenos de la esponja. Los *Pseudovibrios* son reconocidos simbioses con capacidad de producir compuestos antimicrobianos que ayudan al bienestar de la esponja (Flemer et al., 2012). Una ventaja adicional de *Pseudovibrio spp*, es que pueden ser cultivados.

El uso biotecnológico de las bacterias de esponjas se complica por las dificultades de cultivo *ex situ*. La mayoría de las bacterias simbioses de las esponjas no pueden ser cultivadas en su totalidad con técnicas tradicionales (Uria & Piel, 2009). Los esfuerzos para caracterizar la estructura de la microbiota asociada a esponjas se han beneficiado del advenimiento de las llamadas Tecnologías de Secuenciación Masiva de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés) y entran en el campo de la metagenómica. En estos estudios, el ADN total del microbioma (la microbiota y todos sus genes) asociado a una esponja (metagenoma) es extraído y amplificado con cebadores específicos para marcadores genéticos con resolución taxonómica (Kennedy et al., 2010; Verhoeven, Kavanagh, & Dufour, 2017). Un estudio de metabarcoding permite entonces conocer la distribución de especies microbianas asociadas a una esponja (estructura de la microbiota), como estas especies se ensamblan e inferir el posible rol de la microbiota para el bienestar del holobionte (el organismo y su microbiota). En los últimos años se han llevado a cabo múltiples esfuerzos encaminados a profundizar en las características estructurales e.j. composición de especies, su abundancia, y características funcionales e.j producción de compuestos bioactivos, del microbioma asociado a esponjas (Baruah, Norouzitallab, Phong, Smagghe, & Bossier, 2017; Kang, Seo, & Park, 2015; Penesyan et al., 2011; Nicole S. Webster & Thomas, 2016). Estas observaciones señalan, el fuerte potencial de las bacterias simbioses cultivables de las Aplysinas como probióticos para el control de vibriosis en camarón.

Esponjas de la familia Aplysinidae son abundantes en la Reserva Marina el Pelado (REMAPE). Estudios previos indican que entre los géneros bacterianos cultivables de la esponja Aplysina están *Pseudovibrio* y *Vibrio* (Ardile Tapia & Rodriguez Leon, 2015). *Pseudovibrios* spp aislados de Aplysina son muy potentes tanto contra los vibrios de la propia esponja como contra los vibrios patógenos de camarón (Ardile Tapia & Rodriguez Leon, 2015; Domínguez-Borbor et al., 2019). Las cualidades metabólicas y simbióticas de *Pseudovibrio* spp, así como sus propiedades antivibrio, sugieren el posible rol de *Pseudovibrio* spp como “key species” en el mantenimiento de la composición holobionte de la esponja y sus defensas antibacterianas. Observaciones previas indican que las propiedades antibacterianas de *Pseudovibrio* son estimuladas por la presencia de vibrios, en efecto en ensayos de inhibición competitiva más que un halo de inhibición, lo que se observa es una placa de lisis bacteriana que crece de manera sostenida conforme pasan los días (Ardiles, Domínguez). El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de *P. denitrificans* como herramienta para modular la microbiota de *P. vannamei*, mitigando el efecto de los vibrios. Para realizar esto, se trabajó con dos enfoques, el primero estudiar la microbiota asociada a la esponja *Aplysina* sp utilizando metagenómica y técnicas

tradicionales de cultivo bacteriano. Este enfoque permitió comprender el ensamblaje de la microbiota de *Aplysina*, y dilucidar la presencia de especies claves como bacterias simbiotes potencialmente probióticas, esclareciendo la composición de un holobionte marino saludable. Mediante microbiología tradicional se aislaron y caracterizaron varias cepas de *P. denitrificans*, el simbiote cultivable mayoritario de *Aplysina*. En el segundo enfoque se utilizó *P. denitrificans* como herramienta principal para modular la microbiota del ambiente de cultivo en juveniles de *P. vannamei*. este enfoque incluyó la presencia del vibrio probiótico *Vibrio hepatarius* (P62), para estimular las cualidades antibacterianas de *Pseudovibrio*. Además P62 coloniza hepatopáncreas de camarón y degrada materia orgánica. La eficacia de *P. denitrificans* para el camarón se verificó recurriendo a técnicas microbiológicas, metagenómica y supervivencia de juveniles luego del desafío con *V. parahaemolyticus*.

## **1.2. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el microbioma de *Aplysina spp*, a fin de seleccionar probióticos entre las bacterias cultivables con potenciales aplicaciones biotecnológicas en acuicultura.

## **1.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Caracterizar el microbioma asociado a esponjas marinas mediante metagenómica estructural
- Evaluar la simbiosis entre camarón y *Pseudovibrio denitrificans* (Ps17).
- Acondicionar el paisaje adaptativo de tanques de cultivo de larvas de camarón a fin de asegurar el éxito reproductivo de *Pseudovibrio denitrificans* (ps17) como probiótico, mitigando el dominio de *Vibrio parahaemolyticus* en sistemas de cultivos de camarón.

## **1.4.MARCO TEORICO**

### **1.4.1. Esponjas características**

Las esponjas (Filo Porifera) son metazoarios acuáticos, sésiles, muy antiguos, que datan desde hace 600 millones de años, según sugieren relojes moleculares calculados para la divergencia filogenética de eumetazoos, así como evidencia fósil (Yin et al., 2015). Su estatus primitivo, ha hecho que las esponjas sean animales versátiles para colonizar los bentos marinos, pues se les puede encontrar viviendo a cualquier latitud o profundidad de ambientes de agua tanto salada como dulce. Aunque sus sitios de preferencia son las zonas tropicales, como los arrecifes caribeños y los litorales no contaminados (Brusca 2003). Ecológicamente, desempeñan un rol muy importante en los nichos que habitan, como: guarida y alimento para otros organismos bentónicos, agentes preventivos de la erosión de los arrecifes y animales participes en procesos biogeoquímicos. Por ejemplo: el ciclo del nitrógeno, carbono y sílice (Díaz et al., 2001; Gatti et al., 2002; Fiore et al., 2013). Otra peculiaridad de las esponjas es que poseen células totipotentes, que pueden cambiar de función según las necesidades de la esponja. Entre las funciones que pueden desempeñar están las siguientes: actividad fagocítica (realizada por arqueocitos), actividad reproductiva (oocitos y espermatocitos), porocitos (células en forma de canal), lofocitos (células encargadas de generar espongina o fibras de colágeno, material que ocupa un gran volumen de la esponja) y esclerocitos (células encargadas de generar espículas que conforman el esqueleto porifera.

Anatómicamente, se describen a través de tres capas: el pinacodermo (capa externa), el mesohilo (capa media) y el coanodermo o espongocele (capa interna). El pinacodermo, se compone de células en forma de placa conocidas como pinacocitos. Esta capa presenta series de orificios pequeños, denominados “ostiolos”, los cuales se pueden abrir o cerrar como válvulas para dar paso al flujo de agua que la esponja filtrará para alimentarse. Por otra parte, la capa media o mesohilo, es un espacio interno entre el pinacodermo y el coanodermo que está compuesto por espongina (fibras de colágeno) y espículas (estructuras en forma de aguja compuestas por sílice o carbonato de calcio), las cuales generan una matriz en la que se encuentran flotando células propias de la esponja, así como microorganismos simbioses de la misma. Por su parte, el coanodermo, está compuesto por células flageladas conocidas como coanocitos, las cuales le sirven a la esponja para bombear agua a su interior, y establecer un sistema de flujo (Taylor et al., 2007).

Existen 3 formas de organización celular: asconoide, siconoide y leuconoide. Asconoide y siconoide son las formas más simples de crecimiento. Se caracterizan por poseer un pinacodermo y coanodermo compuesto de una sola capa de células, las cuales forman la estructura de un tubo ya sea de manera continua (asconoide), o plegada (siconoide). Su mesohilo no abarca mucho volumen de tal manera que el flujo del agua es directo a través de los porocitos. Por el contrario, la forma leuconoide es más compleja, en este tipo de crecimiento el mesohilo es más grueso, y los coanocitos se organizan para formar compartimentos interconectados entre sí, por los cuales se hará pasar el agua y se capturarán partículas pequeñas para transferirlas al mesohilo

donde se encuentran los arqueocitos, que son células encargadas de la digestión de la esponja, entre otras cosas (Taylor et al., 2007). Dependiendo de la clase de esponja, se presentarán las distintas formas de crecimiento, y estas se clasifican según el tipo de esqueleto que presenten. Hay cuatro clases, estas son: Calcárea que son esponjas con un esqueleto compuesto por espículas de calcio, esta clase suele presentar las formas asconoides y siconoides; Hexactinélida, también conocidas como esponjas vítreas por poseer espículas síliceas, pueden presentar las formas siconoides o leuconoides; Demospongiae, que pueden presentar espículas de sílice o una mezcla de estas con espongina (fibras de colágeno) conformando una organización leuconoide; y Homoscleromorfa, esponjas con un esqueleto variable (con o sin espículas de sílice), de crecimiento leuconoide (Gazave et al., 2011).

#### **1.4.2. La microbiota de las esponjas**

Las esponjas marinas son los organismos que albergan la mayor cantidad de microbios viviendo en simbiosis con ellas, sus microbiomas pueden ocupar hasta el 50% de su biomasa, por lo que se les considera como un organismo holobionte. Un holobionte es una unidad funcional compuesta por el huésped (la esponja) y las comunidades microbianas que residen en el (Webster y Thomas, 2016). Los microorganismos que típicamente componen las comunidades simbiotes de esponjas son: bacterias, arqueas, microalgas, y hongos (Thomas et al., 2010). Tanto las esponjas como los corales albergan una gran diversidad de microorganismos y desempeñan papeles fundamentales en la ecología de los mares. Los microorganismos asociados con esponjas pueden representar más de un tercio del peso corporal del animal, y dentro de ellos, las bacterias pueden alcanzar la considerable densidad celular de  $10^9$  células /  $\text{cm}^3$  de tejido, que es alrededor de tres órdenes de magnitud más alta que la observada en las aguas marinas superficiales (Nicole S Webster & Thomas, 2016).

El papel fundamental que juegan las esponjas y los corales en el mantenimiento de la salud de los océanos subraya la importancia de comprenderlos como holobiontes para proteger la biodiversidad y la función de estos actores ecológicos clave. (Nicole S Webster & Thomas, 2016). Los microbiomas de las esponjas son asombrosamente diversos y cubren más de 50 phylas microbianos y miles de unidades taxonómicas operativas (Thanigaivel, Chandrasekaran, Mukherjee, & John Thomas, 2016; Nicole S Webster & Thomas, 2016). Por lo tanto, se necesitarán esfuerzos combinados que abarquen tanto el estudio de la biología de los grupos bacterianos individuales asociados como el estudio de la ecología del holobionte.

#### **1.4.3. Distribución de bacterias pertenecientes al género *Pseudovibrio***

Se Además de encontrarse recurrentemente asociado con varios invertebrados marinos, también se han detectado cepas de *Pseudovibrio* en sedimentos marinos y estuarinos, agua de mar, muestras de petróleo, sistemas de tratamiento de aguas residuales y mesocosmos de humedales (Fang et al., 2014; Hosoya & Yokota, 2007b; D. Zhang et al., 2016). *Pseudovibrio* ha sido encontrado en varias especies de invertebrados. Cabe destacar que se ha descrito que estas bacterias están asociadas

con las algas Rhodophyta y Embryophyta (Blanchet et al., 2017; Penesyan et al., 2011) y con nueve phylas de animales, incluidas más de 15 esponjas de diferentes géneros. Se ha detectado *Pseudovibrio* en phylum Cnidaria (corales y medusas), y Chordata (tunicados), Annelida (gusanos de fuego); Bryozoa; Equinoderma (pepinos de mar) Artrópodos (cangrejos y camarones); Platyhelminthes (Lombrices) y Mollusca (almejas) (Romano, 2018). Geográficamente, estas bacterias tienen una amplia distribución que va desde las regiones templadas a las polares, con la mayoría de las cepas obtenidas de Irlanda, Brasil, Ecuador y el sudeste asiático.

#### **1.4.4. Asociación de *Pseudovibrio* spp con eukaryotes y mecanismos utilizados para interactuar con los hospederos y sus microbiomas**

Los *Pseudovibrios* están relacionados tanto a huéspedes sanos y enfermos. La versatilidad metabólica de *Pseudovibrios* le permitirá aprovechar una comunidad bacteriana cambiada al ocupar nuevos nichos disponibles. Así tenemos, Moreira et al., (2014) aisló cepas de *Pseudovibrio* en corales escleractinianos blanqueados. Además se observó mayor abundancia de *Pseudovibrio* en corales mantenidos en acuarios y afectados por el síndrome de gelatina marrón (Sweet, Bulling, & Cerrano, 2015). Por el contrario, un estudio de la composición del microbioma durante el desarrollo del síndrome de necrosis esponjosa en *Callyspongia* (*Euplacella*), la pirosecuenciación reveló que un ribotipo afiliado a *Pseudovibrio* era dominante en tejidos sanos, con una reducción en abundancia en tejidos moderadamente sanos, y ausente en las partes expuestas de la esponja (Sweet et al., 2015). De manera similar, la pirosecuenciación detectó *Pseudovibrio* spp. en dos especies de coral independientemente de la edad del animal y el estado de salud (Chiou et al., 2010; Williams, Brown, Putschim, & Sweet, 2015). Curiosamente, varios aislados de *Pseudovibrio* inhibieron fuertemente los posibles patógenos esponjosos del género *Bacillus* y los patógenos de coral *Vibrio coralliilyticus* y *Vibrio owensii* (Esteves, Cullen, & Thomas, 2017; Raina et al., 2016; Vizcaino et al., 2010). Estos datos sugieren que *Pseudovibrio* spp. no solo está presente en animales sanos, sino que también pueden proteger al huésped de posibles patógenos mediante la configuración de la composición del microbioma del huésped.

En el mesohilo de las esponjas se encuentran la mayoría de las bacterias asociadas a ella (Nicole S Webster & Thomas, 2016). La cepa bacteriana de *Pseudovibrio* puede residir en el interior o estar firmemente unidas a las células de esponja (N. S. Webster & Hill, 2001). Así tenemos, *Pseudovibrio* detectados en el mesohilo de esponjas (Bauvais et al., 2015; N. S. Webster & Hill, 2001) y en fracciones material en la esponja *R. odorabile* (N. S. Webster & Hill, 2001). El modo de transmisión de los simbiontes entre esponjas aún no está claro, y lo mismo es cierto para las especies de *Pseudovibrio*. Enticknap et al (2006) mostraron que las bacterias similares a *Pseudovibrio* se enriquecieron particularmente en las larvas de la esponja *M. laxissima*, lo que sugiere una transmisión directa desde la línea parental a la progenie (transmisión vertical) de estos microbios dentro de sus huéspedes. Esta especie de esponja es vivípara; por lo tanto, no se puede excluir que las bacterias similares a

*Pseudovibrio* se hayan adquirido del medio ambiente (transmisión horizontal). De hecho, como lo señaló Enticknap (2006) teniendo en cuenta las impresionantes tasas de filtración de las esponjas, incluso las bacterias presentes en el agua de mar en abundancias muy bajas podrían ser adquiridas por los adultos y a su vez colonizar las larvas temprano en su desarrollo.

Los simbioses de esponjas pueden adoptar mecanismos para manipular el comportamiento del huésped y evitar la digestión (Nicole S Webster & Thomas, 2016). Los simbioses *Pseudovibrios* codifican una gran diversidad de sistemas utilizados para interactuar con las células esponjosas, evadir los sistemas de defensa y la digestión, y colonizar tanto las células huésped como el espacio extracelular (Alex & Antunes, 2015; Bondarev et al., 2013; Romano, Schulz-Vogt, González, & Bondarev, 2015). Se han detectado tres sistemas que ayudan a *Pseudovibrio* en la interacción con sus huéspedes. Estos sistemas son sistemas de secreción de tipo III (T3SS) y tipo VI (T6SS). proteínas similares a toxinas, y proteínas que contienen dominios similares a eucariotas (ELD). La T3SS y T6SS inducen modificaciones en los comportamientos procariontes o eucariotas (Costa et al., 2015). Así por ejemplo, muchas bacterias patógenas interfieren tanto con la fagocitosis celular eucariota como con la respuesta inmune, permitiendo que las bacterias evadan los mecanismos de defensa del huésped y, a su vez, colonicen sus células y tejidos (Costa et al., 2015; Romano, Schulz-Vogt, González, & Bondarev, 2015). De manera similar, se ha descrito que las proteínas similares a las toxinas están involucradas en la adhesión y penetración en las células huésped y cumplen un papel antagonista contra los procariontes y los eucariotas (Oliver, Degnan, Burke, & Moran, 2010).

Muchos aislados de *Pseudovibrio* tienen propiedades antagonistas contra una gran variedad de bacterias patógenas en humanos y organismos acuáticos. La capacidad antagonista de *Pseudovibrio* spp., esta dada por los compuestos antimicrobianos que produce. Esta capacidad antimicrobiana es beneficioso para los anfitriones, protegiéndolos de posibles patógenos. Así mismo los *Pseudovibrios* pueden proporcionar los anfitriones un suministro externo de vitaminas (Verluis et al., 2018). Basados en la versatilidad metabólica descrita, es probable que exista más de un tipo de interacción entre *Pseudovibrio* spp. y sus anfitriones (Romano, 2018).

#### **1.4.5. *Pseudovibrio* spp. son una fuente prometedora de nuevos compuestos bioactivos**

Los *Pseudovibrio* poseen propiedades antagonistas contra una amplia variedad de microorganismos, incluidos *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Vibrio harveyi*, *Vibrios parahaemolyticus* y *Clostridium difficile* (Domínguez-Borbor et al., 2019; Kennedy et al., 2014; Margassery, Kennedy, O' Gara, Dobson, & Morrissey, 2012; O' Halloran et al., 2011). Además de ser antagonistas poseen otras bioactividades adicionales en los últimos años. Así tenemos que extractos no purificados aislados de la esponja *Suberites domuncula*,

mostraron actividades antibacterianas, angiogénicas, hemolíticas y citotóxicas contra líneas celulares eucariotas (Sertan-De Guzman et al., 2007). Además, los aislados de la esponja *Aplysina gerardogreeni* mostraron actividad antiincrustante contra bacterias y microalgas (Aguila-Ramírez et al., 2014). Así mismos compuestos aislados de *Pseudovibrio* sp. inhibieron el asentamiento larvario del percebe *Balanus amphitrite*. Estas moléculas mostraron rendimientos antiincrustantes comparables a los de un biocida comercial, pero mantuvieron un menor grado de toxicidad (K. L. Wang et al., 2015)

Varias moléculas han sido aisladas de *Pseudovibrios*. Por ejemplo moléculas antiincrustantes derivadas de di (1H-indol-3-il) metano, nunca habían sido detectados en una alfaproteobacterium (K. L. Wang et al., 2015). Recientemente, se aislaron cinco alcaloides indólicos adicionales de la cepa de agua de mar *P. denitrificans* BBCC725 (Rodrigues et al., 2017). La actividad antibacteriana asociada con las cepas de *Pseudovibrio* a menudo se ha atribuido al ácido tropoditético (TDA) del metabolito que contiene azufre (Harrington et al., 2014; Penesyan et al., 2011). Este es un derivado de tropolona, producidos en su mayoría por los miembros del clado Roseobacter. TDA posee propiedades anticancerígenas (Wilson, Wang, Gitai, & Seyedsayamdost, 2016). Otro metabolito aislado contiene azufre, 2 metiltio-1,4-naftoquinona (MTN), de la cepa de esponja D1 (Müller et al., 2004). MTN es médicamente interesante porque causó una fuerte inhibición tanto de la angiogénesis como de la proliferación de células tumorales de vertebrados (Müller et al., 2004). Uno de los primeros compuestos aislados de una cepa afiliada a *P. denitrificans* fue el pigmento rojo heptil prodigiosina, que mostró actividad contra *Stafilococcus aureus* (Sertan-De Guzman et al., 2007). Los compuestos relacionados con la prodigiosina son de gran interés porque tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antipalúdicas y antivirales. Este descubrimiento fue notable porque estas moléculas nunca se han descrito en la clase Alphaproteobacteria. Sin duda, uno de los hallazgos más llamativos fue la identificación reciente de alcaloides derivados de bromotirosina múltiple en un cultivo de cepa *P. denitrificans* Ab134, originalmente aislado del demosponge *Arenosclera brasiliensis*. Estos tipos de compuestos mostraron propiedades antibacterianas, antivirales y anticancerígenas (Nicacio et al., 2017).

*Pseudovibrio* presenta además capacidades biosintéticas. Por ejemplo, Riesenfeld et al. demostró que la comunidad bacteriana asociada con el tunicado *Synoicum adareanum*, que es la fuente del potente macrólido antitumoral palmerólido A, (Riesenfeld, Murray, & Baker, 2008). Así mismo cepa derivada de esponja Ac17 mostró fuertes propiedades de silenciamiento del quorum-quenching (Saurav et al., 2016). Finalmente, un estudio molecular reveló la presencia del gen *phzE* en la cepa AB108, que estaba estrechamente relacionada con *P. ascidiaceicola* y aislada de esponjas mediterráneas (Schneemann, Wiese, Kunz, & Imhoff, 2011). La presencia de este gen con capacidades bioactivas desencadenó diversos estudios genómicos en *Pseudovibrio* en busca de genes biosintéticos de metabolitos secundarios (Alex & Antunes, 2015; Bondarev et al., 2013; Naughton, Romano, O’Gara, & Dobson, 2017;

Versluis et al., 2018). Se han identificado varios genes biosintéticos como terpeno, policétido sintetasa (PKS), péptido sintetasa no ribosómicos (NRPS), bacteriocina y lactosona de homoserina. Naughton (2017). Existen cepas de *Pseudovibrios* estrechamente relacionadas que no producen los mismos genes biosintéticos. La ausencia o presencia de estos genes biosintéticos puede ser dada por la interacción con el huésped y su microbioma como la diversidad de productos naturales potencialmente producidos (Naughton et al., 2017; Versluis et al., 2018). La caracterización química de los metabolitos secundarios es un proceso lento, pero es importante tener en cuenta que a menudo los procedimientos estándar utilizados para el cultivo de estas cepas pueden limitar la expresión de sus compuestos.

