

Metagenómica de la microbiota de juveniles del *Litopenaeus vannamei* inoculados con bacterias probióticas y patógenas

Jefferson Javier Intriago Angulo[#], Juan Gerardo Quimi Mujica, Jenny Maribel Risco Cunayque, Jineika Jordana Lopez Parra, Jorge Enrique Yalta Mera, Maria Elena Bermudez Basan, Enrique David Lindo Seminario, Gorky Vladimir Lajones Ruano, Veronica Ines Sernaque de la Cruz, Luz Fernanda Dominguez Mendoza, Zoila Emperatriz Martinez Virnes, Emmerick Motte Darricau, Virna Alexia Cedeño Escobar y Eric Louis Mialhe Matonnier

Universidad Nacional de Tumbes e IncaBiotec S.A.C., Tumbes, Perú.

[#]Concepto Azul S.A., Ecuador.

*email: ijeffersonjavier@gmail.com

Resumen

El cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es un recurso acuícola de gran importancia económica a nivel mundial. No obstante, es severamente afectado por varios tipos de enfermedades infecciosas, principalmente virales y bacterianas. Para asegurar la sostenibilidad de la industria del camarón, se debe mejorar la productividad en particular mediante el uso de mix de bacterias probióticas eficientes para la prevención de las enfermedades bacterianas. La metagenómica dirigida al ADN ribosómico bacteriano representa una potente herramienta para analizar la microbiota del camarón y evaluar mix de bacterias probióticas. En el presente estudio, dos mix (CA1 y CA2) de bacterias probióticas de *Bacillus* spp. fueron evaluados frente a bacterias patógenas (*Vibrio* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela* y *Staphylococcus* spp.), en infecciones experimentales con la determinación subsecuente por metagenómica de los cambios de composición microbiana de los intestinos de juveniles en paralelo a los respectivos incrementos de sobrevivencia. Los dos mix de bacterias probióticas CA1 y CA2 condujeron a cambios importantes en la composición de la microbiota intestinal, en particular a nivel de la riqueza de la microbiota. Además de incrementos generalmente significativos de las sobrevivencias en todas las condiciones. Este estudio de metagenómica de la microbiota de *L. vannamei* abre la vía a una mejor comprensión de las relaciones camarón-bacterias para la selección de mezcla de bacterias probióticas y el uso de prebióticos, así como para futuras investigaciones metagenómicas centradas en la microbiota de otros órganos (hepatopáncreas, hemolinfa, ovarios) o componentes de cultivo (biofilm, periphyton, bioflocs, suelos, agua).

Palabras clave: camarón, *Litopenaeus vannamei*, metagenómica, microbiota, bacterias patogénicas, bacterias probióticas.

Summary

Metagenomics of the microbiota of juveniles of *Litopenaeus vannamei* inoculated with probiotic and pathogenic bacteria

The cultivation of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is an aquaculture resource of great economic importance worldwide. However, it is severely affected by several types of infectious diseases, mainly viral and bacterial. To ensure the sustainability of the shrimp industry, productivity should be improved in particular by using a mix of efficient probiotic bacteria for the prevention of bacterial diseases. Metagenomics directed to bacterial ribosomal DNA represents a powerful tool to analyze the shrimp's microbiota and evaluate the mix of probiotic bacteria. In the present study, two mix (CA1 and CA2) of *Bacillus* spp. Probiotic bacteria. were evaluated against pathogenic bacteria (*Vibrio* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela* and *Staphylococcus* spp.), in experimental infections with the subsequent determination by metagenomic changes of microbial composition of the intestines of juveniles in parallel to the respective increases in survival. The two mix of probiotic bacteria CA1 and CA2 led to important changes in the composition of the intestinal microbiota, particularly at the level of the richness of the microbiota. In addition to generally significant increases in survival in all conditions. This metagenomic study of the *L. vannamei* microbiota opens the way to a better understanding of shrimp-bacteria relationships for the selection of probiotic bacteria mix and the use of prebiotics, as well as for future metagenomic investigations focused on the microbiota of other organs (hepatopancreas, hemolymph, ovaries) or culture components (biofilm, periphyton, bioflocs, soils, water).

Keywords: shrimp, *Litopenaeus vannamei*, metagenomics, microbiota, pathogenic bacteria, probiotic bacteria.