#### **1.4.6. Probióticos en acuicultura**

Los probióticos han sido utilizados en acuicultura como una estrategia alternativa al uso de antibióticos en el manejo de enfermedades acuáticas. Inicialmente la acuicultura marina ha utilizado especies bacterianas de origen terrestre. Estas cepas de origen terrestre tiene bajo éxito, debido a que el crecimiento de las cepas bacterianas dependen del entorno que las rodea (Ninawe & Selvin, 2009). Cepas bacterianas de origen marino aisladas de agua de cultivo e intestinos de camarones peneidos (Chumpol, Kantachote, Nitoda, & Kanzaki, 2017; Dawood, Koshio, Abdel-Daim, & Van Doan, 2018). han sido utilizadas con éxito en cultivos acuícolas. Así tenemos varios géneros como *Vibrio*, *Bacillus* (Gullian, Thompson, & Rodriguez, 2004; Kanjana et al., 2017; Nimrat, Suksawat, Boonthai, & Vuthiphandchai, 2012; Xie et al., 2013), han sido utilizadas con éxito como probióticos. El uso de bacterias probióticas, basado en el principio de exclusión competitiva, y el uso de inmunoestimulantes son dos de los métodos preventivos más prometedores desarrollados en la lucha contra las enfermedades durante los últimos años. Además, las bacterias probióticas podrían producir algunas enzimas digestivas, que podrían mejorar la digestión de los camarones, mejorando así la capacidad de resistencia al estrés y la salud de los camarones.

Los fármacos de la actualidad han sido extraídos de microorganismos de ambiente marino (Selvin et al. 2010) y posiblemente puede ser el mejor contribuyente de bacterias probióticas en acuicultura. Los endosimbiontes bacterianos marinos están surgiendo como una fuente potencial para el desarrollo de nuevos probióticos (Ninawe & Selvin, 2009). La investigación está en progreso para establecer bacterias marinas asociadas a esponjas como fuente potencial de nuevos probióticos para camarones (Domínguez-Borbor et al., 2019). Se encontró que la Actinobacteria marina endosimbiótica *Nocardiopsis alba* MSA10 aislada de la esponja marina *Fasciospongia cavernosa* mostró una actividad antagonista potencial contra vibrios patógenos de *Penaeus monodon* *in vitro* e *in vivo* (Selvin et al. 2010)

##### **1.4.6.1. Competencia por el espacio**



Seleccionar cepas probióticas deberá basarse en métodos de colonización, la capacidad de competencia contra los patógenos y el efecto sobre el sistema inmune (Van Doan et al., 2019). Verschuere et al., (2000) menciona que el uso de bacterias probióticas, basado en el principio de exclusión competitiva, y el uso de inmunoestimulantes son dos métodos preventivos para buscar cepas probióticas que ayuden a combatir enfermedades en acuicultura. Al aplicar estas bacterias en granjas de camarones, se podría producir un equilibrio biológico entre los microorganismos beneficiosos y nocivos competitivos.

La exclusión competitiva es un mecanismo de acción importante en las bacterias probióticas donde existe una competencia por los sitios de adhesión. La capacidad de las bacterias para colonizar el intestino y adherirse a la superficie epitelial y, en consecuencia, interferir con la adhesión de los patógenos es un criterio deseable en la selección de los probióticos (Balcázar, Blas, et al., 2006; Van Doan et al., 2019). Las bacterias intestinales no patógenas, como los lactobacilos, compiten con los patógenos por los sitios de adhesión en las superficies intestinales, particularmente en las vellosidades intestinales y los enterocitos (Brown, 2011). Por lo tanto, es importante realizar la adición de probióticos en etapas tempranas de larvicultura, debido a que la exclusión competitiva para los sitios de fijación podría proporcionar condiciones de cría favorables (Ninawe & Selvin, 2009; Vargas-Albores et al., 2017; Zorriehzahra et al., 2016).

#### **1.4.6.2. Producción de sustancias inhibitorias.**

Las bacterias probióticas producen sustancias con efectos bactericidas o bacteriostáticos en otras poblaciones microbianas (Ninawe & Selvin, 2009), como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, sideróforos, lisozimas, proteasas, entre muchas otras (Lakshmi, Viswanath, & Sai Gopal, 2013) Además, algunas bacterias producen ácidos orgánicos y ácidos grasos volátiles (p. Ej., Ácidos láctico, acético, butírico y propiónico), que pueden provocar la reducción del pH en el tracto gastrointestinal, evitando así el crecimiento de microorganismos patógenos oportunistas (Gozari, Mortazavi, Bahador, Tamadoni Jahromi, & Rabbaniha, 2016; Kuebutornye et al., 2019).

#### **1.4.6.3. Actividad antibacteriana de probióticos**

Varios probióticos en acuicultura poseen actividad antibacteriana contra patógenos conocidos. Por ejemplo, el probiótico *Lactococcus lactis* que se está utilizando en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) exhibió actividad inhibitoria contra *Aeromonas hydrophila* (Xia et al., 2018) También fue demostrado por Balcazar et al. (2008) que el probiótico *L. lactis* tenía actividad antibacteriana hacia dos patógenos de peces, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*. En cultivos de camarones se han utilizados varias cepas con actividad antibacteriana. Entre estas cepas con cualidades antibacterianas probióticas están *Streptomyces* (Gozari et al., 2016), *Pseudovibrio* (Domínguez-Borbor et al., 2019) y *Bacillus* (Kuebutornye et al., 2019) con actividad antibacteriana frente a patógenos de camarón como *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* y *V. parahaemolyticus*. *Bacillus subtilis* redujo

significativamente la cantidad de *Aeromonas* móviles, presuntos *Pseudomonas* y *Coliformes* totales en peces ornamentales (Newaj-Fyzul & Austin, 2015). El potencial de los probióticos, incluidos *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *L. lactis* y *Staphylococcus arlettae* aisladas de una salsa de pescado indígena en Malasia mostraron una alta actividad inhibidora contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Zorriehzahra, 2015).

#### **1.4.6.4. Probióticos y competencia por productos químicos o energía disponible.**

La población microbiana existirá dependiendo a su capacidad de competir por los productos químicos y la energía disponible del microbioma de su entorno (Verschuere et al., 2000). Así tenemos que bacterias probióticas ácido-lácticas, consumen los nutrientes que son esenciales para el crecimiento de una serie de patógenos (Brown, 2011). Por ejemplo, los sideróforos son agentes quelantes de hierro férrico de bajo peso molecular que pueden disolver el hierro precipitado o extraerlo de los complejos de hierro, haciéndolo disponible para el crecimiento bacteriano (Neilands 1981).

#### **1.4.6.5. Mejorando la calidad del agua**

Los probióticos son beneficiosos ya que pueden aumentar la composición de las especies microbianas en el agua y modificar su calidad (Mohapatra et al. 2012). Así tenemos a *Bacillus sp.*, es una bacteria grampositiva que actúa como biorremediador mejorando la calidad de agua por ejemplo en la desnitrificación (Barman et al., 2018). *Bacillus spp.* tienen una capacidad más eficiente para convertir la materia orgánica en dióxido de carbono en comparación con las bacterias Gram negativas, que convierten una mayor proporción de materia orgánica en biomasa bacteriana (Nimrat et al., 2012). La toxicidad por amoníaco y nitrito puede eliminarse mediante la aplicación de cultivos nitrificantes en el ambiente de los peces (Barman et al., 2018; Xie et al., 2013). El agua de los cultivos larvarios de camarón y gambas mejora, el pH, el oxígeno disuelto, el NH<sub>3</sub> y el H<sub>2</sub>S cuando se agregaban los probióticos (Natrah, Bossier, Sorgeloos, Yusoff, & Defoirdt, 2014). Ciertas bacterias probióticas poseen también un efecto algicida significativo, particularmente en varias especies de microalgas (Kim, Son, & Jeong, 2015).

#### **1.4.6.6. Efecto Inmunomodulador de los probióticos**

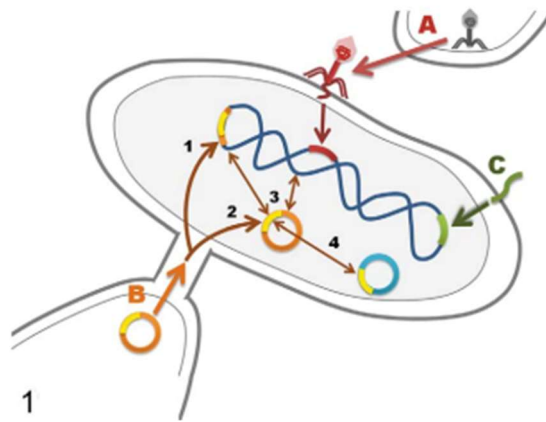
La mezcla de probióticos de diferentes especies mejora la inmunidad innata de los camarones (Zorriehzahra et al., 2016). Los probióticos ayudan a la generación de respuestas celulares como la fagocitosis, la encapsulación, la formación de nódulos y componentes humorales que incluyen proteínas anticoagulantes, aglutininas, enzima fenol oxidasa), péptidos antimicrobianos (defensinas y quimiocinas), proteínas antiapoptóticas, radicales libres, bacteriocinas, sideróforos, monostatina, lisozimas, proteasas, peróxido de hidrógeno, gramicidina, polimixina, tirotridina, exclusión competitiva y ácidos orgánicos (Balcázar, De Blas, et al., 2006). Los probióticos tienen un papel importante para mejorar la resistencia de los camarones contra enfermedades comunes como la vibriosis, la enfermedad de las manchas blancas y la

infección por *A. hydrophila* (Tseng et al., 2009). Mediante el ensayo de interferencia de ARN (ARNi) se demostró que la inmunidad de los camarones aumentó contra las enfermedades virales, utilizando probióticos (He, Ju, & Zhang, 2015).

#### 1.4.7. Enfermedades en sistemas de cultivos de camarón

##### 1.4.7.1. Mecanismos de transferencia de ADN

Los elementos genéticos móviles son importantes para la evolución bacteriana, permitiendo una mejor adaptación de la bacteria a nichos ecológicos nuevos y cambiantes (Gyles & Boerlin, 2014). Los elementos genéticos móviles (ADN movilizado en la bacteria huésped) son transferidos por: conjugación, transducción y transformación (Figura 1).



**Figura 1** Mecanismos de transferencia de ADN entre y dentro de bacterias. (A) Transducción: inyección de ADN en una bacteria por un fago. (B) Conjugación: el plásmido en una bacteria donante se transfiere a través de un pilus a una bacteria receptora; el plásmido puede integrarse en el cromosoma (1) o permanecer en el citoplasma (2); el plásmido puede transferirse entre ubicaciones citoplasmáticas y cromosómicas (3); el plásmido puede intercambiar secuencias de inserción o transposones con otros plásmidos (4) o el cromosoma. (C) Transformación: absorción de ADN desnudo del medio ambiente. Tomado de (Gyles & Boerlin, 2014)

La conjugación requiere contacto entre las bacterias donantes y receptoras (Figura. 1). La conjugación es mediada por un plásmido (fragmento circular de ADN que se replica independientemente de cromosoma de la célula). La conjugación requiere de contacto directo de las células y que las células con que se conjugan deben de ser opuestas (las células donantes deben de portar el plásmido y las receptoras no). En bacterias gram negativas el plásmido contiene genes que codifican síntesis de pilus sexual y en gram positivas producen moléculas (adhesinas) de superficies cohesivas que determinan que las células se mantengan en contacto directo.. (Bhatty, Laverde Gomez, & Christie, 2013).

La transducción es el proceso de transporte por el cual los virus bacterianos, llamados bacteriófagos o fagos, median la transferencia de ADN a las bacterias (Fig. 1). En el mecanismo, un fago infeccioso lisa el cromosoma bacteriano y utiliza la maquinaria del huésped para replicar su propio ADN. La transducción puede ser generalizada y

especializada. La traducción generalizada (cualquier región del cromosoma bacteriano puede ser transferida) es la incorporación accidental ocasional de ADN bacteriano en una cabeza de fago permite que este ADN se transfiera a otra bacteria en una ronda posterior de infección. La transducción especializada se produce con fagos que están integrados en el cromosoma bacteriano, una característica típica de los llamados fagos y profágicos templados o lisogénicos. La escisión imperfecta permite que se transfiera una región del cromosoma adyacente al sitio de unión del fago. Algunos fagos portan genes de virulencia como parte integral de sus genomas, y estos factores de virulencia pueden expresarse en niveles altos cuando los profagos abandonan su etapa latente en el cromosoma y comienzan a replicarse en el curso de un ciclo lítico (Gyles & Boerlin, 2014).

La transformación es el tercer proceso de transferencia de ADN (Ochman, Lawrence, & Grolsman, 2000). Esto implica que las bacterias captan ADN que se encuentra en estado natural, y lo incorpora a su genoma. El ADN monocatenario atraviesa por la pared y membrana celular y pasa al huésped integrándose al cromosoma bacteriano por recombinación homologa (Kidane, Ayora, Sweasy, Graumann, & Alonso, 2012). O por recombinación no homologa codificadas por un ADN extraño (Domingues, Nielsen, & da Silva, 2012). Este mecanismo tiene el potencial de permitir la transferencia de ADN entre bacterias que están relacionadas de forma distante.

El ADN que se transfiere a una bacteria receptora se establece mediante la incorporación al cromosoma o como un elemento auto-replicante en el citoplasma (Wozniak & Waldor, 2010). La presión selectiva tiende a determinar cuáles de los genes adquiridos permanecen en la población. Dentro de una población, el ADN adquirido por una transferencia de genes horizontal cambia con el tiempo como resultado de mutaciones espontáneas, cambios en el estado físico e interacciones con el medio ambiente. La pérdida de secciones de ADN también se produce bajo las mismas fuerzas asociadas con las modificaciones del ADN adquirido, y dicha pérdida o silenciamiento genético a veces se asocia con una mayor virulencia (Bliven & Maurelli, 2012). El ADN extraño a menudo se presenta en forma de bacteriófagos virulentos, y las bacterias tienen varios mecanismos para prevenir la expresión del ADN que ingresa (Gyles & Boerlin, 2014).

#### **1.4.7.2.AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda)**

La enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) es una enfermedad bacteriana que ha causado graves pérdidas a la acuicultura del camarón en todo el mundo (Lee et al., 2015; Lai et al., 2015; Han et al., 2015a). AHPND se caracteriza por una mortalidad masiva de las poblaciones de camarones afectados, que ocurre dentro de los 35 días posteriores a la siembra con post larvas. La enfermedad es particularmente conocida por su impacto en las post larvas, pero también afecta otras etapas de crecimiento, incluidos los juveniles y los adultos (OIE, 2018; FAO, 2013). AHPND se presentó por primera vez en granjas de camarones en China y Vietnam en 2010 (Flegel, 2012; Zhang et al., 2012). La enfermedad se informó luego en Malasia

(2011), Tailandia (2012), México (2013), Filipinas (2014), EE. UU. (2017) y Bangladesh (2017) (Flegel, 2012; Kondo et al., 2014; Nunan et al., 2014; de la Pena et al., 2015; Hong et al., 2015; Kongrueng et al., 2015; Sperling et al., 2015; Ahn et al., 2017; Eshik et al., 2017; OIE , 2017).

#### **1.4.7.3.Cepas causantes de AHPND**

Originalmente, *V. parahaemolyticus* que albergaba un plásmido pVA1 que transportaba genes *pirABvp* fue la única especie de *Vibrio* conocida por causar AHPND (OIE, 2018). Sin embargo, también se descubrió que el plásmido pVA1 contenía genes involucrados en la transferencia de genes, incluido un grupo de genes de transferencia conjugativa, genes de movilización y un sistema de genes *pndA PSK*, lo que sugiere que este plásmido y/o algunos de sus elementos genéticos son potencialmente capaces de transferirse a otras bacterias. De hecho, desde entonces se han informado casos de AHPND causados por *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. punensis* y *V. owensii* (Kondo et al., 2015; Liu et al., 2015; Dong et al., 2017; Restrepo et al., 2018). Todas estas bacterias albergaban un plásmido altamente homólogo a pVA1 (denominado como plásmido de tipo pVA1) son portadores de los genes de *pirABvp*.

## CAPITULO 2

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Sitio de colección de muestras de esponja

La colecta se realizó en el islote El Pelado de la REMAPE (Figura 2), provincia de Santa Elena, Ecuador ( $01^{\circ} 55, 9' S - 80^{\circ} 47,2' W$ ). El Pelado es un entorno rocoso que se extiende a través de la porción sumergida (plataforma El Pelado) donde se pueden distinguir dos estratos, rocosos y arenosos (Steiner et al. 2018).

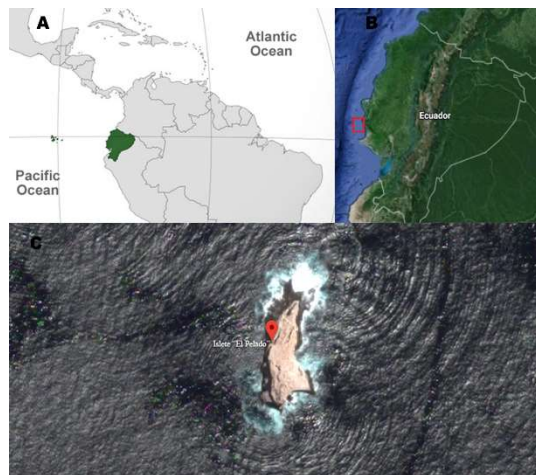
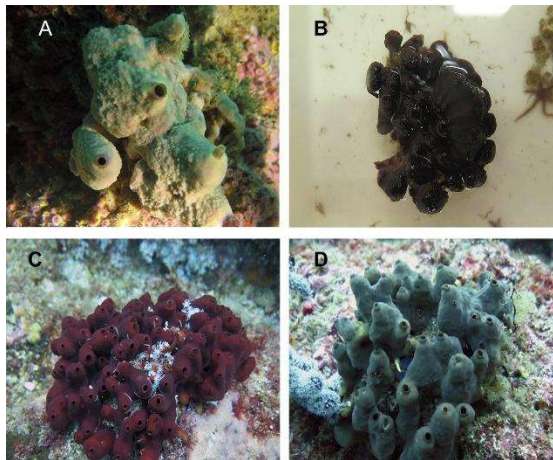


Figura 2. La REMAPE en la provincial de Santa Elena, Ecuador ( $01^{\circ}55, 9' S - 80^{\circ}47,2' W$ ). A) Localización de Ecuador en America del Sur (en verde).B) Localización del islote en Ecuador, C) Islote “El Pelado” cerca de las costas de Santa Elena, Ecuador. 3

#### 2.2. Colección de muestras de esponjas

Se recogieron cuarenta muestras de esponjas, a una profundidad de 10-15 m. Se recogió un pequeño fragmento de cada colonia y se colocó por separado en bolsas Ziploc que contenían agua de mar. Las bolsas se mantuvieron en hielo hasta que se almacenaron en el laboratorio. Se utilizaron cuatro morfotipos de *Aplysina sp* de varios colores (verde, morado, marrón y amarillo). Las esponjas verdes (Ap\_verde), marrones (Ap\_cafe) y moradas (Ap\_morada) estaban en rocas y expuestas a la luz, y una esponja amarilla (Ap\_amarilla) estaba entre las rocas sin luminosidad (Figura 3).



**Figura 3.** Morfotipos de color de *Aplysina* sp: **A** *Aplysina* amarilla. **B** *Aplysina* café, **C** *Aplysina* morada. **D** *Aplysina* verde. Fotos por K. Jaramillo y F. Idrovo. 230.04 x 188.21 mm (300 DPI)

Después del procesamiento, las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizadas.

### 2.3. Identificación del metagenoma de esponjas marinas

#### 2.3.1. Análisis de la comunidad bacteriana utilizando el gen del ARNr 16S

Las muestras se diseccionaron en trozos finos utilizando bisturí, esterilizado. El ADN total se aisló a partir de muestras de 0,25 g de tejido disectado de esponja utilizando el “UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit” (MOBIO) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se confirmó la presencia del gen del ARNr 16S, región variable V4 mediante PCR Utilizando Amplicones 318 Forward Primer (5'TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG) y 518Reverse Primer (5'GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C) (Bohórquez et al., 2012). La reacción se realizó en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$  conteniendo 2  $\mu\text{l}$  de DNA, 0.5 Mm de dNTPs, 0.6 U de Taq DNA polimerasa, 0.5 Mm de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 U de PCR Buffer (1X) y 0.3 Mm de cada cebador, bajo las siguientes condiciones de amplificación:  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para la desnaturalización inicial; 40 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 40 segundos para la desnaturalización,  $44^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos para la hibridación y  $72^{\circ}\text{C}$  durante 40 segundos para la polimerización; la polimerización final fue a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos; y su conservación a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. La amplificación de DNA se verificó mediante electroforesis en agarosa al 1.5% en TBE al 0.5X, utilizando 5 $\mu\text{l}$  por muestra de del producto amplificado. Estas muestras se enviaron a secuenciar mediante la tecnología de Illumina Hi seq (Macrogen) el análisis nos generó lecturas de 300 pb.

#### 2.3.2. Procesamiento de secuencias y asignaciones taxonómicas

Los datos crudos de Illumina obtenidos de las 36 muestras se utilizaron para la reconstrucción de OTUs. El control de calidad de las secuencias se realizó con el

complemento DADA2 en R versión 3.4.3 (Callaghan et al., 2016). Las secuencias se recortaron a 290 pb antes de ensamblar los extremos emparejados. Se filtraron las secuencias con calidad de Q20, se descartaron más de dos errores esperados. Después de la evaluación de la calidad, las secuencias del extremo emparejado se fusionaron y se eliminaron las quimeras. Las secuencias se asignaron taxonómicamente utilizando el clasificador bayesiano de RDP con la base de datos de referencia Silva (v. 128) (Q. Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007). Las secuencias sin asignación taxonómica y secuencias identificadas como cloroplasto y mitocondrias se eliminaron del conjunto de datos. Se construyeron las unidades taxonómicas operativas (OTUs) de las comunidades microbianas basadas en secuencias. La información de las OTUs se convirtió en una matriz de presencia/ausencia sobre una base de persample para hacer inferencias sobre la composición bacteriana en función de las especies de esponjas anfitrionas.

### **2.3.3. Índices de diversidad y relación de las comunidades bacterianas con los morfotipos de esponja.**

Las tablas de OTUs y las asignaciones taxonómicas se cargaron en la aplicación web MicrobiomeAnalyst.ca (Dhariwal et al., 2017), que se utilizó para determinar las diferencias entre grupos para  $\alpha$  y  $\beta$  diversidad y la abundancia taxonómica. Las OTUs  $\geq 2$  recuentos se eliminaron. Para evaluar las diferencias entre los grupos en las medidas de  $\alpha$  y  $\beta$  diversidad no fue necesario el filtrado basado en la prevalencia o la varianza. Los datos fueron normalizados basados en la transformación. Para evaluar las diferencias de riqueza de diversidad  $\alpha$  en los morfotipos de esponjas se utilizó Chao1. Las diferencias entre grupos en la diversidad  $\alpha$  se compararon con una prueba ANOVA/t ( $p < 0.05$ ). Para evaluar la diversidad  $\beta$ , se utilizaron medidas binarias basadas en la abundancia (Bray-Curtiz) junto con el análisis de coordenadas principales. Se compararon las diferencias entre grupos para las medidas de diversidad  $\beta$ , en base al análisis de permutación de varianzas PERMANOVA ( $p < 0.05$ ). Las extensiones a las que se compartieron las OTUs entre los grupos de muestras se visualizaron utilizando diagramas de Venn.

### **2.3.4. Potenciales géneros probióticos presentes en *Aplysina* sp.**

Se seleccionaron de las tablas de OTUs y asignación taxonómica posible géneros probióticos para acuicultura. Las tablas se visualizaron en abundancia de las cepas probióticas por cada morfotipo de esponja.

### **2.4. Caracterización e identificación de *Pseudovibrios denitrificans*.**

Para la identificación por secuenciación se seleccionaron cepas de *Pseudovibrio* a partir de:

- Características morfológicas macroscópicas de los aislados de *Pseudovibrio*
- Perfiles obtenidos por ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).
- Identificación bioquímica
- Bioactividad frente a vibrios patógenos de camarón.



Cada metodología se detalla a continuación.

#### **2.4.1. Aislamiento de bacterias**

Las muestras de esponjas se lavaron con agua de mar previamente esterilizada a fin de remover arena y detritus. Los endobiontes y epibiontes visibles del tejido fueron retirados manualmente con ayuda de un bisturí. Se tomaron trozos de diferentes partes del organismo y estos fueron macerados y diluidos en agua de mar esterilizada. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 1/10 en tubos de ensayo esterilizados, sembradas en placas de agar marino (Difco). La siembra se realizó por duplicado mediante la técnica de difusión en medio sólido, incubando por 24-48 horas a 28°C. Luego de la incubación se seleccionaron los *Pseudovibrios* por diferencias morfológicas. Posteriormente cada aislado fue purificado, mediante siembra por agotamiento, en placas individuales. Los aislados se incubaron a 26°C. Las cepas de *Pseudovibrios* fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas. Se analizaron las bacterias mediante tinción Gram, motilidad, reacción de catálisis, presencia de oxidasa, uso de aminoácidos (arginina, ortinina y lisina), uso de carbohidratos (sucrosa y galactosa), uso de citrato, formación de diacetyl (VP), producción de indol, determinación del metabolismo (fermentativo u oxidativo) y morfología celular (Kumar & Jogani, 2014).

#### **2.4.2. Caracterización molecular de *P. denitrificans***

##### **2.4.2.1. Extracción y Amplificación de DNA por PCR**

Colonias aisladas de cultivos bacterianos puros seleccionados de las placas de agar marino se resuspendieron en 500 µl de solución buffer (100 Mm NaCl, 10 Mm Tris-HCl Ph 8.0, 1 mM EDTA) y 80µl de SDS al 10%. La solución de mezcla se dejó durante una hora a baño maría a 55°C, se añadieron 600 µl de fenol y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante, para añadir 1 volumen de cloroformo- isoamil (24:1), se agitó y centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se añadieron 2.5 volúmenes de etanol frío al 100 % y 0.5 de acetato de amonio 5 M al sobrenadante. La solución se almacenó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó la solución a 13,000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 300 µl de etanol frío al 70%. El pellet se dejó secar por 2 horas a 45 °C y el ADN se resuspendió en 50 µl de agua Mili-Q.

La amplificación de los genes del ARNr 16S de los aislados bacterianos (Harder et al., 2003), se realizó en un volumen total de 10 µl conteniendo 2 µl de DNA, 0.5 Mm de dNTPs ((dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.12 U de Taq DNA polimerasa, 0.5 Mm de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de PCR Buffer (1X) y 0.3 Mm de cada primer: 27Fy 1492R. La PCR se realizó a 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización inicial; 40 ciclos a 95°C durante 40 segundos para la desnaturalización, 44°C por 40 segundos para la hibridación y 72°C durante 40 segundos para la polimerización. La polimerización final fue a 72°C por 10 minutos; y su conservación a 4°C por 30 minutos. La amplificación de DNA se verificó mediante electroforesis en agarosa al 1.5% en TBE al 0.5X. Los productos de PCR se enviaron para secuenciación a la empresa MacroGen Inc. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa CodonCode Aligner, el

cual realiza el alineamiento entre secuencias del banco de NCBI y las obtenidas en el estudio. Mediante el programa Mega 7 se realizaron árboles filogenéticos para evaluar la posición taxonómica de las comunidades bacterianas obtenidas de esponjas del género *Aplysina*.

#### 2.4.2.2. Caracterización de cepas de *P. denitrificans* por RAPDs

Para la tipificación por RAPD de los aislados bacterianos se utilizó el ADN extraído anteriormente y se amplificó con iniciadores UBC457 (5'-CGACGCCCTG-3') (Klinbunga et al. 2000; Jin et al. 2004). se realizó en un volumen total de 10 µl conteniendo 2 µl de DNA, 0.5 Mm de dNTPs ((dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.12 U de Taq DNA polimerasa, 0.5 Mm de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de PCR Buffer (1X) y 0.3 Mm de cebado. La PCR se realizó a 94°C durante 4 minutos para la desnaturalización inicial; 39 ciclos a 94°C durante 5 minutos para la desnaturalización, 46°C por 45 segundos para la hibridación y 72°C durante 1 minuto para la polimerización. La polimerización final fue a 72°C por 5 minutos; y su conservación a 4°C por 30 minutos. La amplificación de DNA se verificó mediante electroforesis en agarosa al 1.5% en TBE al 0.5X. Las bandas del gel se analizaron en el programa Totallab donde se realizó árboles filogenéticos para evaluar la posición de las bandas obtenidas de gel.

#### 2.4.3. Determinación in-vitro de la actividad antivibrio de las cepas de *P. denitrificans*

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las cepas aisladas de esponjas frente a vibrios patógenos de camarón (Tabla 1).

**Tabla 1.** Vibrios patógenos de camarón utilizados en los ensayos de bioactividad de las cepas de *P. denitrificans*

Patogenos	Características
<i>V. harveyi</i>	Cepa L29, aislado local
<i>V. campbellii</i> ,	Cepa luminiscente aislada de larvas de camaron que presentaron mortalidad
<i>V. parahaemolyticus</i> cepa 1	Cepa ATCC 27969, aislada de colección transmitida al humano por consumo de especies marinas contaminadas
<i>V. parahaemolyticus</i> cepa 2	Cepa BA94C2, aislada local de camarones juveniles que presentaron mortalidad, portadora de la toxina PirA/PirB.
<i>V. vulnificus</i>	Aislado local de larvas que presentaron mortalidad.

Doscientos µl de cada cepa patógena se cultivaron en superficie en agar marino. Luego se colocaron cúmulos de las cepas de esponjas con ayuda de asas de platino de 5 mm de diámetro en placas de agar. Se incubó a 26°C durante 2 días y se registró el diámetro de la zona de exclusión en milímetros (mm).

## **2.5. Evaluación de las cualidades de *P. denitrificans* para modular el microbioma en cultivos de camarón**

### **2.5.1. Evaluación de la capacidad colonizadora de *P. denitrificans* Ps17 en larvas de camarón**

La capacidad de colonización del fenotipo de *P. denitrificans* (PS17) fue evaluado en larvas, siguiendo el protocolo de Cloete & Archibald, (1991) y Gao et al., (2017) con modificaciones. Se prepararon cultivos bacterianos frescos de 48 horas (tiempo normal de crecimiento de *P. denitrificans*). Se midió la concentración de UFC por densidad óptica (OD 600 nm). Se ajustó la concentración a  $10^8$  UFC/ ml de *P. denitrificans*. Obtenida esta concentración se procedió a teñir las bacterias con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 1 mg/ml incubando por 15 minutos (en la oscuridad). Luego se centrifugó la muestra a 3000 rcf, a 20°C por 10 minutos. Luego se eliminó el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en una solución de 2 % de CINA, se centrifugó a 3000 rcf a 20°C por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento de lavado se realizó 3 veces. En el último lavado el pellet se resuspendió en 20 ml de agua de mar estéril. Esta solución de cepas bacterianas teñidas fue utilizada para el ensayo de colonización de larvas de camarón (15 larvas). Después de 30 minutos de incubación, las larvas fueron observadas en microscopio de epifluorescencia (Nikon).

### **2.5.2. Interacción P62 con *Pseudovibrio denitrificans*.**

A través de inhibición competitiva se evaluó la estrategia moduladora de la microbiota mediante la combinación de *P. denitrificans* como probiótico sistémico capaz de ocupar distintos nichos y sustratos del ambiente de cultivo y *V. hepatarius* P62 (Gullian et al., 2004), un probiótico benéfico con alta afinidad por el hepatopáncreas de camarón y la materia orgánica, en el alimento. Para este procedimiento se utilizó el procedimiento utilizado por Gao et al., (2017) con ligeras modificaciones. La cepa de *Pseudovibrio* se inoculó con un cúmulo (diámetro ~2-3mm) en la superficie de una placa de agar Mario con suspensión celular de  $1 \times 10^4$  UFC/ml de *V. hepatarius* P62. Las células se incubaron por 72 horas a 28°C, y se evaluó la actividad antagonista en base a la presencia de zona de inhibición del crecimiento alrededor del punto.

### **2.5.3. Colonización de *Pseudovibrio* en alimento**

El fenotipo de Ps 17 de *P. denitrificans* se seleccionó para evaluar su capacidad de crecimiento en algas y alimento para camarón sola o compitiendo contra *V. parahaemolyticus* BA94C2. Cada tratamiento tuvo tres réplicas y consta de Control, *Pseudovibrio denitrificans* a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/ml, Alimento y *V. parahaemolyticus* patógeno (BA94C2) a una concentración de  $1 \times 10^2$  UFC/ml.

Para la evaluación de la capacidad colonizadora del *P. denitrificans* (PS17) se sembraron en agar marino muestras de todos los tratamientos de alimento. Después de 48 de horas se evaluó el crecimiento en UFC de las placas de agar. Se tomaron muestras durante tres días seguidos.

## **2.6. Efecto de *P. denitrificans* Ps17 sobre juveniles de camarón *P.vannamei* desafiados con *V. parahaemolyticus* BA94C2**

### **2.6.1. Producción de *P. denitrificans* Ps17**

Los *Pseudovibrios* se rayaron de manera individual en cajas Petri y se incubaron a 26°C por 48 horas. Posteriormente, las colonias individuales de *P. denitrificans* se transfirieron a medio LB (en agua de mar natural estéril) y se incubaron durante 48 h. Después del período de incubación, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sedimentos microbianos resultantes se resuspendieron en agua de mar estéril y se almacenaron a temperatura ambiente (25 °C). La concentración final (UFC ml/1) y la viabilidad bacteriana se determinaron sembrando la suspensión bacteriana en placas de agar marino.

### **2.6.2. Bioensayo con tratamientos de probióticos**

Juveniles de *P. vannamei* de 2 gr se adquirieron de la estación experimental del CENAIM (150 km de Guayaquil). Doscientos juveniles de camarón se asignaron al azar a veinte acuarios de vidrio de 40 L conteniendo agua de mar filtrada con una concentración total de 34.5 UPS. El bioensayo constó de 3 tratamientos (juveniles de camarón tratados con las cepas de *P. denitrificans* Ps11, Ps17 y Mezclas de Ps17 y Ps11 y un grupo de control (juveniles no tratados). Cada tratamiento tuvo cinco réplicas.

### **2.6.3. Desafío con *V. parahaemolyticus* BA94C2 de juveniles de *P. vannamei* tratados con *P. denitrificans* Ps11 y Ps 17.**

Pasados los 30 días de Bioensayo se realiza prueba de desafío para evaluar la capacidad de *Pseudovibrio* de mejorar sobrevivencias en juveniles de camarón frente a infecciones bacterianas provocadas por *V. parahaemolyticus*.

La infección de juveniles se realizó con *V. parahaemolyticus* (BA94) a concentraciones de  $4.5 \times 10^5$  UFC g/1 en cada acuario, que fueron confirmados con siembra en TSA 2%ClNa. El inóculo bacteriano de *V. parahaemolyticus* adicionado se dejó en los acuarios por 24 horas, después de este tiempo se realiza el recambio de agua en los acuarios. Fueron 50 horas de observación de la mortalidad de los juveniles de camarón.

### **2.6.4. Efecto de las cepas de *P. denitrificans* Ps11 y Ps17 sobre el microbiota de camarones *P. vannamei*.**

Para la evaluación del efecto de *P. denitrificans* sobre la microbiota de los juveniles se tomaron muestras de estómagos y agua para metagenómica antes y después del

desafío. También se tomaron muestras de estómagos e intestinos para microbiología, antes del desafío.

### **2.7. Análisis estadístico de los datos de los bioensayos**

El análisis estadístico de los datos de los bioensayos (larvas y juveniles) se llevó a cabo utilizando el software R versión 3.3. En los dos bioensayos, para evaluar diferencias entre los tratamientos se realizó un ANOVA de una vía con un nivel de confianza del 95%. Previamente, se verificaron las asunciones de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Levene). Para evaluar la supervivencia de camarones juveniles después del desafío con *V. parahaemolyticus* se realizó un “survival analysis” utilizando el estadístico Kaplan Meir. Los resultados de las pruebas estadísticas fueron considerados con un nivel de significancia ( $p < 0.05$ ). El análisis de datos de metagenómica en el agua de cultivo y estómago de camarón se realizó como ya describió anteriormente en la sección 2.3.2 y 2.3.3.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los patógenos bacterianos más recurrentes en criaderos de America y Asia son *Vibrios* spp, como *Vibrio harveyi* (Mirbakhsh, Akhavan Sepahy, Afsharnasab, Khanafari, & Razavi, 2014), *Vibrio alginolyticus* (Siddique, Hasan, & Hossain, 2017) y *Vibrio campbellii*. Las cepas más virulentas han causado mortalidades (Soto-Rodríguez, Simoes, Roque, & Gómez Gil, 2006). Los vibrios están presentes en alto porcentaje en camarones peneidos silvestres. Ellos son omnipresentes en los sistemas de cultivo de camarón, ya que están perfectamente adaptados a las condiciones de cultivo de peneidos tropicales (Zheng et al., 2017) donde se ven favorecidos por las altas temperaturas, abundancia de materia orgánica y la presencia de exuvios, para los cuales tienen una alta afinidad. Romper la supremacía de los vibrios necesita de bacterias probióticas marinas robustas con múltiples características, benéficas, con diversidad metabólica, capaces de crecer en distintos sustratos y modificar la microbiota de los ambientes de cultivo de camarón. En esta tesis asumimos el estudio del simbionte marino *P. denitrificans*, bacteria metabólicamente versátil con propiedades colonizadoras, como herramienta para modular la microbiota del ambiente de cultivo *P. vannamei*. Para realizar esto, el trabajo inició con el estudio la microbiota asociada a su hospedero natural en el medio marino, la esponja *Aplysina* sp utilizando metagenómica, las esponjas mantienen complejas interacciones con sus bacterias, son ricas en simbiontes y no presentan grandes concentraciones de vibrios (Chen et al., 2017). Este enfoque permitió comprender el ensamblaje de la microbiota de *Aplysina*, dilucidar la presencia de especies claves como bacterias simbiontes potencialmente probióticas en un holobionte marino saludable y el posible rol de cada especie bacteriana, en particular los fenotipos de *P. denitrificans*.

#### 3.1. Microbiota de *Aplysina* sp.

##### 3.1.1. Análisis metagenómico de la microbiota de la esponja *Aplysina* spp

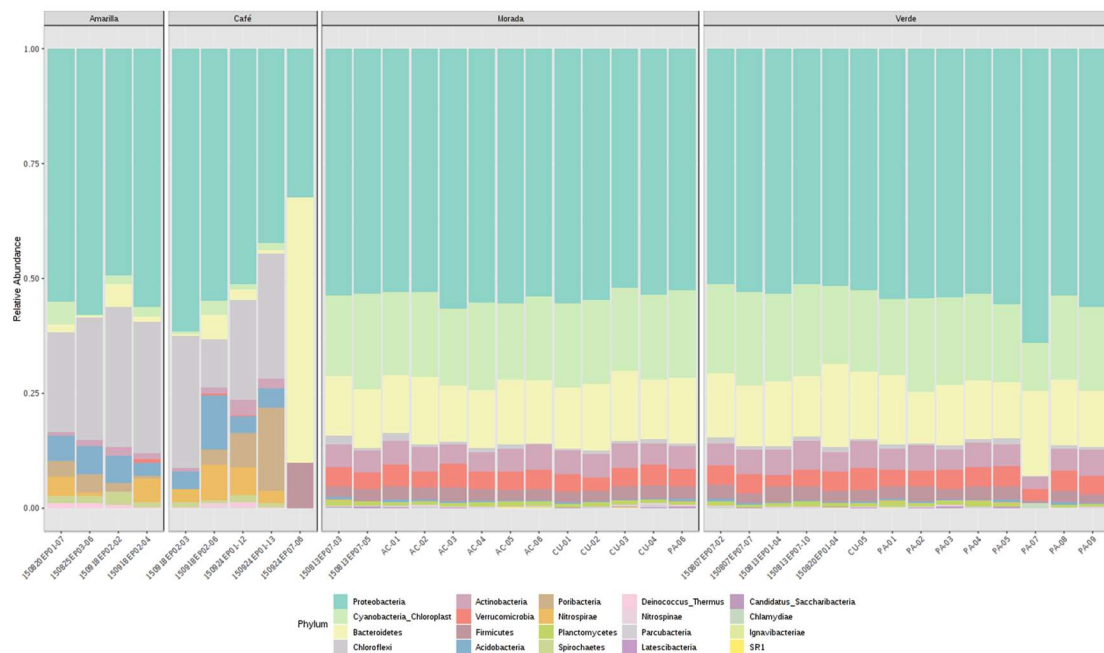
###### 3.1.1.1. Estimaciones de riqueza y $\alpha$ diversidad

El análisis Chao 1 para diversidad bacteriana en los morfotipos de *Aplysina* sp, encontró valores entre 654 y 30 OTUs, encontrándose mayor riqueza en los morfotipos morado y verde, observándose un efecto significativo del morfotipo sobre la microbiota ( $p$  value < 9.1681e-12), con la menor abundancia observada en Ap\_amarilla. En cuanto a los índices de diversidad en *Aplysina* (verde, morado) estos fueron diferentes a Ap\_amarilla y café. Las esponjas tienen complejas interacciones con las bacterias. Así tenemos que la estimación de la riqueza microbiana en las esponjas varía según el huésped, estas pueden variar de 50 a 3797 OTUS (de Voogd, Cleary, Polónia, & Gomes, 2015; Thomas, Kavlekar, & LokaBharathi, 2010). La literatura ha reportado valores similares para otras especies de esponjas (Schmitt et al. 2012; Cuvelier et al. 2014; Moitinho-Silva et al. 2014; O'Connor-Sánchez et al. 2014). A este respecto, debe tenerse en cuenta que Ap\_amarilla se observó en lugares de alta turbidez o baja luminosidad (grietas), lo que podría sugerir que el huésped esponja influye en la naturaleza y estructura de la comunidad microbiana, y solo se ve afectado de manera limitada por factores externos, tales como parámetros del entorno. Estas observaciones coinciden con las de Cuvelier et al., (2014) en la esponja

*Cynachyrella sp.* (Burgsdorf et al., 2015) quienes mencionan que el color de las esponjas está estrechamente relacionado con la presencia de simbiontes bacterianos, especialmente de cianobacterias, y que todo depende del sitio donde se encuentran los huéspedes (cuevas o acantilados rocosos). De hecho, los morfotipos de Ap\_amarilla y café tienen una baja presencia de cianobacterias, a diferencia de las formas púrpuras y verdes que son más ricas en cianobacterias.