Introducción

El cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, es una actividad de gran importancia económica (Flegel, 2012; Lightner *et al.*, 2012; Tandel *et al.*, 2017). Las pérdidas masivas reportadas durante los últimos años, están generalmente relacionadas a infecciones bacterianas en particular, el síndrome de mortalidad temprana (EMS) y más recientemente relacionado a la enfermedad de necrosis aguda hepatopáncreática (EMS/AHPND) por sus siglas en inglés (Boonyawiwat *et al.*, 2017).

Basándose en datos moleculares y estudios epidemiológicos realizados en varios países afectados por el síndrome EMS/AHPND, se caracterizó a *Vibrio parahaemolyticus* como causante de la mortal pandemia (Gomez *et al.*, 2014; Nunan *et al.*, 2014). Los plásmidos involucrados en la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* fueron posteriormente detectados en otras especies de vibrios, sugiriendo que la transferencia interespecífica de plásmidos podría ocurrir en cultivos de camarones (Xiao *et al.*, 2017).

A partir de estas informaciones, el diagnóstico de la enfermedad EMS/AHPND se ha enfocado en la detección molecular de los genes de toxinas pirAB, en particular por la técnica LAMP (Loop mediated isothermal AMPlification) de fácil realización en campo (Liu *et al.*, 2017). Sin embargo, otras cepas de vibrios han sido aisladas en relación a mortalidades masivas de *L. vannamei* en otras regiones del mundo, identificadas como *V. campbelli* (Dong *et al.*, 2017); *V. harveyi* (Moreno *et al.*, 2017); *V. nigripulchritrudo* (Goudenège *et al.*, 2013); *V. europaeus* sp. (Dubert *et al.*, 2016); *V. sinaloensis* (del Carmen Flores-Miranda *et al.*, 2012).

La predominancia de vibrios aislados de camarones, considerados como patógenos basándose en datos epidemiológicos y pruebas de infecciones experimentales, ha sido recientemente cuestionada en la medida en que podría resultar del carácter altamente cultivable en los medios bacteriológicos clásicamente utilizados en acuicultura, conduciendo a detectar casi exclusivamente vibrios en muestras de la microbiota de camarón, mientras que otras especies de bacterias podrían estar presentes pero difícilmente o incluso no cultivables (Quimi *et al.*, 2017).

Esta demostración de la diferencia fenomenal de composición microbiana de camarones según sea caracterizada directamente o luego de una fase de cultivo ha sido posible gracias a la tecnología conocida como metagenómica dirigida al ADN ribosómico bacteriano que está basada en la secuenciación masiva de los amplicones correspondientes a todas las bacterias presentes en una muestra independientemente de su carácter cultivable o no.

Varios estudios relacionados a la microbiota del camarón han sido publicados. Sha *et al.* (2016) estudiaron por metagenómica dirigida los efectos de la suplementación dietética con *Lactobacillus pentosus* HC-2 (HC-2), *Enterococcus faecium* NRW-2, o el sobrenadante libre de bacterias de un cultivo de HC-2 sobre la composición bacteriana de *L. vannamei*. Además de otros estudios (Suo *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2016, 2017). Por tanto, la metagenómica constituye una potente herramienta para analizar la composición microbiana del camarón.

En el presente estudio se analizó por metagenómica los efectos de la inoculación de bacterias probióticas y patógenas, sobre la composición de la microbiota del intestino de juveniles del camarón blanco *L. vannamei* en paralelo al análisis de sobrevivencia.

Material y Métodos

*Acondicionamiento y siembra de postlarvas de *L. vannamei**

Se utilizaron postlarvas en estadio PL 12, procedentes de la empresa Marinasol Punta Mero – Perú, las cuales fueron trasladadas al Centro Colectivo Experimental de Biotecnología Acuática de Puerto Pizarro (CEBAP), donde se realizó el conteo y pesaje respectivo (0,03 g por postlarva-PL), bajo condiciones controladas (28 °C de temperatura, pH 8 y 6 ppm de oxígeno en promedio diario), posteriormente se llevó a cabo la siembra de las postlarvas en tanques de polietileno (Rotoplass) de 1 m³, a una densidad poblacional de 40 PL/L.