### 3.1.1.2. Composición de la comunidad bacteriana basada en el análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S

Los perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas se resumen en el Phylum y los niveles de clase (Figura 3). Las OTUs se asignaron taxonómicamente a 33 phyla bacterianos en el morfotipo verde, 31 en el morfotipo morado, 15 en el morfotipo café y 17 en el morfotipo amarillo. Además, se observó que las Proteobacteria, Cianobacterias, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, y Chloroflexi fueron los phyla más abundantes en la comunidad de esponjas, principalmente las proteobacterias. Los phyla Chloroflexi y Proteobacterias, se encontraron en mayor proporción que en Ap\_ amarilla que en los tres morfotipos estudiados. Los phyla Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia y Firmicutes variaron en abundancia entre los tres morfotipos de esponjas.



**Figura 3.** Asignaciones taxonómicas en los niveles de phyla que muestran la abundancia relativa (%) de las secuencias del gen ARNr 16S de Ap\_verde, Ap\_amarillo, Ap\_morado y Ap\_café..

Los phyla, Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes y otros, los más abundantes asociados con los cuatro morfotipos de Aplysinas fueron similares a los

observados en estudios realizados en otras especies del orden Aplysinas (de Voogd et al., 2015; Easson & Thacker, 2014; O'Connor-Sánchez et al., 2014). El phylum Poribacteria a pesar de ser un phylum bacteriano encontrado exclusivamente en esponjas (Fieseler, Horn, Wagner, & Hentschel, 2004; Lafi et al., 2009), especialmente Aplysinas (Lafi et al., 2009) presentó porcentajes muy bajos en los morfotipos de Aplysina estudiados. Sin embargo, observamos la presencia de phyla Parcubacteria y Aminicenantes, principalmente en el morfotipo amarillo. Los phyla Parcubacteria, Parcubacteria y Aminicenantes son recicladores eficientes de un conjunto particular de compuestos de carbono que son exclusivos de las esponjas (Keller-Costa, Jousset, Van Overbeek, Van Elsas, & Costa, 2014) y las ayudan a tolerar ambientes anóxicos. Estas bacterias pueden ser utilizadas por esponjas para adaptarse a diferentes entornos. Estas estrategias de adaptación pueden ayudar a Aplysinas a sobrevivir en ambientes estresantes de baja luminosidad y alta turbidez, que inducen el crecimiento bajo de cianobacterias. Es probable que las bacterias Aminicenantes en la naturaleza exhiban múltiples capacidades metabólicas y una amplia gama de armas de supervivencia, así como varias estrategias de adaptación (Farag, Davis, Youssef, & Elshahed, 2014).

Cuando se examinaron las comunidades bacterianas en los niveles taxonómicos más bajos, se recuperaron 52 clases y 79 órdenes (Figura 4 y Figura 5) de todos los conjuntos de datos. En todos los morfotipos de esponjas se encontraron Alphaproteobacterias y gammaproteobacterias predominantes. La clase Epsilonproteobacteria se enriqueció preferentemente en Ap\_verde y Ap\_morada. En tanto la clase Caldilineae, Verrucomicrobiae y Bacteroidia en Ap\_amarilla y Ap\_café. Por el contrario, las bacterias del orden Pseudomonadales, Flavobacteriales y Campylobacterales fueron más abundantes en las esponjas (Ap\_verde, Ap\_Morada, Ap\_Café). En las esponjas Ap\_amarilla abundó el orden Caldilineales, Bacteroidales, Nitrospirales, Bacteroidales.

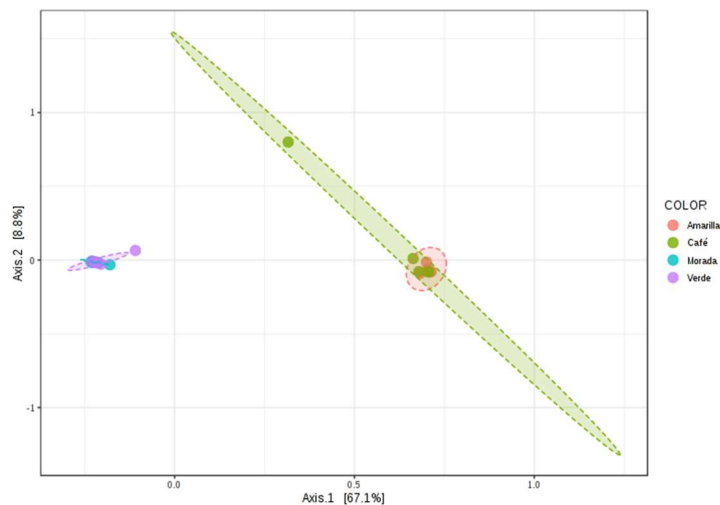




**Figura 5.** Asignaciones taxonómicas en los niveles de orden que muestran la cantidad de las OTUs generadas en las secuencias del gen del ARNr 16S de Ap\_verde, Ap\_amarillo, Ap\_morado y Ap\_café.

### 3.1.1.3. Relación entre el morfotipo del huésped y las comunidades bacterianas

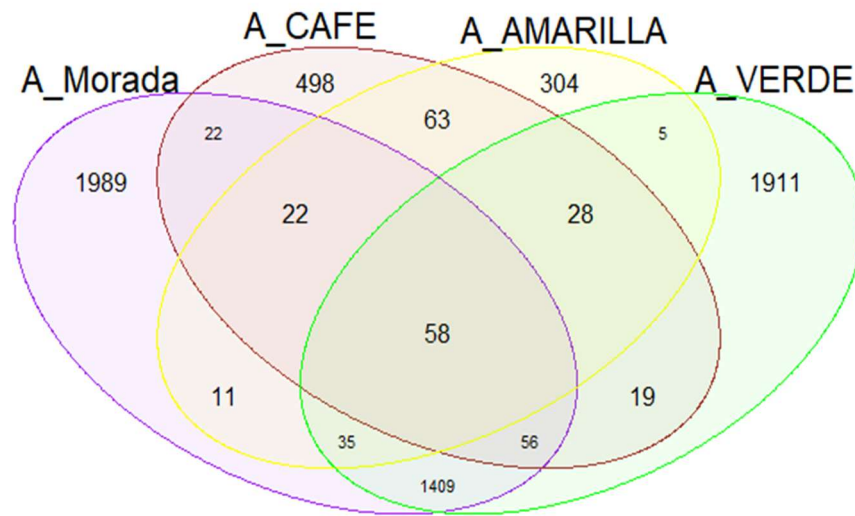
Los resultados indicaron que los cuatro morfotipos de esponjas (Ap\_verde, Ap\_Morada) abrigaban comunidades bacterianas que eran distintos de las esponjas (Ap\_café y Ap\_amarilla), observándose diferencias significativas en cuanto  $\beta$  diversidad ( $p$ value < 0.001) entre las Aplysinas. (Figura 6)



**Figura 6.** Análisis metagenómico en distintos morfotipos de *Aplysinas*. Gráficos de la microbiota de Ap\_amarilla, Ap\_verde, Ap\_café, Ap\_morada. Las variaciones explicadas se muestran en análisis de coordenadas principales.

### 3.1.1.4. OTUs bacterianos compartidos y específicos entre morfotipos

Se encontró un mayor número de OTUs compartidas entre Ap\_verde, Ap\_morada y Ap\_café. De las 6430 OTUs presentes en este conjunto de datos 1989, 498, 304, 1911 OTUs únicas asociadas con esponjas Ap\_morada, Ap\_café, Ap\_amarilla y Ap\_verde respectivamente. Un total de 58 OTUs (0.9%) fueron compartidos entre los cuatro morfotipos de esponjas. Cada esponja compartió OTUs, de su población. Esta comunidad principal contenía miembros generalistas de los phyla Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus, Firmicutes, Nitrospirae (Figura 7).



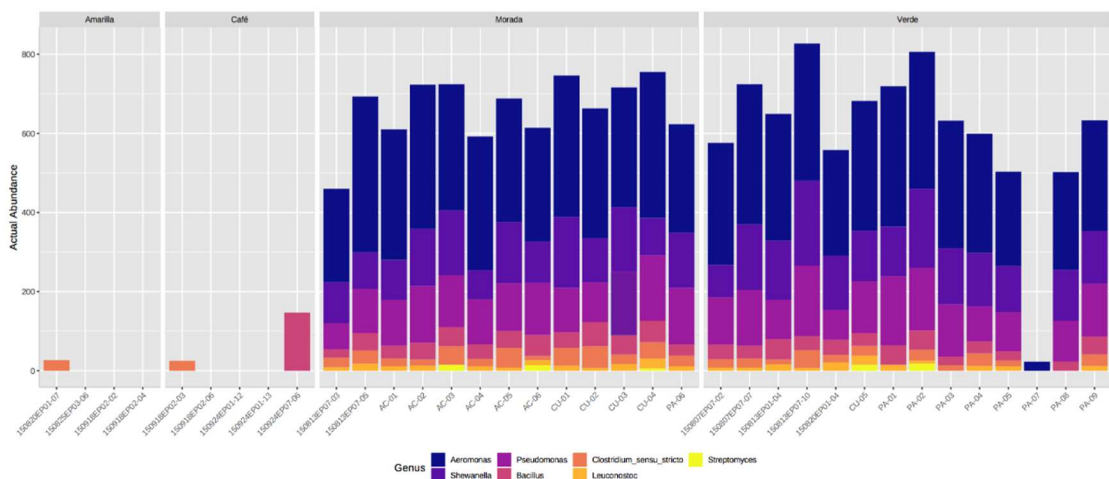
**Figura 7.** Diagrama de Venn que muestra el número de OTUs compartidas y exclusivas en Ap\_Morada, Ap\_Café, Ap\_Amarilla y Ap\_verde.

Los cuatro morfotipos de Aplysinas estudiados albergaban 366 OTU comunes, mientras que las OTU específicas y estables fueron 1853, 2874, 117 y 500 en Ap\_verde, Ap\_morada, Ap\_amarilla y Ap\_café, respectivamente. Se ha descubierto que Iricnidade y Aplysina siempre presentan un patrón definido de diversidad filogenética y especificidad del huésped de la bacteria. Pero esto difiere en nuestro estudio porque Aplysina varía su microbioma dependiendo del morfotipo y solo el 2.42% de las OTU son comunes en los cuatro morfotipos. Los filos comunes (Proteobacterias, Bacteroidetes y Actinobacterias) estuvieron presentes en los cuatro morfotipos de Aplysinas

### 3.1.1.5. Potenciales cepas probióticas presentes en *Aplysina spp.*

En este estudio, las OTUs dominantes se clasificaron dentro del filo Proteobacteria. Las bacterias importantes para las aplicaciones biotecnológicas de las proteobacterias del filo están presentes principalmente en Ap\_verde y Ap\_amarilla. Entre estos, *Pseudomonas*. Las *Pseudomonas*, aisladas de esponjas marinas tienen altas actividades antibacterianas y citotóxicas (Keller-Costa et al., 2014) El análisis de la microbiota de las esponjas a nivel de género mostró una gran diversidad de géneros utilizados como probióticos en acuicultura, en particular en los morfotipos verde y morado. Así se evidenció la presencia de varias cepas de Bacillales (*Bacilli*) (Kennedy et al., 2009; Penesyan et al., 2011) género muy utilizado en aplicaciones acuícolas debido a su bioactividad antimicrobiana. Dentro del microbioma de las Aplysinas se han reportado muchos géneros simbiotes se han utilizado como probióticos, *Bacillus* y *Lactobacillus* que en la actualidad se utilizan como probióticos comerciales en cultivos de camarón (Hong et al., 2005; Martínez Cruz et al., 2012). Otros géneros, utilizados como probióticos en peces y camarón, fueron *Aeromonas*, *Shewanella*, *Leuconostoc* (Akther 2015). De las esponjas de color amarilla y café, se encontraron

*Clostridium*, en tanto en las esponjas de color café existió mayor número de *Bacillus* (Figura 8). Estudios metagenómicos han demostrados que estas bacterias también se encuentran dentro de las esponjas *Aplysinas*. Nuestro análisis metagenómico en *Aplysinas* demostró poseer las cepas probióticas descritas anteriormente sobretodo en los morfotipos verde y morado. Las esponjas marinas han demostrado tener un potencial bioactivo para desarrollar probióticos para la acuicultura resistentes a condiciones extremas de cultivo sean éstos temperatura y salinidad. Varios estudios se han realizado buscando los beneficios de las bacterias simbiotas asociadas con las esponjas, entre estos los géneros *Pseudovibrio*(O' Halloran et al., 2011), *Bacillus* (Nagai et al., 2003) *Pseudomonas* y otros clados son altamente bioactivos (Thomas et al. 2010). Muy pocos OTUs de los géneros *Pseudovibrio* y *Vibrio* se observaron en los cuatro morfotipos (datos no mostrados) (Figura 8), a pesar de que estos constituyen la mayoría de los géneros cultivables de *Aplysina* (Domínguez-Borbor et al., 2019) y de hecho el género *Pseudovibrio* es aislado de manera recurrente de las esponjas (Alex et al., 2013; Bauvais et al., 2015; Dupont et al., 2014; Esteves et al., 2017; Esteves, Hardoim, Xavier, Gonçalves, & Costa, 2013; Muscholl-Silberhorn, Thiel, & Imhoff, 2008). Varios autores citan a *Vibriosis* como buen candidato probiótico en acuicultura. Los vibrios aislados de *Aplysina* mostraron ser patogénicos de larvas camarón, no así los *Pseudovibrios* quienes no solo fueron inocuos, sino que además protegieron a las larvas de camarón de *V. campbellii*. *Pseudovibrio* también presentó bioactividad contra los vibrios de la esponja (Ardile Tapia & Rodriguez Leon, 2015), observación que sugiere un posible rol clave de *Pseudovibrio* para frenar el crecimiento de vibrios en el huesped esponja. Cepas como *Pseudovibrios* constituyen prometedores probióticos en acuicultura (Ardile Tapia & Rodriguez Leon, 2015; Domínguez-Borbor et al., 2019) debido a su capacidad de competir con los vibrios en los sistemas de cultivo de camarón.



**Figura 8.** Géneros de bacterias potencialmente probióticos encontrados en cuatro morfotipos de esponjas *Aplysinas*.

### 3.1.2. Aislamiento de *Pseudovibrios spp*

En nuestro estudio se aislaron 41 cepas con características macroscópicas (En forma de varilla y gram positivas) y bioquímicas (Anexo 1) correspondientes al género *Pseudovibrio*, a partir de 10 muestras de esponjas de los cuatros morfotipos. Se tomaron 20 aislados aleatoriamente para ser analizados. La mayoría de las bacterias simbioses de las esponjas no pueden ser cultivadas en su totalidad con técnicas tradicionales (Uria & Piel, 2009). Estudios previos indican que entre los géneros bacterianos cultivables de la esponja *Aplysina* están *Pseudovibrio*, *Vibrio*, y *Pseudoalteromonas* (Ardile Tapia & Rodriguez Leon, 2015; O' Halloran et al., 2011). Varios estudios demuestran que cepas de *Pseudovibrios* han sido aislados de varios invertebrados marinos, sedimentos marinos y estuarinos, agua de mar, muestras de petróleo, sistemas de tratamiento de aguas residuales y mesocosmos de humedales (Fang et al., 2014; Hosoya & Yokota, 2007a; Srisukchayakul et al., 2007; D. Zhang et al., 2016). Se ha demostrado que los *Pseudovibrios* proliferan en condiciones oligotróficas extremas, toleran altas concentraciones de metales pesados y metabolizan compuestos potencialmente tóxicos (Bauvais et al., 2015). Los datos de los estudios descritos por Romano sugieren que, aparte del ciclo de nutrientes, los miembros de *Pseudovibrio* asociados con el huésped pueden proporcionar a su huésped vitaminas/cofactores y protección contra posibles patógenos mediante la síntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos (Bondarev et al., 2013; Romano, 2018).

#### 3.1.2.1. Bioactividad de *Pseudovibrios spp*.

Los ensayos de antagonismo de los aislados de bacterias presuntamente pertenecientes al género *Pseudovibrio* mostró actividad antimicrobiana contra al menos una de las especies de vibrios analizadas (Tabla 2). La mayoría de los aislados mostró actividad contra *V. parahaemolyticus* cepa 1, 18 (45%) contra *V. parahaemolyticus* cepa 2, 24 (60%) hacia *V. vulnificus*, 27 (67,5%) contra *V. campbelli* y 28 (70%) contra *V. harveyi*. De manera curiosa el halo de inhibición muy débil inicialmente se incrementa de tamaño conforme avanzan las horas, sugiriendo que el vibrio induce a una mayor bioactividad del *Pseudovibrio*. El cocultivo de diferentes cepas bacterianas y/o fúngicas, ha demostrado ser una ruta muy prometedora para el descubrimiento de metabolitos secundarios (Akone et al., 2016). Según Romano, (2018) aplicando ensayos de laboratorio bajo el marco de “Una cepa de muchos compuestos” OSMAC (por sus siglas en ingles “one strain many compounds”) que menciona cómo una sola cepa puede producir diferentes moléculas cuando se cultiva en diferentes condiciones ambientales. Aplicar el marco OSMAC podría dar como resultado el desbloqueo de la diversidad química de genes silenciosos que controlan las cepas bacterianas, permitiendo el descubrimiento de nuevas moléculas de interés médico y biotecnológico.

Tabla 2. Halos de inhibición de *Pseudovibrio* frente a cepas patógenas de camarón

Código	<i>V.parahaemolyticus</i> BA94	<i>V. campbelli</i>	<i>V.parahaemolyticus</i> C1	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. harveyi</i>
A21	15	23	11	15	20
A31	11	12	10	20	10
A33	10	18	16	19	18
A42	11	25	11	25	19
A51	10	28	13	10	25
A53	11	15	12	10	15
3.3 ME	10	10	10	16	12
6 ME	18	18	16	12	18
11.3 ME	22	24	23	22	25
7C2A	10	12	15	11	18
Ps11	23	22	21	20	25
Ps17	22	30	35	27	31
Ps18	32	35	40	21	35
A22	15	24	7	16	21
A24	17	-	12	17	15
A41	8	26	13	15	26
A43	8	18	11	15	18
A47	7	21	10	13	18
A61	7	21	13	11	20
A64	11	1	8	21	21
A73	6	35	10	22	29
A75	18	16	17	-	17
5.3 ME	15	14	14	15	9
A54	-	3	11	9	18
A69	8	11	14	8	25
A72	9	21	9	21	11
6.4 ME	15	15	7	8	1

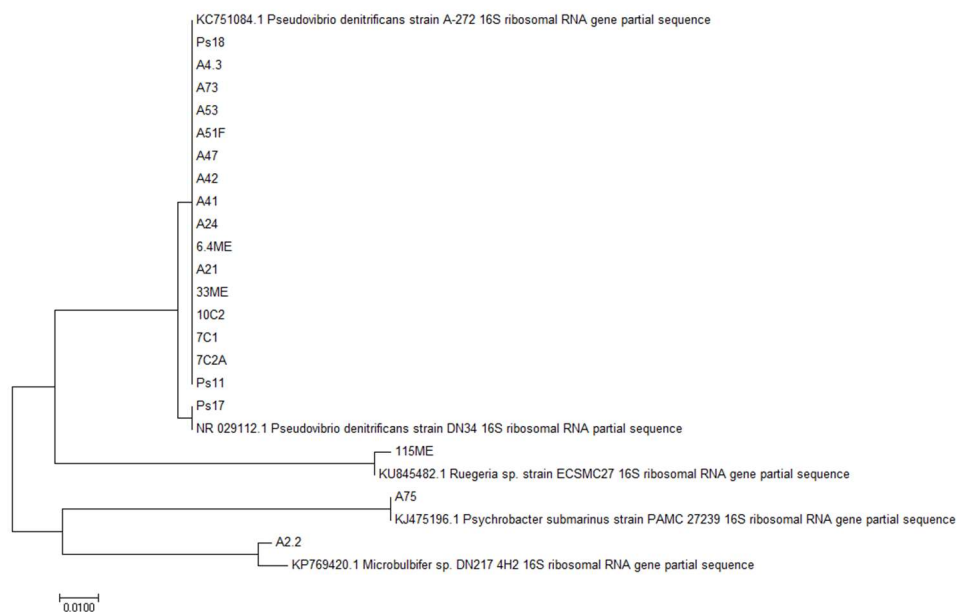
7C1	6	7	10	10	12
10C2	7	9	20	15	17
A34	9	30	-	7	17
2.1 ME	8	10	15	8	7
3.2 ME	10	7	10	8	7
1 ME	-	-	-	27	-
10C1	-	-	10	4	4
A44	-	-	-	-	-
A55	-	-	5	-	-
A63	-	-	6	-	8
A71	-	-	-	-	-
A74	-	-	-	-	-
5.1 ME	-	-	-	5	-
10C1v	-	5	7	6	5

El simbiote marino del género *Pseudovibrio* posee actividad antimicrobiana (Graça et al., 2013; Kennedy et al., 2009; Margassery et al., 2012; Muscholl-Silberhorn et al., 2008). Esto se debe a que las especies de *Pseudovibrio* producen compuestos bioactivos específicos, como la heptilprodigiosina (Sertan-De Guzman et al., 2007) y compuestos biosurfactantes (Rizzo et al., 2013). Más recientemente, el compuesto antibacteriano ácido tropoditético (TDA) se recuperó de *Pseudovibrio* sp. D323, aislado de la alga roja *Delisea pulchra* (Penesyan et al., 2011) que se correlacionó con la predicción previa de la producción de TDA por *Pseudovibrio* sp. cepa JEO62 basada en la presencia del grupo biosintético *tdaA-tdaF* en su genoma (Geng & Belas, 2010). En este estudio se identificaron 5 espectros de actividad antimicrobiana. lo que sugiere que los aislados de *Pseudovibrio* spp pueden estar produciendo varios compuestos antimicrobianos diferentes. Así tenemos que de 41 *Pseudovibrios*, 13 bacterias (30%) expresaron buenos niveles de bioactividad (zona de exclusión  $\geq 10$  mm) contra todos los patógenos, 21 (48%) bacterias mostraron tener bioactividad frente a uno a cuatro de los patógenos analizados y 9 (22%) bacterias no mostraron bioactividad considerable (Ver Tabla 2). Ausencia o presencia de actividad antibacteriana ha sido observada en estudios anteriores, así tenemos que un número limitado de *Pseudovibrio* spp. presentó actividad antibacteriana contra *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* (Kennedy et al., 2009; Santos et al., 2010a; Sertan-De Guzman et al., 2007), así como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *E. faecium* y *Enterococcus faecalis* (Santos et al., 2010b) *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *L.*

*monocytogenes* y *C. perfringens*. Dentro de las cepas evaluadas y contrarrestadas se encuentra el patógeno causante de AHPND. Los datos son concordantes en cuanto a efectividad de *Pseudovibrios* (Ardile Tapia & Rodriguez Leon, 2015; Domínguez-Borbor et al., 2019) contra vibrios luminiscentes de camarón. Podríamos hipotetizar que *Pseudovibrios* podría constituirse en una especie clave para frenar crecimiento de *vibrios* en los sistemas de cultivos.

### 3.1.2.2. Identificación molecular de *P. denitrificans*

La identificación molecular se realizó únicamente con los aislados más bioactivos. El análisis de BLAST de las secuencias de ARNr 16s (>700 nucleótidos) reveló que 15 aislados compartían una identidad del 98% con *P. denitrificans* A272, un aislado con *P. denitrificans* DN34. Existieron además tres aislados pertenecientes a los clados *Microbulbifer* y *Psychobacterer* y *Ruegeria*.

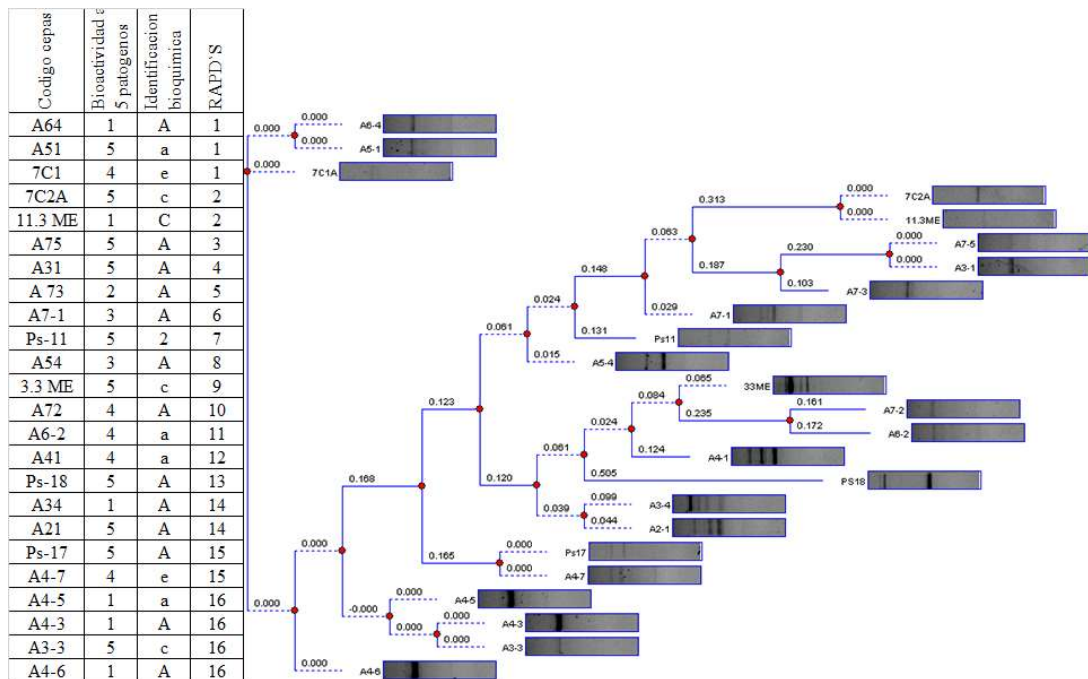


**Figura 9.** Árbol filogenético de *Pseudovibrio denitrificans*, y de los géneros *Ruegeria* y *Microbulbifer*, en base a la secuencia del gen del ARNr 16S. Para la construcción del árbol se empleó el método NJ con 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA

### 3.1.2.3. Diversidad de *P. denitrificans* (polimorfismo)

La diversidad bioquímica y en bioactividad de los aislados, indicó la posible existencias de distintos fenotipos de *P. denitrificans*, por lo que se utilizó la herramienta RAPDs para confirmar el posible polimorfismo. Se identificaron 16 grupos polimórficos por RAPDs (Figura 10). La mayoría compartían menos del 75% de las bandas en común. Uno de los aislados compartió menos del 10% de las bandas en común con los otros. El polimorfismo genético se comparó con la bioactividad y los resultados de bioquímica. Determinándose la existencia de al menos 24 fenotipos de *P. denitrificans*.





**Figura 10.** Dendrograma que muestra el polimorfismo genético de aislados de pertenecientes presuntamente al género *Pseudovibrio*. La relación entre los aislados se estimó en función de las proporciones de las bandas compartidas.

Varios autores señalan que la actividad antibacteriana de *Pseudovibrios* depende los genotipos aislados de las esponjas (Esteves et al., 2013; O' Halloran et al., 2011) . Si bien la secuenciación del gen del ARNr 16S proporciona información sobre la posición filogenética de los aislados desconocidos, no siempre permite la discriminación entre aislados de la misma especie o especies diferentes, que tienen secuencias del gen 16S rRNA altamente conservadas. Debido a la considerable similitud de secuencia entre las secuencias del gen 16S rRNA, se empleó un método alternativo (RAPDs) para investigar la diversidad genética entre los aislados de *Pseudovibrio*. Este estudio corrobora que distintas cepas de *Pseudovibrio* pueden ocupar distintos nichos y coexistir en las esponjas del género *Aplysina*, donde podrían cumplir distintos roles metabólicos en beneficio de la esponja (Versluis et al., 2018) . Nuestros resultados indican que la efectividad de *P. denitrificans* en acuicultura como probiótico dependerá del fenotipo aislado. Para continuar los estudios se eligieron los fenotipos Ps11 y Ps17, diferentes por RAPDs y bioquímica, pero con fuertes cualidades antagónicas contra los vibrios de camarón.

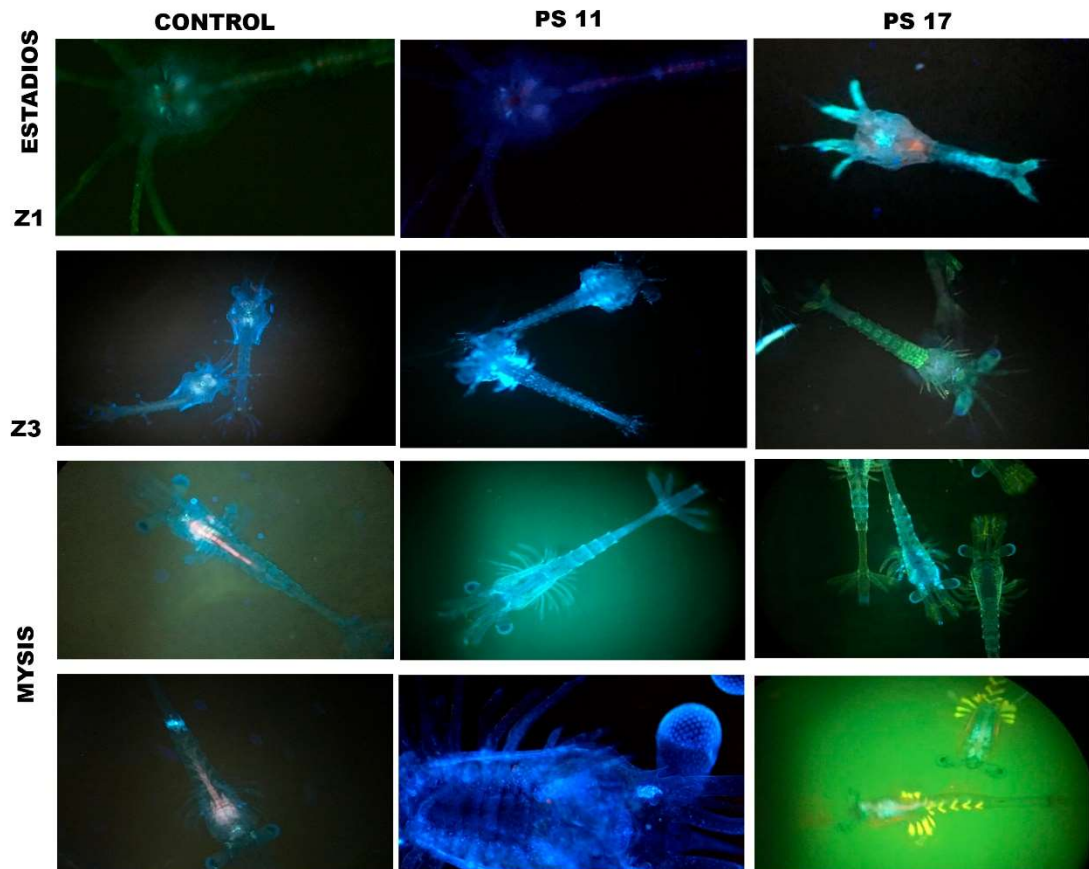
### 3.2. Cualidades probióticas de *P. denitrificans*

#### 3.2.1. Cualidades colonizadoras del simbiote marino *P. denitrificans*, Ps 17, en el ambiente de cultivo de camarón.

La capacidad colonizadora en sistemas de cultivo de *P. denitrificans* fue evaluada desde diferentes perspectivas, capacidad de adherirse a la cutícula del camarón, capacidad de crecer en el alimento.

#### **3.2.1.1.Capacidad colonizadora de *P. denitrificans* Ps11 Y Ps17 en larvas de camarón.**

La tinción de *P. denitrificans* con los colorantes fluorescentes permitió verificar que los fenotipo Ps11 y Ps17 se adhieren a la cutícula del camarón en sus diversos estadios. (Figura 11). Los resultados corroboraron que los dos fenotipos de *P. denitrificans* colonizan las larvas. El análisis microbiológico confirmó la presencia de *Pseudovibrio* en larvas y en estómagos de camarón. Varias cepas de *Pseudovibrio spp.* han sido identificadas como simbioses de muchos invertebrados bentónicos marinos (Bondarev et al., 2013) , incluidos en intestinos de los camarones (Vargas-Albores et al., 2017) . La versatilidad metabólica del *Pseudovibrio*, favorece su asociación con sus huéspedes invertebrados y nuestros resultados indican que es capaz de asociarse a las a la cutícula larvas del camarón y que por lo tanto podría excluir a los vibrios de este sustrato.

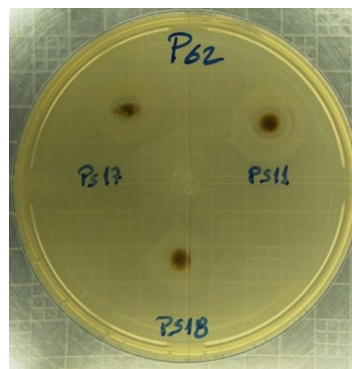


**Figura 11.** Colonización de *P. denitrificans* en estadios larvarios de camarón *P. vannamei*. *P. denitrificans* fenotipo Ps11 teñido con DAPI y fenotipo Ps17 teñido con naranja de acridina. Cada inóculo bacteriano estuvo a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

### 3.2.1.2. Interacción de *P. denitrificans* con el probiótico *Vibrio hepatarius* (P62).

Los resultados de inhibición competitiva y estudios de metabolómica indican que la presencia de vibrios estimula la bioactividad de *P. denitrificans* (Chalén-Alvarado, Quiroz-Moreno, Mogollón, Domínguez, & Rodríguez, 2019). Por lo tanto, como estrategia moduladora de la microbiota se optó por la combinación de *P. denitrificans* como probiótico sistémico capaz de ocupar distintos nichos y sustratos del ambiente de cultivo y *V. hepatarius* P62 (Gullian et al., 2004), un probiótico benéfico con alta afinidad por el hepatopáncreas de camarón y la materia orgánica, en el alimento. El cocultivo de diferentes cepas bacterianas y/o fúngicas, ha demostrado ser una ruta muy prometedora para el descubrimiento de metabolitos secundarios. Según Romano (2018) aplicando ensayos de laboratorio bajo el marco de “Una cepa de muchos compuestos” OSMAC (por sus siglas en inglés “one strain many compounds”) que menciona cómo una sola cepa puede producir diferentes moléculas cuando se cultiva en diferentes condiciones ambientales. Aplicar el marco OSMAC podría dar como

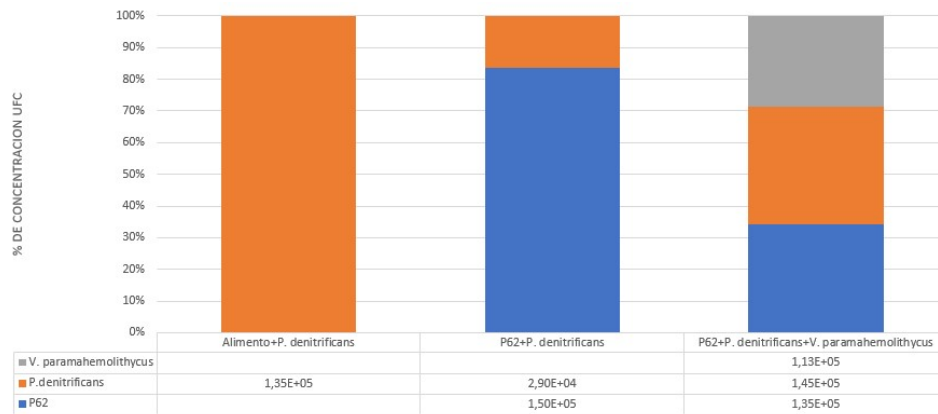
resultado el desbloqueo de la diversidad química de genes silenciosos que controlan las cepas bacterianas, permitiendo el descubrimiento de nuevas moléculas de interés médico y biotecnológico. Chalén-Alvarado et al., (2019) observó perfiles metabolómicos diferentes en ensayos de antagonismo de *Pseudovibrios* con *V. harveyi*. Este ensayo sugiere que existe un compuesto producido únicamente en *P. denitrificans* que ha sido metabolizado durante la interacción bacteriana, en el momento de la exposición con *P. denitrificans*. Lo que sugiere hipotetizar que *Pseudovibrio* produce metabolitos al ser expuesta con vibrio, este antagonismo de *Pseudovibrio* con *Vibrio* (probiótico P62) se demostró in vitro contra una cepa probiótica de *V. hepatarius* P62 (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de *Pseudovibrio denitrificans* sobre *Vibrio hepatarius*

### 3.2.1.3. Ensayos de crecimiento de *P. denitrificans* Ps 17 en alimento de camarón

Otro sustrato para los vibrios en los sistemas de cultivo es el alimento balanceado. El crecimiento de *P. denitrificans* en el alimento fue de  $1 \times 10^5$  UFC/g. Cuando se añadió *P. denitrificans* en combinación con *V. hepatarius* (P62) el crecimiento de *P. denitrificans* fue de 15%. Si el alimento es expuesto además a *V. parahaemolyticus* BA94C2, la mejor combinación para excluirlo fue la combinación *P. denitrificans* y *V. hepatarius* (Figura 13).



**Figura 13.** Crecimiento de *P. denitrificans* (Ps17) en alimento en combinación *V. hepatarius* (Probiótico P62).

Se podría pensar que la presencia de toxinas producidas por *V. parahaemolyticus* provoca un efecto de crecimiento del *Pseudovibrio*. Este comportamiento ha sido visualizado en nuestro ensayo con algas (Anexos 2). Xu et al., (2017) describió que un *Geobacillus sp.*, produjo un nuevo quinoide antitumoral solo cuando se lo desafió con un bacteriofago.

### 3.2.2. Ensayos de *P. denitrificans* y probiótico *Vibrio hepatarius* (P62) en camarones juveniles

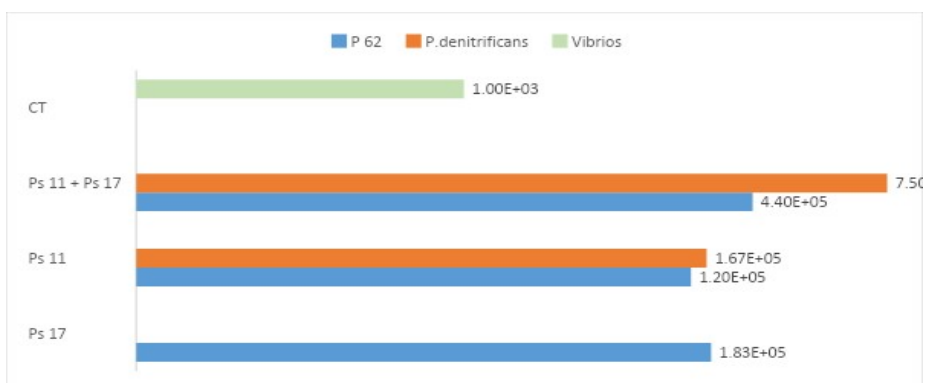
*P. denitrificans* se aplicó como tratamiento en juveniles de camarón, antes de hacer un desafío con *V. parahaemolyticus*. Antes del desafío se chequeó peso y se realizó un análisis microbiológico. El efecto de *P. denitrificans* sobre la microbiota se verificó mediante análisis metagenómico. No se observó ningún efecto sobre el peso en los camarones tratados las dos cepas de *P. denitrificans* (Ps11, Ps17 y Mezcla). Los promedios de peso se ubicaron entre 5,7 a 6,1 g y no existieron diferencias significativas  $P < 0,61$ ) entre los tratamientos (Tabla 3), confirmando la inocuidad del *Pseudovibrio*. La mayoría de *Pseudovibrios* se asocia comúnmente con animales o tejidos sanos, por lo que se indica que su presencia es beneficiosa o al menos neutral (Alex & Antunes, 2015; Versluis et al., 2018).

**Tabla 3.** Pesos promedios de camarones juveniles tratados con *Pseudovibrio denitrificans*.

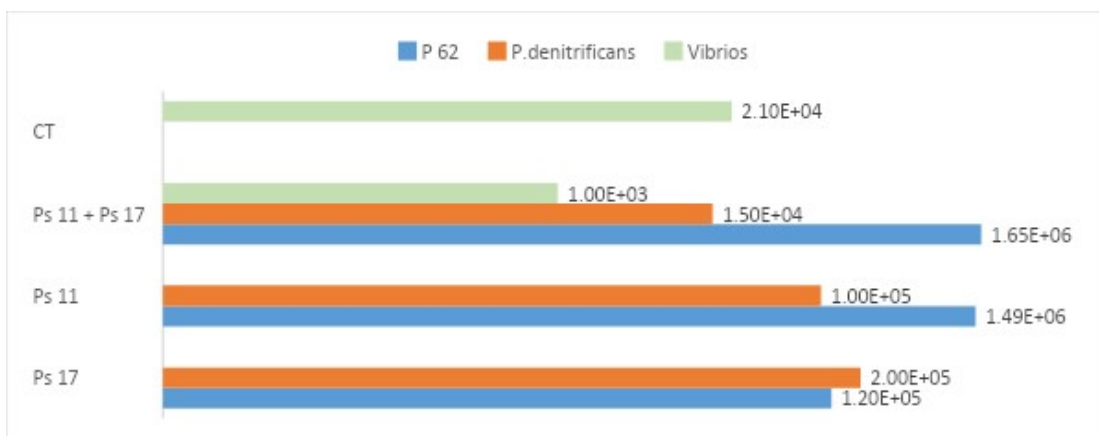
Tratamientos	Peso promedio (g)	Densidad de siembra (camarones/40 litros)
CT	6,1±0,5 a	10
PS11	5,7±0,8 a	10
PS11+PS17	6,1±0,6 a	10
Ps17	5,9±1,2 a	10

### 3.2.2.1. Análisis microbiológico de estómago e intestino

Los análisis microbiológicos mostraron una reducción de vibrios en muestras de estómagos (Figura 14) e intestinos (Figura 15) de camarones tratados con *P. denitrificans*. Prácticamente el único vibrio que se observó fue el probiótico P 62.



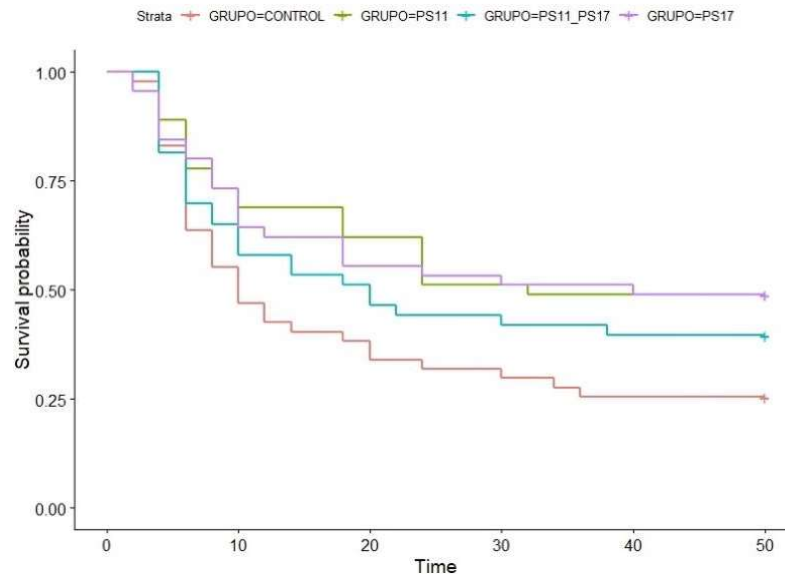
**Figura 14.** Colonización de *P. denitrificans* en juveniles (estómago).



**Figura 15.** Ensayos de colonización de *P. denitrificans* con juveniles (intestino).

### 3.2.2.2. Ensayo de desafío con *V. parahaemolyticus* BA94C2, causante de AHPND en camarones tratados con *P. denitrificans* Ps17 y *Vibrio hepatarius* (P62)

Inicialmente la mortalidad de los grupos tratados y el control no fue diferente. (Figura 16). Sin embargo a las 50 horas de infección, los camarones tratados con los grupos Ps11 y Ps17 y la mezcla (PS17 y ps11) obtuvieron supervivencias de 50 y 48% respectivamente. El análisis de supervivencia realizado mediante Kaplan Meier indicó diferencias significativas en las curvas de mortalidad ( $p < 0,02$ ).

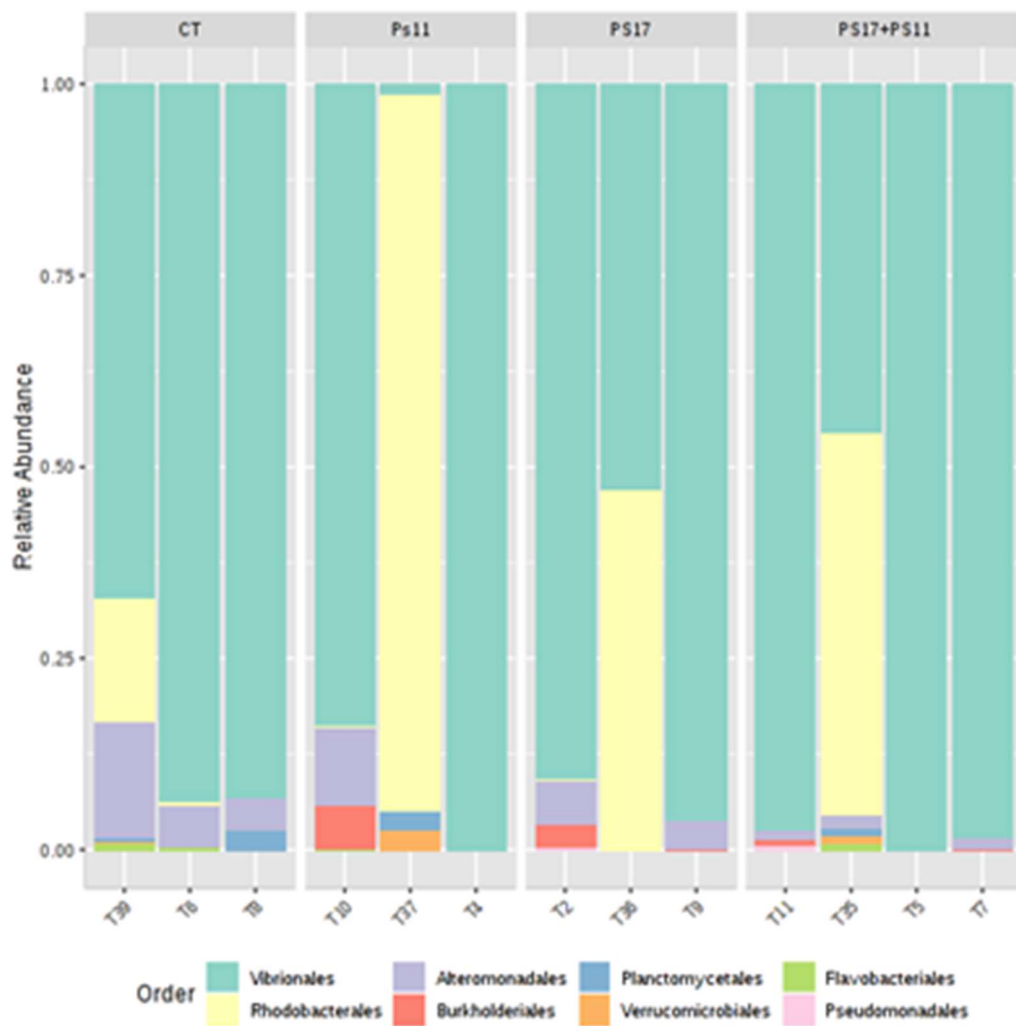


**Figura 16.** Curvas de mortalidad de camarones juveniles tratados con *P. denitrificans* Ps17, desafiados con *V. parahaemolyticus* BA94C2.

Estos resultados indican que *P. denitrificans* en camarones juveniles ayuda a controlar las vibriosis causadas por *V. parahaemolyticus*. *Vibrio parahaemolyticus*. se han asociado con mortalidades severas en el cultivo de camarones, principalmente larvicultura en criaderos de camarones (Kongrueng et al., 2015; Yang & Defoidt, 2015). Su capacidad de convivir con las microalgas y de adherirse a las cutículas de las larvas, indica que también podría utilizarse en larvicultura de camarón. AHPND puede también afectar a otras especies como moluscos. Mendoza-Maldonado et al., (2018) menciona que ensayos realizado en *Agropecten ventricosas* afecto a larvas y juveniles. Además, podría evaluarse *P. denitrificans* en otros cultivos acuícolas que servirán como herramienta para combatir enfermedades bacterianas en acuicultura.

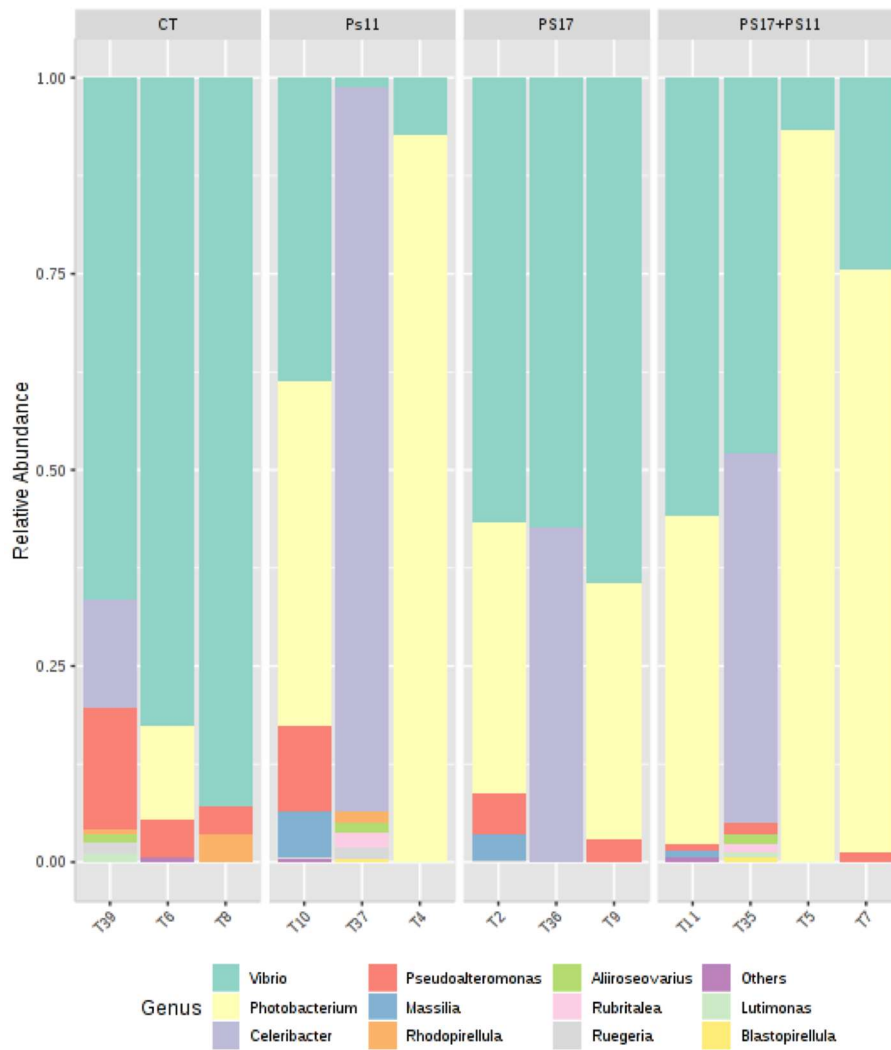
### 3.2.2.3. Microbiota del estómago de camarones tratados con *P. denitrificans* antes y después del desafío con *V. parahaemolyticus*

A pesar de existir vibrios en todos los tratamientos fue evidente que la aplicación de *P. denitrificans* influyó en la composición de la microbiota del estómago. Se debe recordar que la microbiología clásica mostró que la composición de vibrios en los tratamientos estaba dominada por el probióticos P.62. En conjunto estos resultados indican que tanto *P. denitrificans* puede convivir con P. 62, y por lo tanto combinarse de manera exitosa. Otros vibrios dominaron en el control. En los camarones del tratamiento PS11 (*P. denitrificans* fenotipo 11) se observaron menos vibrios que en los camarones de los tratamientos Ps17 y la mezcla (Ps11+Ps17). En los camarones tratados con *Pseudovibrio* aparecieron los géneros bacterianos *Photobacterium* y *Celeribacter*.(Figura 17).

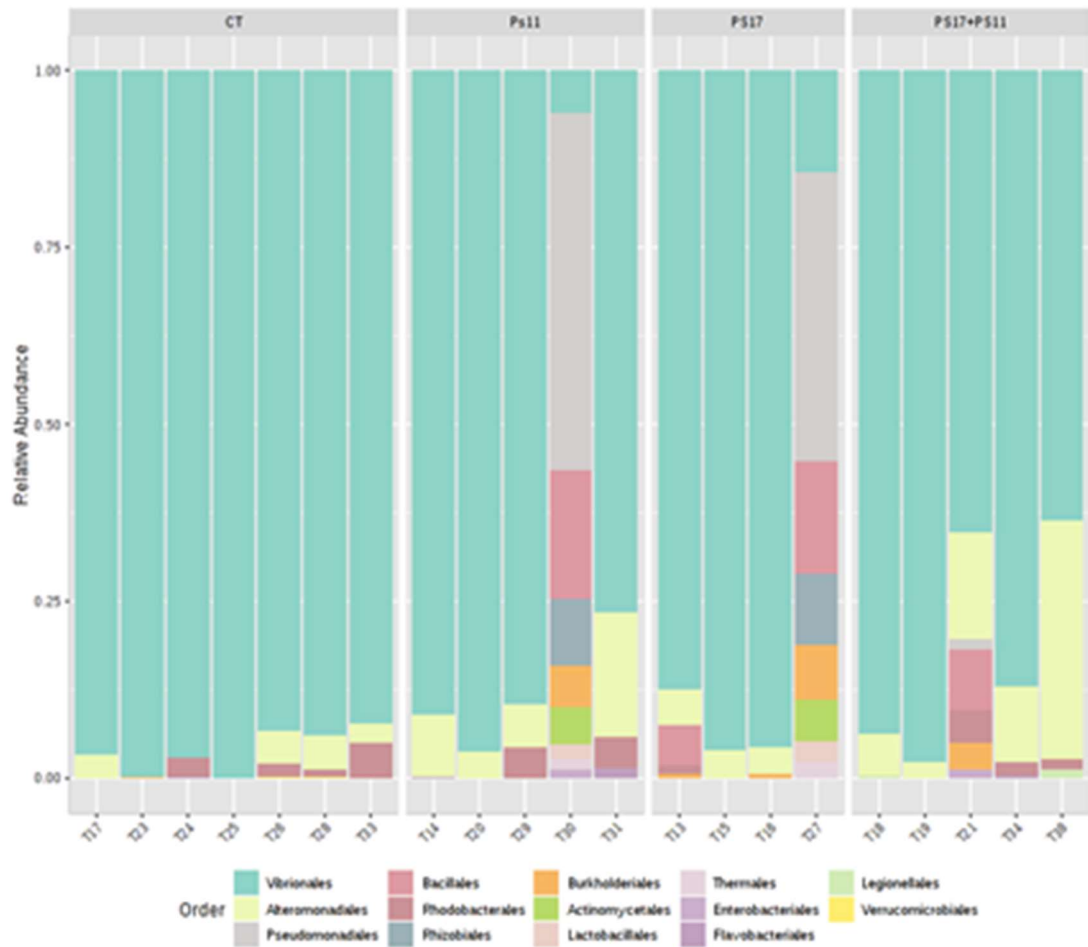


**Figura 17.** Microbiota del estómago de camarones juveniles tratados con *P. denitrificans* Ps17. A nivel de Orden



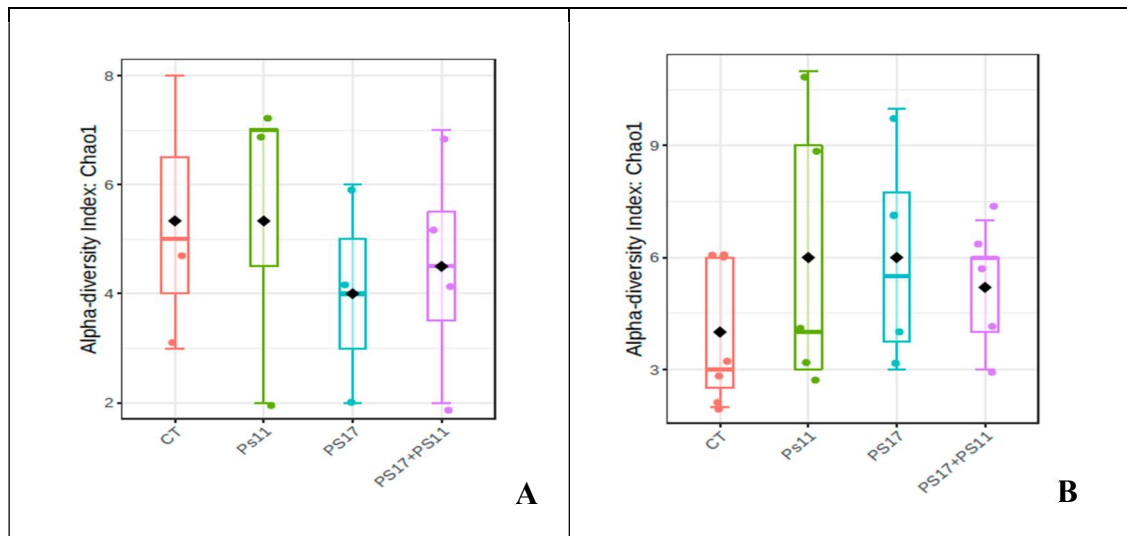


**Figura 18.** Géneros bacterianos encontrados en el estómago de camarones juveniles tratados con *P. denitrificans* Ps17



**Figura 19.** Microbiota encontrado en el estómago de camarones juveniles tratados con *P. denitrificans* Ps17 y desafiados con AHPND

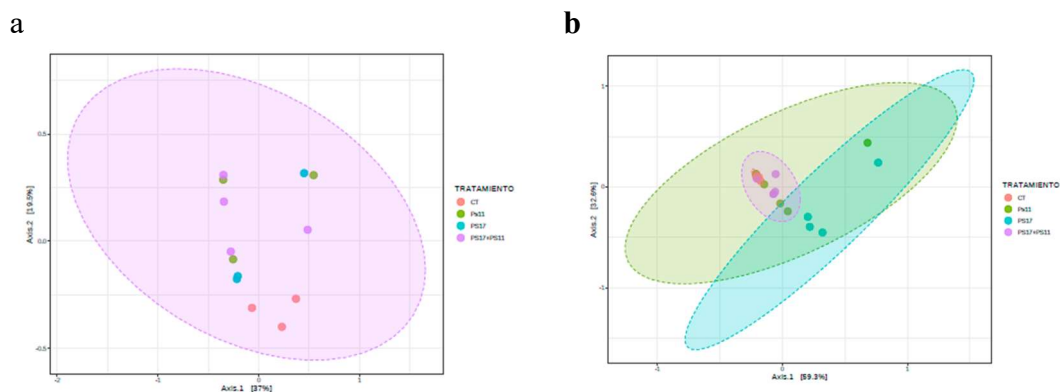
El análisis de los datos no arrojó la presencia del género *Pseudovibrio* en los tratamientos. En la tabla de OTUs, *Pseudovibrio* está presente, pero en porcentajes muy bajos. Antes del desafío, la riqueza de especies bacterianas en los camarones del tratamiento Ps11 fue mayor que en los camarones de los tratamientos PS17, PS17+PS11 y CT. Después del desafío también se observó mayor riqueza de géneros en los camarones tratados con *P. denitrificans* PS11 (Figura 20). La  $\alpha$  diversidad (índice de Chao1), no fue estadísticamente significativa entre los tratamientos (Figura. 19) tampoco se observó diferencias estadísticas en  $\alpha$  diversidad después de la infección con *V. parahaemolyticus*.



**Figura 20.** Distribución de los valores del índice de diversidad de Chao1 para muestras de camarones tratados *Pseudovibrios*: **a)** Camarones antes de infección con AHPND , **b)** Camarones después de infección con AHPND.

La diversidad  $\beta$  del microbiota presente en el estómago de los camarones *P. vannamei* tratados con *P. denitrificans*, antes y después de la infección, se investigó a través de un PCoA como se muestra en la Figura 21. No hubo diferencias significativas entre los camarones tratados con *P. denitrificans* y los camarones del control ( $p < 0.372$ ). Sin embargo, después de la infección con *V. parahaemolyticus* BA94C2 si se encontraron diferencias significativas  $p$ -value  $< 0.034$ . Estas diferencias en diversidad  $\beta$  de OTUs se observaron entre los camarones tratados con Ps 17 y el control ( $p$ -value  $< 0.004$ ).

Tratamientos	diff	lwr	upr	p adj
Ps11-CT	-0.4641733	-13.242.185	0.39587196	0,44 a
PS17-CT	-0.8452666	-17.658.900	0.04135683	0,04 b
PS17+PS11-CT	-0.1546155	-10.146.608	0.70542969	0,96 a
PS17-Ps11	-0.3810933	-13.663.989	0.60421227	0,69 a
PS17+PS11-Ps11	0.3095577	-0.6193973	123.851.274	0,78 a
PS17+PS11-PS17	0.6906510	-0.2946545	167.595.663	0,23 a

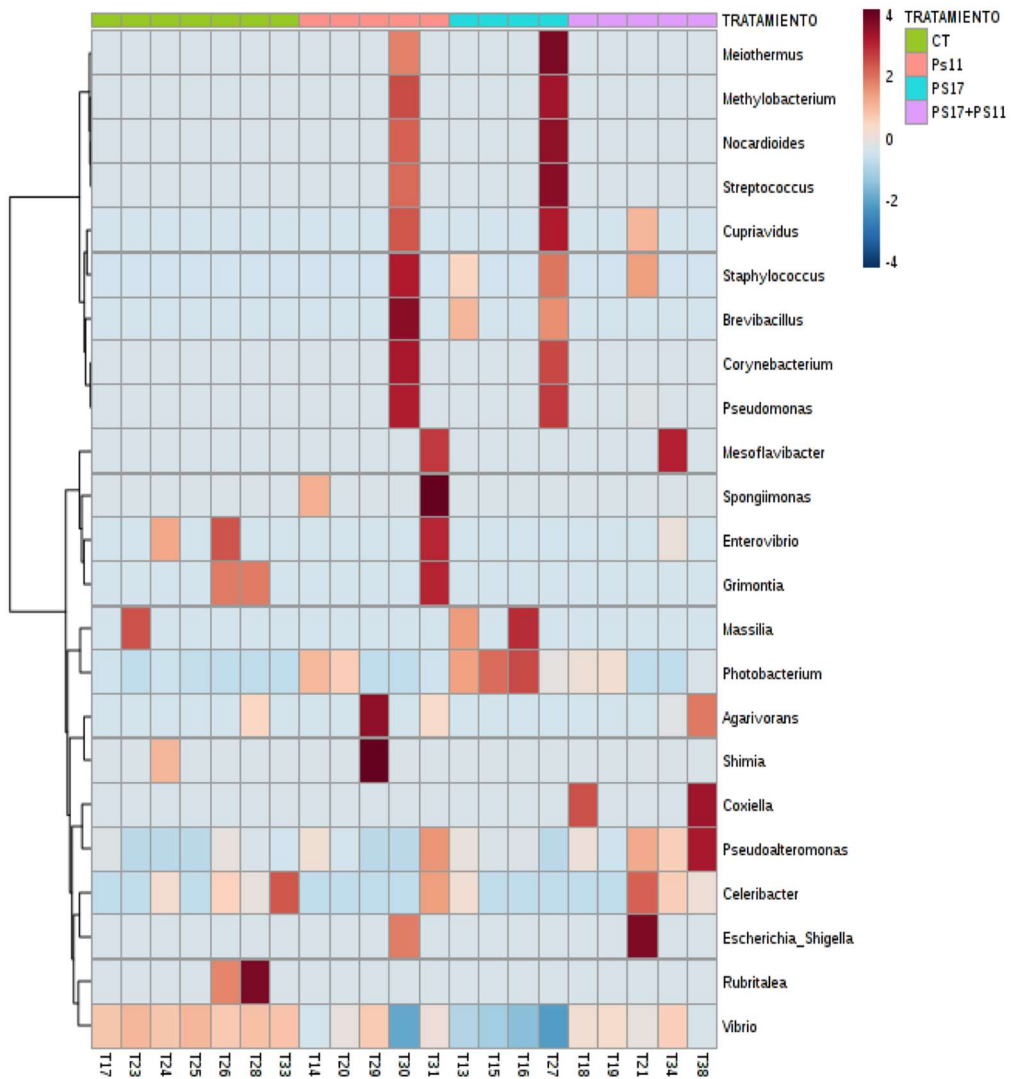


**Figura 21.** Beta diversidad para muestras de camarones tratados con *P. denitrificans* **a)** Camarones antes de infección con AHPND , **b)** Camarones después de infección con AHPND.

Los estudios sobre la microbiota de *P. vannamei* se han enfocado en la composición microbiana de los camarones de tipo salvaje que sirven como una línea de base importante para futuros estudios comparativos (Cornejo-Granados, Gallardo-Becerra, Leonardo-Reza, Ochoa-Romo, & Ochoa-Leyva, 2018) , así como los impactos de la exposición a enfermedad, etapas de desarrollo (Fan et al., 2019) ,nutrición (M. Zhang et al., 2014) y temperatura (Tang et al., 2014) en el microbioma intestinal del camarón. Sin embargo, la mayoría de los estudios analizaron muestras del intestino medio y posterior del camarón (el intestino) en lugar de las del intestino anterior (el estómago). Nuestro estudio se realizó en estómago de camarón para evaluar el posible cambio de la microbiota al adicionar *P. denitrificans* en los acuarios de cultivos. Además de evaluar los organismos tratados frente a un desafío con AHPND. Varios estudios (Fan et al., 2019; Lai et al., 2015) indicaron que la presencia de AHPND está asociada a la microbiota presente en el estómago del camarón. En el heat map podemos observar que luego de la infección con *V. parahaemolyticus* existió mayor abundancia de vibrios en el control, observándose menos vibrios en el tratamiento con PS17. Curiosamente, después del desafío se observó la presencia de géneros bacterianos que inicialmente no se detectaron (Figura 19 y Figura 20).

La estructura y la dinámica de la comunidad bacteriana en el agua de mar de los acuarios fueron claramente diferentes de las de los estómagos de camarones tratados con *Pseudovibrios* (Anexo 3), lo que sugiere el variado proceso de desarrollo de microbiomas en diferentes entornos. La baja similitud (13-35%) de las comunidades bacterianas entre el agua de mar (datos no presentados) y el estómago en los camarones se observó en estudios previos por Cardona et al.,( 2016). En nuestro estudio se muestran ordenes bacterianos Vibrionales y Rhodobacteriales, considerados "indicadores de enfermedad". Además se evidencio Flavobacteriales, Acidimicrobiales y Alteromonadales (Figura 16 y Figura 18) que son considerados

indicadores de salud. Este efecto de condición de enfermedad y salud lo demuestra (Zheng et al., 2017) al comparar las comunidades bacterianas entre camarones sanos/enfermos, y encontraron que Bacilli, Flavobacteriales, Acidimicrobiales y Alteromonadales eran más abundantes en camarones sanos, mientras que Actinomycetales, Sphingobacteriales, y Vibrionales fueron dominantes en camarones enfermos. También se demostró que algunos grupos bacterianos (como Flavobacteriales y Thiotrichales ) podrían considerarse como "indicadores de salud" para predecir el estado de salud del camarón, y algunas otras bacterias (como Rhodobacterales y Planctomycetales ) podrían considerarse como "indicadores de enfermedad" (M. Zhang et al., 2014). La presencia de los órdenes indicadores de enfermedad en nuestro estudio, se debió a que nuestros camarones fueron desafiados con *V. parahaemolyticus* y eran positivos para AHPND. A pesar de esto, este estudio reveló que el *Pseudovibrios* modula la microbiota del estómago de los camarones, influyendo posiblemente de esta forma, de manera positiva en la supervivencia de los camarones desafiados.



**Figura 22.** Mapa de calor que muestra la abundancia de comunidades bacterianas detectadas en cultivo de camarón producidos con *P. dentrificans* (Ps11, Ps17, Mezcla),

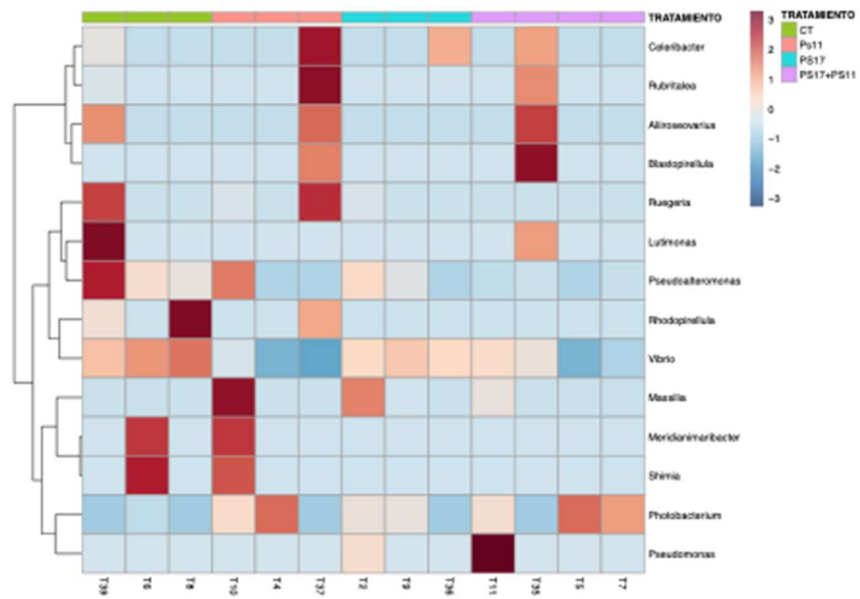


Figura 23. Mapa de calor que muestra la abundancia de comunidades bacterianas detectadas en cultivo de camarón producidos con *P. denitrificans* (Ps11, Ps17, Mezcla) y desafiados con *V. parahaemolyticus*

## CONCLUSIONES

Los ambientes marinos poseen microorganismos marinos simbioses con capacidades biosintéticas grandes y potencialmente útiles

La caracterización de la microbiota de *Aplysina* spp. sirvió para obtener una lista de una amplia gama de posibles cepas probióticas. Se aislaron exitosamente 40 fenotipos de *Pseudovibrio denitrificans*. Se obtuvieron 2 cepas con mejores potenciales probióticos (capaces de combatir vibrios) para acuicultura de camarón.

En este estudio encontramos que el simbionte marino usado como probiótico de camarón *P. denitrificans* es capaz de modificar la microbiota de *P. vannamei*, así como de crecer en distintos sustratos de los sistemas de cultivo e incrementar la supervivencia.

La administración *P. denitrificans* en combinación con P62 en sistemas de cultivo de juveniles de camarón ayudó a acondicionar el paisaje adaptivo en el estómago de camarón frente a la infección con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. Produciendo microbiota indicadoras de buena salud.

## RECOMENDACIONES

Considerando que la microbiota de las Aplysinas se encontró con variedad de cepas identificadas como probióticas. Es necesario seleccionar o modificar medios de cultivo para aislar nuevas cepas que ayuden a combatir enfermedades de camarón.

Por cada aislamiento de cepas es necesario evaluar el fenotipo y su actividad como pasos iniciales en la caracterización de nuevos probióticos.



## BIBLIOGRAFIA

- Aguila-Ramírez, R. N., Hernández-Guerrero, C. J., González-Acosta, B., Id-Daoud, G., Hewitt, S., Pope, J., & Hellio, C. (2014). Antifouling activity of symbiotic bacteria from sponge *Aplysina gerardogreeni*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *90*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.02.003>
- Akone, S. H., Mándi, A., Kurtán, T., Hartmann, R., Lin, W., Daletos, G., & Proksch, P. (2016). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal–bacterial co-culture and epigenetic modification. *Tetrahedron*, *72*(41), 6340–6347. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.08.022>
- Alex, A., & Antunes, A. (2015). Whole genome sequencing of the symbiont pseudovibrio sp. from the intertidal marine sponge *Polymastia penicillus* revealed a gene repertoire for host-switching permissive lifestyle. *Genome Biology and Evolution*, *7*(11), 3022–3032. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv199>
- Alex, A., Silva, V., Vasconcelos, V., & Antunes, A. (2013). Evidence of unique and generalist microbes in distantly related sympatric intertidal marine sponges (Porifera: Demospongiae). *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080653>
- Ardile Tapia, V. C., & Rodríguez Leon, J. A. (2015). Análisis de la microflora asociada a *Aplysina* sp., recolectada en el islote El Pelado-Ayangue provincia de Santa Elena (Ecuador), en la búsqueda de nuevos probióticos para uso acuícola, 44. Retrieved from [http://opac.pucv.cl/pucv\\_txt/txt-6500/UCE6999\\_01.pdf](http://opac.pucv.cl/pucv_txt/txt-6500/UCE6999_01.pdf)
- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, *114*(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Dolores Evora, M., & Luis Múzquiz, J. (2006). Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *18*(1), 61–63. <https://doi.org/10.1080/08910600600761331>
- Barman, P., Bandyopadhyay, P., Kati, A., Paul, T., Mandal, A. K., Mondal, K. C., & Mohapatra, P. K. Das. (2018). Characterization and Strain Improvement of Aerobic Denitrifying EPS Producing Bacterium *Bacillus cereus* PB88 for Shrimp Water Quality Management. *Waste and Biomass Valorization*, *9*(8), 1319–1330. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9912-2>
- Baruah, K., Norouzitallab, P., Phong, H. P. P. D., Smagghe, G., & Bossier, P. (2017). Enhanced resistance against *Vibrio harveyi* infection by carvacrol and its association with the induction of heat shock protein 72 in gnotobiotic *Artemia franciscana*. *Cell Stress and Chaperones*, *22*(3), 377–387. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0775-z>

- Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., ... Bourguet-Kondracki, M. L. (2015). Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Marine Environmental Research*, *104*, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.12.005>
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A., & Christie, P. J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology*, *164*(6), 620–639. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
- Blanchet, E., Prado, S., Stien, D., da Silva, J. O., Ferandin, Y., Batailler, N., ... Lami, R. (2017). Quorum sensing and quorum quenching in the Mediterranean Seagrass *Posidonia Oceanica* microbiota. *Frontiers in Marine Science*, *4*(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00218>
- Bliven, K. A., & Maurelli, A. T. (2012). Antivirulence genes: Insights into pathogen evolution through gene loss. *Infection and Immunity*, *80*(12), 4061–4070. <https://doi.org/10.1128/IAI.00740-12>
- Bondarev, V., Richter, M., Romano, S., Piel, J., Schwedt, A., & Schulz-Vogt, H. N. (2013). The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. *Environmental Microbiology*, *15*(7), 2095–2113. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12123>
- Brown, M. (2011). Modes of action of probiotics: Recent developments. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. <https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1895.1900>
- Burgsdorf, I., Slaby, B. M., Handley, K. M., Haber, M., Blom, J., Marshall, C. W., ... Steindler, L. (2015). Lifestyle evolution in cyanobacterial symbionts of sponges. *MBio*, *6*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00391-15>
- Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., ... Saulnier, D. (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*, *16*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>
- 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*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09923-6>
- Chiou, S. F., Kuo, J., Wong, T. Y., Fan, T. Y., Tew, K. S., & Liu, J. K. (2010). Analysis of the coral associated bacterial community structures in healthy and diseased corals from off-shore of southern Taiwan. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *45*(5), 408–415. <https://doi.org/10.1080/03601231003800032>
- Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2017). The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation.

- Aquaculture*, 473, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.033>
- Cloete, T. E., & Archibald, R. E. M. (1991). The use of dapi in the quantification of sessile bacteria on submerged surfaces. *Biofouling*, 4(4), 265–274. <https://doi.org/10.1080/08927019109378217>
- Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Leonardo-Reza, M., Ochoa-Romo, J. P., & Ochoa-Leyva, A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*, 2018(8). <https://doi.org/10.7717/peerj.5382>
- Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 343–359. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>
- Coutteau, P. (2014). Functional feed additives to prevent disease in farmed shrimp. *Aquafeed: Advances in Processing & Formulation*, 7(4), 24–27.
- Cuvelier, M. L., Blake, E., Mulheron, R., McCarthy, P. J., Blackwelder, P., Thurber, R. L. V., & Lopez, J. V. (2014). Two distinct microbial communities revealed in the sponge cinachyrella. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00581>
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., Abdel-Daim, M. M., & Van Doan, H. (2018). Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1–18. <https://doi.org/10.1111/raq.12272>
- de Voogd, N. J., Cleary, D. F. R., Polónia, A. R. M., & Gomes, N. C. M. (2015). Bacterial community composition and predicted functional ecology of sponges, sediment and seawater from the thousand islands reef complex, West Java, Indonesia. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(4), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv019>
- Domingues, S., Nielsen, K. M., & da Silva, G. J. (2012). Various pathways leading to the acquisition of antibiotic resistance by natural transformation. *Mobile Genetic Elements*, 2(6), 257–260. <https://doi.org/10.4161/mge.23089>
- Domínguez-Borbor, C., Ardiles, V., Bermeo, M., Bolívar-Alvarado, C., Tomalá, C., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. A. (2019). The marine symbiont *Pseudovibrio denitrificans*, is effective to control pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 508(October 2018), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.077>
- Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., ... Bourguet-Kondracki, M. L. (2014). Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Letters in Applied Microbiology*, 58(1), 42–52. <https://doi.org/10.1111/lam.12154>

- Easson, C. G., & Thacker, R. W. (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers in Microbiology*, 5(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00532>
- Esteves, A. I. S., Cullen, A., & Thomas, T. (2017). Competitive interactions between sponge-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(3), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix008>
- Esteves, A. I. S., Hardoim, C. C. P., Xavier, J. R., Gonçalves, J. M. S., & Costa, R. (2013). Molecular richness and biotechnological potential of bacteria cultured from Irciniidae sponges in the north-east Atlantic. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 519–536. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12140>
- Fan, J., Chen, L., Mai, G., Zhang, H., Yang, J., Deng, D., & Ma, Y. (2019). Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. *Scientific Reports*, 9(1), 2–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37042-3>
- Fang, H., Cai, L., Yang, Y., Ju, F., Li, X., Yu, Y., & Zhang, T. (2014). Metagenomic analysis reveals potential biodegradation pathways of persistent pesticides in freshwater and marine sediments. *Science of the Total Environment*, 470–471, 983–992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.076>
- Farag, I. F., Davis, J. P., Youssef, N. H., & Elshahed, M. S. (2014). Global patterns of abundance, diversity and community structure of the aminicenantes (Candidate Phylum OP8). *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092139>
- Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M., & Hentschel, U. (2004). Discovery of the Novel Candidate Phylum ‘ ‘ Poribacteria ’ ’ in Marine Sponges Discovery of the Novel Candidate Phylum “ Poribacteria ” in Marine Sponges. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3724–3732. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3724>
- Flemer, B., Kennedy, J., Margassery, L. M., Morrissey, J. P., O’Gara, F., & Dobson, A. D. W. (2012). Diversity and antimicrobial activities of microbes from two Irish marine sponges, *Suberites carnosus* and *Leucosolenia* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 112(2), 289–301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05211.x>
- Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Tanaka, K., Yanagi, K., Yokota, A., & Harayama, S. (2006). *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(2), 343–347. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63879-0>
- Gao, X. Y., Liu, Y., Miao, L. L., Li, E. W., Hou, T. T., & Liu, Z. P. (2017). Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0323-3>
- Geng, H., & Belas, R. (2010). Expression of tropodithietic acid biosynthesis is

- controlled by a novel autoinducer. *Journal of Bacteriology*, 192(17), 4377–4387. <https://doi.org/10.1128/JB.00410-10>
- Gozari, M., Mortazavi, M. S., Bahador, N., Tamadoni Jahromi, S., & Rabbaniha, M. (2016). Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2), 630–644.
- Graça, A. P., Bondoso, J., Gaspar, H., Xavier, J. R., Monteiro, M. C., De La Cruz, M., ... Lage, O. M. (2013). Antimicrobial activity of heterotrophic bacterial communities from the marine sponge *Erylus discophorus* (Astrophorida, Geodiidae). *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078992>
- Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1–4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>
- Gyles, C., & Boerlin, P. (2014). Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Veterinary Pathology*, 51(2), 328–340. <https://doi.org/10.1177/0300985813511131>
- Harrington, C., Reen, F. J., Mooij, M. J., Stewart, F. A., Chabot, J. B., Guerra, A. F., ... O’Gara, F. (2014). Characterisation of non-autoinducing tropodithietic acid (TDA) production from marine sponge pseudovibrio species. *Marine Drugs*, 12(12), 5960–5978. <https://doi.org/10.3390/md12125960>
- He, Y., Ju, C., & Zhang, X. (2015). Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans. *Molecular Immunology*, 68(2), 399–403. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.008>
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M., & Taylor, M. W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 641–654. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2839>
- Hosoya, S., & Yokota, A. (2007a). *Flammeovirga kamogawensis* sp. nov., isolated from coastal seawater in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(6), 1327–1330. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64977-0>
- Hosoya, S., & Yokota, A. (2007b). *Pseudovibrio japonicus* sp. nov., isolated from coastal seawater in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9), 1952–1955. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64922-0>
- Jensen, K. S., & Pedersen, M. F. (1994). *Spongilla lacustris*, 39(August 1990), 551–561.
- Kang, H. K., Seo, C. H., & Park, Y. (2015). Marine Peptides and Their Anti-Infective Activities, 618–654. <https://doi.org/10.3390/md13010618>
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., Wongprasert, K., Vandenberghe, J., ... No, E. R. (2017). Seaweeds as an

- alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture*, 110(1), 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.001>
- Keller-Costa, T., Jousset, A., Van Overbeek, L., Van Elsas, J. D., & Costa, R. (2014). The freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* harbours diverse *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales) with broad-spectrum antimicrobial activity. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088429>
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M., Mooij, M. J., ... Dobson, A. D. W. (2009). Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine Biotechnology*, 11(3), 384–396. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9154-1>
- Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S. A., Lejon, D. P. H., Morrissey, J. P., O’Gara, F., & Dobson, A. D. W. (2010). Marine metagenomics: New tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Marine Drugs*, 8(3), 608–628. <https://doi.org/10.3390/md8030608>
- Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S. A., Morrissey, J. P., Gara, F. O., & Dobson, A. D. W. (2014). Evidence of a Putative Deep Sea Specific Microbiome in Marine Sponges, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091092>
- Kidane, D., Ayora, S., Sweasy, J. B., Graumann, P. L., & Alonso, J. C. (2012). The cell pole: The site of cross talk between the DNA uptake and genetic recombination machinery. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(6), 531–555. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.729562>
- Kim, Y. S., Son, H. J., & Jeong, S. Y. (2015). Isolation of an algicide from a marine bacterium and its effects against the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and other harmful algal bloom species. *Journal of Microbiology*, 53(8), 511–517. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5303-1>
- Kongrueng, J., Tansila, N., Mitraparp-Arthorn, P., Nishibuchi, M., Vora, G. J., & Vuddhakul, V. (2015). LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Aquaculture International*, 23(5), 1179–1188. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9874-3>
- Kraft, B., Tegetmeyer, H. E., Meier, D., Geelhoed, J. S., & Strous, M. (2014). Rapid succession of uncultured marine bacterial and archaeal populations in a denitrifying continuous culture. *Environmental Microbiology*, 16(10), 3275–3286. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12552>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 87(November 2018), 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Lafi, F. F., Fuerst, J. A., Fieseler, L., Engels, C., Goh, W. W. L., & Hentschel, U. (2009). Widespread distribution of poribacteria in demospongiae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5695–5699.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00035-09>

- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. Te, Chen, I. T., Chuang, J. C., ... Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>
- Lakshmi, B., Viswanath, B., & Sai Gopal, D. V. R. (2013). Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *Journal of Pathogens*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/424123>
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Tang, K. F. J., Noble, B. L., Schofield, P., ... Navarro, S. A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>
- Margassery, L. M., Kennedy, J., O’Gara, F., Dobson, A. D., & Morrissey, J. P. (2012). Diversity and antibacterial activity of bacteria isolated from the coastal marine sponges *Amphilectus fucorum* and *Eurypon major*. *Letters in Applied Microbiology*, 55(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03256.x>
- Mendoza-Maldonado, G. B., Diarte-Plata, G., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Rodríguez-Jaramillo, C., Ruiz-Verdugo, C. A., ... Robles-Mungaray, M. (2018). Susceptibility and immune response of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) against *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND in shrimp. *Aquaculture*, 482(September), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.018>
- Mirbakhsh, M., Akhavan Sepahy, A., Afsharnasab, M., Khanafari, A., & Razavi, M. R. (2014). Molecular Identification of *Vibrio harveyi* from Larval Stage of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea:Decapoda) By Polymerase Chain Reaction and 16S rDNA Sequencing. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(2), 384–393.
- Moreira, A. P. B., Chimetto Tonon, L. A., Do Valle P. Pereira, C., Alves, N., Amado-Filho, G. M., Francini-Filho, R. B., ... Thompson, F. L. (2014). Culturable heterotrophic bacteria associated with healthy and bleached scleractinian *madracis decactis* and the fireworm *hermodice carunculata* from the remote St. Peter and St. Paul Archipelago, Brazil. *Current Microbiology*, 68(1), 38–46. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0435-1>
- Müller, W. E., Thakur, N. L., Ushijima, H., Thakur, A. N., Kraslo, A., Le Pennec, G., ... Bringmann, G. (2004). Matrix-mediated canal formation in primmorphs from the sponge *Suuberites domuncula* involves the expression of a CD36 receptor-ligand system. *Journal of Cell Science*, 117(12), 2579–2590. <https://doi.org/10.1242/jcs.01083>
- Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V., & Imhoff, J. F. (2008). Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial*

- Ecology*, 55(1), 94–106. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9255-9>
- Nagai, K., Kamigiri, K., Arao, N., Suzumura, K., Kawano, Y., Yamaoka, M., ... Suzuki, K. (2003). YM-266183 and YM-266184, Novel Thiopeptide Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* Isolated from a Marine Sponge. *The Journal of Antibiotics*, 56(2), 123–128. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.129>
- Natrah, F. M. I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F. M., & Defoirdt, T. (2014). Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 48–61. <https://doi.org/10.1111/raq.12024>
- Naughton, L. M., Romano, S., O’Gara, F., & Dobson, A. D. W. (2017). Identification of secondary metabolite gene clusters in the *Pseudovibrio* Genus reveals encouraging biosynthetic potential toward the production of novel bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01494>
- Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2015). Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases*, 38(11), 937–955. <https://doi.org/10.1111/jfd.12313>
- Nicacio, K. J., Ióca, L. P., Fróes, A. M., Leomil, L., Appolinario, L. R., Thompson, C. C., ... Berlinck, R. G. S. (2017). Cultures of the Marine Bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 Produce Bromotyrosine-Derived Alkaloids Previously Only Isolated from Marine Sponges. *Journal of Natural Products*, 80(2), 235–240. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00838>
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159(3–4), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>
- Ninawe, A. S., & Selvin, J. (2009). Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges A.S. Ninawe et al. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(1), 43–66. <https://doi.org/10.1080/10408410802667202>
- O’Halloran, J. A., Barbosa, T. M., Morrissey, J. P., Kennedy, J., O’Gara, F., & Dobson, A. D. W. (2011). Diversity and antimicrobial activity of *Pseudovibrio* spp. from Irish marine sponges. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), 1495–1508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05008.x>
- O’Connor-Sánchez, A., Rivera-Domínguez, A. J., Santos-Briones, C. de los, López-Aguilar, L. K., Peña-Ramírez, Y. J., & Prieto-Davo, A. (2014). Acidobacteria appear to dominate the microbiome of two sympatric Caribbean Sponges and one Zoanthid. *Biological Research*, 47, 67. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-67>
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Grolsman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299–304.



<https://doi.org/10.1038/35012500>

- Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R., & Moran, N. A. (2010). Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 247–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085305>
- Penesyan, A., Tebben, J., Lee, M., Thomas, T., Kjelleberg, S., Harder, T., & Egan, S. (2011). Identification of the antibacterial compound produced by the marine epiphytic bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and related sponge-associated bacteria. *Marine Drugs*, 9(8), 1391–1402. <https://doi.org/10.3390/md9081391>
- Pita, L., Rix, L., Slaby, B. M., Franke, A., & Hentschel, U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome*, 6(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0428-1>
- Raina, J. B., Tapiolas, D., Motti, C. A., Foret, S., Seemann, T., Tebben, J., ... Bourne, D. G. (2016). Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals. *PeerJ*, 2016(8), 1–20. <https://doi.org/10.7717/peerj.2275>
- Restrepo, L., Bayot, B., Bajaan, L., Betancourt, I., & Reyes Muñoz, A. (2019). Genomics and metagenomics: Tools for discovering and evaluating efficient shrimp probiotics. In Libro de resúmenes (Ed.), *XX CONGRESO ECUATORIANO DE ACUICULTURA* (pp. 12–13). Guayaquil, Ecuador.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>
- Riesenfeld, C. S., Murray, A. E., & Baker, B. J. (2008). Characterization of the microbial community and polyketide biosynthetic potential in the palmerolide-producing tunicate *Synoicum adareanum*. *Journal of Natural Products*, 71(11), 1812–1818. <https://doi.org/10.1021/np800287n>
- Rizzo, C., Michaud, L., Hörmann, B., Gerçe, B., Sylđatk, C., Hausmann, R., ... Lo Giudice, A. (2013). Bacteria associated with sabellids (Polychaeta: Annelida) as a novel source of surface active compounds. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1–2), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.020>
- Rodrigues, A. M. S., Rohée, C., Fabre, T., Batailler, N., Sautel, F., Carletti, I., ... Stien, D. (2017). Cytotoxic indole alkaloids from *Pseudovibrio denitrificans* BBCC725. *Tetrahedron Letters*, 58(32), 3172–3173. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.07.005>
- Romano, S. (2018). Ecology and Biotechnological Potential of Bacteria Belonging to the Genus *Pseudovibrio*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8), 1–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02516-17>

- Romano, S., Schulz-Vogt, H. N., González, J. M., & Bondarev, V. (2015). Phosphate limitation induces drastic physiological changes, virulence-related gene expression, and secondary metabolite production in *Pseudovibrio* sp. strain FO-BEG1. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(10), 3518–3528. <https://doi.org/10.1128/AEM.04167-14>
- Santos, O. C. S., Pontes, P. V. M. L., Santos, J. F. M., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., & Laport, M. S. (2010a). Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*, *161*(7), 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.013>
- Santos, O. C. S., Pontes, P. V. M. L., Santos, J. F. M., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., & Laport, M. S. (2010b). Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*, *161*(7), 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.013>
- Saurav, K., Bar-Shalom, R., Haber, M., Burgsdorf, I., Oliviero, G., Costantino, V., ... Steindler, L. (2016). In search of alternative antibiotic drugs: Quorum-quenching activity in sponges and their bacterial isolates. *Frontiers in Microbiology*, *7*(APR), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00416>
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., ... Taylor, M. W. (2012). Assessing the complex sponge microbiota: Core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME Journal*, *6*(3), 564–576. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.116>
- Schneemann, I., Wiese, J., Kunz, A. L., & Imhoff, J. F. (2011). Genetic approach for the fast discovery of phenazine producing bacteria. *Marine Drugs*, *9*(5), 772–789. <https://doi.org/10.3390/md9050772>
- Sertan-De Guzman, A. A., Predicala, R. Z., Bernardo, E. B., Neilan, B. A., Elardo, S. P., Mangalindan, G. C., ... Concepcion, G. P. (2007). *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS Microbiology Letters*, *277*(2), 188–196. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00950.x>
- Siddique, M. A., Hasan, M., & Hossain, M. A. (2017). 16S rRNA gene sequence based identification of *Vibrio* spp . in shrimp and tilapia hatcheries of, (January). Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/313663159\\_16S\\_rRNA\\_gene\\_sequence\\_based\\_identification\\_of\\_Vibrio\\_spp\\_in\\_shrimp\\_and\\_tilapia\\_hatcheries\\_of\\_Bangladesh](https://www.researchgate.net/publication/313663159_16S_rRNA_gene_sequence_based_identification_of_Vibrio_spp_in_shrimp_and_tilapia_hatcheries_of_Bangladesh)
- Soto-Rodríguez, S. A., Simoes, N., Roque, A., & Gómez Gil, B. (2006). Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, *258*(1–4), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.035>

- Sotomayor, M. A., Maldonado, M., Bayot, B., Reyes, J. K., Restrepo, L., & Domínguez-Borbor, C. (2019). Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. *Plos One*, *14*(1), e0210478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210478>
- Srisukchayakul, P., Suwanachart, C., Sangnoi, Y., Kanjana-Opas, A., Hosoya, S., Yokota, A., & Arunpairojana, V. (2007). *Rapidithrix thailandica* gen. nov., sp nov., a marine gliding bacterium isolated from samples collected from the Andaman sea, along the southern coastline of Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(10), 2275–2279. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65087-0>
- Sweet, M., Bulling, M., & Cerrano, C. (2015). A novel sponge disease caused by a consortium of micro-organisms. *Coral Reefs*, *34*(3), 871–883. <https://doi.org/10.1007/s00338-015-1284-0>
- Tang, Y., Tao, P., Tan, J., Mu, H., Peng, L., Yang, D., ... Chen, L. (2014). Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(8), 13663–13680. <https://doi.org/10.3390/ijms150813663>
- Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., & LokaBharathi, P. A. (2010). Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review. *Marine Drugs*, *8*(4), 1417–1468. <https://doi.org/10.3390/md8041417>
- Thompson, F., Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2016). Biodiversity of *Vibrios* Biodiversity of *Vibrios*, *68*(OCTOBER 2004), 403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403>
- Tseng, D. Y., Ho, P. L., Huang, S. Y., Cheng, S. C., Shiu, Y. L., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology*, *26*(2), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.003>
- Uria, A., & Piel, J. (2009). Cultivation-independent approaches to investigate the chemistry of marine symbiotic bacteria. *Phytochemistry Reviews*, *8*(2), 401–414. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9127-7>
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Ángeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M. A. O., & Faggio, C. (2019). Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, *0*(0), 1–27. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1643288>
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., ... Swings, J. (1999). *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(6), 2592–2597.

- Vargas-Albores, F., Porchas-Cornejo, M. A., Martínez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Gollas-Galván, T., & Martínez-Córdova, L. R. (2017). Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. *Helgoland Marine Research*, *71*(1). <https://doi.org/10.1186/s10152-017-0485-z>
- Verhoeven, J. T. P., Kavanagh, A. N., & Dufour, S. C. (2017). Microbiome analysis shows enrichment for specific bacteria in separate anatomical regions of the deep-sea carnivorous sponge *Chondrocladia grandis*. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw214>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). <Verschuere et al 00.pdf>. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4), 655–671.
- Versluis, D., Nijssse, B., Naim, M. A., Koehorst, J. J., Wiese, J., Imhoff, J. F., ... Sipkema, D. (2018). Comparative genomics highlights symbiotic capacities and high metabolic flexibility of the marine genus *Pseudovibrio*. *Genome Biology and Evolution*, *10*(1), 125–142. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx271>
- Vizcaino, M. I., Johnson, W. R., Kimes, N. E., Williams, K., Torralba, M., Nelson, K. E., ... Morris, P. J. (2010). Antimicrobial resistance of the coral pathogen vibrio coralliilyticus and Caribbean sister phylotypes isolated from a diseased octocoral. *Microbial Ecology*, *59*(4), 646–657. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9644-3>
- Wang, G. (2006). Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *33*(7), 545–551. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0123-2>
- Wang, K. L., Xu, Y., Lu, L., Li, Y., Han, Z., Zhang, J., ... Qian, P. Y. (2015). Low-Toxicity Diindol-3-ylmethanes as Potent Antifouling Compounds. *Marine Biotechnology*, *17*(5), 624–632. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9656-6>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Webster, N. S., & Hill, R. T. (2001). The culturable microbial community of the great barrier reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an  $\alpha$ -Proteobacterium. *Marine Biology*, *138*(4), 843–851. <https://doi.org/10.1007/s002270000503>
- Webster, Nicole S., & Thomas, T. (2016). The sponge hologenome. *MBio*, *7*(2), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00135-16>
- Webster, Nicole S., & Thomas, T. (2016). DEFINING THE SPONGE HOLOGENOME, *7*(2), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00135-16>.Invited
- Williams, A. D., Brown, B. E., Putschim, L., & Sweet, M. J. (2015). Age-related shifts in bacterial diversity in a reef coral. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–11.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144902>

- Wilson, M. Z., Wang, R., Gitai, Z., & Seyedsayamdost, M. R. (2016). Mode of action and resistance studies unveil new roles for tropodithietic acid as an anticancer agent and the  $\gamma$ -glutamyl cycle as a proton sink. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(6), 1630–1635. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518034113>
- Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(8), 552–563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>
- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., ... Yi, M. (2018). Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, *76*, 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.020>
- Xie, F., Zhu, T., Zhang, F., Zhou, K., Zhao, Y., & Li, Z. (2013). Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water. *SpringerPlus*, *2*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-119>
- Xu, C., Sun, X., Jin, M., & Zhang, X. (2017). A novel benzoquinone compound isolated from deep-sea hydrothermal vent triggers apoptosis of tumor cells. *Marine Drugs*, *15*(7). <https://doi.org/10.3390/md15070200>
- Yang, Q., & Defoirdt, T. (2015). Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environmental Microbiology*, *17*(4), 960–968. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12420>
- Zhang, D., Luo, J., Lee, Z. M. P., Gersberg, R. M., Liu, Y., Tan, S. K., & Ng, W. J. (2016). Characterization of microbial communities in wetland mesocosms receiving caffeine-enriched wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(14), 14526–14539. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6586-4>
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., ... Li, E. (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, *434*(October 2018), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.008>
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., ... Yu, M. (2017). Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01362>
- Zorriehzahra, M. J. (2015). Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, *3*(2s), 64–72. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.72>

Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(4), 228–241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>

## ANEXOS

Anexo 1: Identificación Bioquímica de cepas Pseudovibrio denitrificans

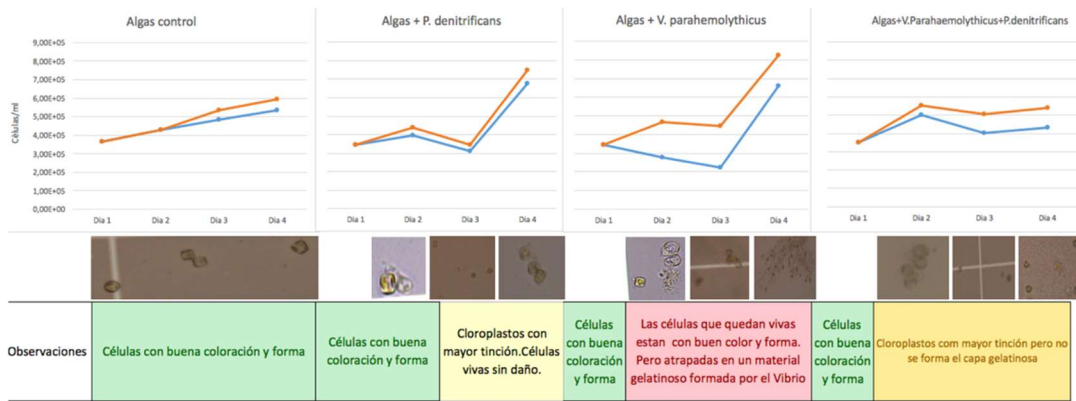
Código	Tinción Gram	Metabolismo		Determinar la capacidad de desdoblar indol de la molécula triptófano (AA)	Formación del diacetyl	Uso de citrato como fuente de carbono	Uso Amino Acido			Uso de carbohidratos		
		Fermentativo	Oxidativo				Arginina	Ornitina	Lisina	Sucrosa	Glucoronato	Manosa
		OF (Fermentativo)	OF (oxidativo)	Indol	VP	Consumo de Citrato						
A21	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A22	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A24	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A31	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A33	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A34	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A42	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A53	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

A54	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+
A55	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A61	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A63	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A64	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A69	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A71	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A72	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A73	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A74	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
A75	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
1 ME	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
2,1 ME	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3,2 ME	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
3,3 ME	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
5,3 ME	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
6 ME	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
6,4 ME	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
7,1 ME	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
7,2 ME	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10,1 ME	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
10,3 ME	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
11,3 ME	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
11,5 ME	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
10C2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
7C2A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+



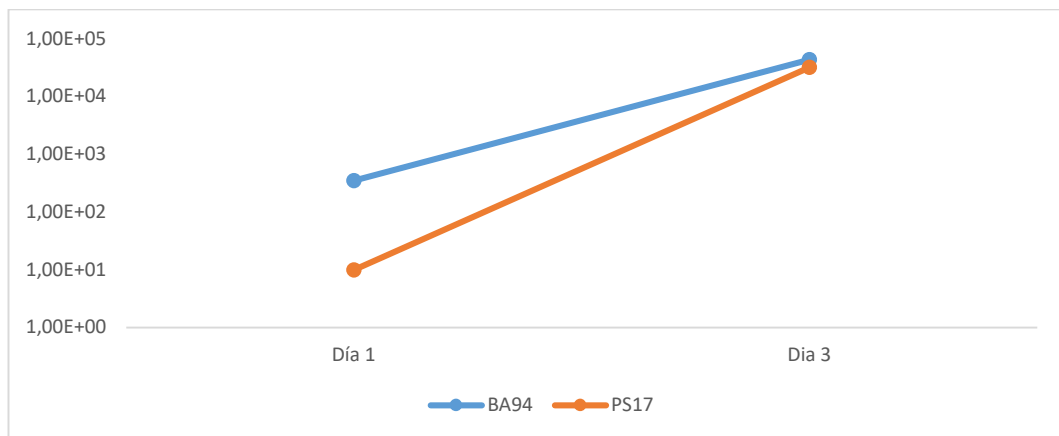
ANEXO 2:

**Ensayo de Colonización de Pseudovibrio en algas.**



*P. denitrificans* (Ps) creció en el cultivo de microalgas sin provocar daño celular. Los daños celulares observados fueron del 10% tanto en el control como en los tratamientos (Algas sin Prob), probiótico (Algas+Pseudovibrio) y probiótico/patógeno (Algas+Pseudovibrio+*V. parahaemolyticus*). Cuando el cultivo de microalgas se expuso a *V. parahaemolyticus*, se observó daño celular en el 50% de las microalgas. Curiosamente las microalgales vivas quedaron atrapadas dentro de un material gelatinoso producido por el *V. parahaemolyticus*.

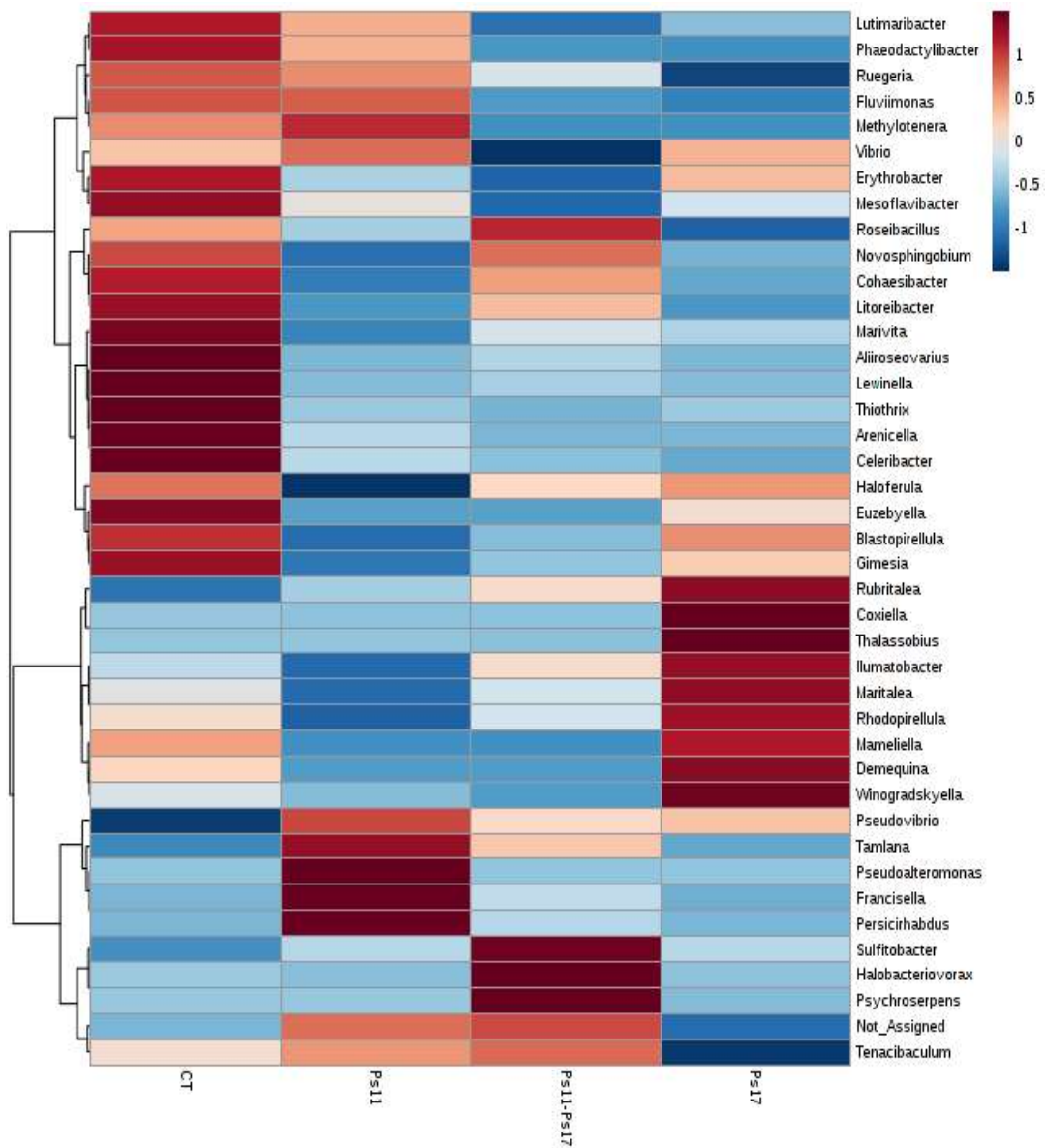
El crecimiento de *P. denitrificans* y *V. parahaemolyticus* en las microalgas fue de  $1 \times 10^5$  UFC/ml. Cuando se combinaron las dos bacterias el conteo total de bacterias fue de  $1 \times 10^4$  UFC/ml



Para determinar el tipo de bacterias en el ensayo C (en el que se combinó *Pseudovibrio* y *V. parahaemolyticus*), se realizaron conteos diferenciados por cepa. Inicialmente *P. denitrificans* creció en menor proporción que el patógeno. Sin embargo, después de 3

días se observó el crecimiento a concentraciones iguales tanto para el patógeno como para el probiótico.

ANEXO 3: Heat map de muestras de agua de los acuarios con tratamiento de *Pseudovibrio*



El heat map muestra la presencia de Pseudovibrios en el agua de los tres tratamientos. No se detectaron vibrios en los camarones del tratamiento mezcla (Ps11+Ps17).