Obtención y preparación de bacterias probióticas

Las bacterias probióticas del mix CA1 (consorcio de 6 cepas de *Bacillus* spp.) y del mix CA2 (consorcio de las 6 cepas de *Bacillus* spp. del mix CA1 con la adición de dos especies de *Bacillus* sp.), fueron aisladas a partir de muestras de intestino de camarón blanco nativo silvestre y macroalgas de acuerdo al protocolo del laboratorio de biotecnología Concepto Azul S.A. e IncaBiotec S.A.C., respectivamente; las cuales fueron cultivadas en caldo Tripticasa Soya (TCS) a 37 °C durante 24 h, con agitación. La concentración de bacterias en suspensión del género *Bacillus* fue obtenido usando una curva estándar de relación a una densidad óptica de 600 nm; asimismo, se realizaron estudios previos de pruebas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) con *primers* específicos para péptidos antimicrobianos y lactonasa (Mora *et al.*, 2011).

Obtención y preparación de bacterias patógenas

Las bacterias patógenas utilizadas fueron 8 y se aislaron a partir de muestras de camarón con sintomatología de estar enfermos; estas se caracterizaron en el laboratorio de biotecnología de la empresa IncaBiotec S.A.C., identificándose a *V. nigripulchritudo*, *V. sinaloensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. warneri*, *Photobacterium damsela* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales fueron cultivadas en caldo Tripticasa Soya (TCS) a 37 °C durante 24 h, con agitación. La concentración de bacterias patógenas en suspensión fue obtenida usando una curva estándar a una densidad óptica de 600 nm.

Inoculación de bacterias probióticas y patógenas

Tres grupos experimentales fueron organizados (tratamiento control, tratamiento CA1 y tratamiento CA2) en tanques de 1 m³. La alimentación con balanceado se basó en porcentajes de biomasa, según la tabla de alimentación considerada por Nicovita S.A.C., se utilizó solo alimento balanceado para el tratamiento control CSP, para los tratamientos CA1 o CA2 se adicionó por 30 días los mix de bacterias probióticas a razón de 0,01 mL por gramo de alimento dando una concentración final de 10⁴ UFC/mL, esto último con el propósito de colonizar el intestino del camarón con las bacterias probióticas.

Posteriormente las postlarvas con un peso promedio de 0,61 g fueron distribuidas a razón de 30 individuos por unidad experimental (1,66 PL/L en baldes de 18 L) para iniciar la etapa de infección con las diferentes bacterias patógenas, (*V. harveyi*, *V. sinaloensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. nigripulchritudo*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *P. damsela* y *P. aeruginosa*), por triplicado y en dos periodos de infección (al día 30 y al día 45), a través de la inoculación de los cultivos patógenos en el cuerpo de agua, a una concentración final de 10⁴ UFC/mL por unidad experimental.

Análisis metagenómico

Obtención de muestras de *L. vannamei*: Transcurridos los 30 días de inoculación con las bacterias patógenas y con las postlarvas en estadio juvenil de 3 a 4 g, es decir con el tamaño suficiente para poder diseccionar los intestinos, se obtuvieron 8 muestras de los tratamientos de CA1 y CA2 inoculadas con las 4 bacterias patógenas que presentaron mayores porcentajes de mortalidad. Así como las 4 muestras de los tratamientos controles CA1, CA2, CSP, sin inoculación de bacterias patógenas (control negativo) y CSP inoculado con la bacteria patógena *V. nigripulchritudo* (control positivo).

Extracción y secuenciación de ADN bacteriano: Se realizó la extracción de ADN bacteriano de las muestras obtenidas del intestino de camarón, con el kit de Aislamiento de ADN Power Soil (MO BIO Laboratory Inc, France). La calidad del ADN fue medida por espectrofotometría a una densidad óptica 260/280 nm para ser enviadas a MR DNA (Shallowater, TX, USA), donde el ADN bacteriano fue secuenciado con la técnica PGM de Ion Torrent y así obtener las secuencias totales de la región V4 del ADN ribosomal 16S y dichas secuencias obtenidas luego fueron analizadas utilizando software bioinformáticos.

Análisis bioinformático: Las secuencias totales de la región V4 del ADN ribosomal 16S, se procesaron y analizaron utilizando el software de QIIME-1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2011), y MOTHUR 1.39.0 (Schloss *et al.*, 2009), de manera que los puntajes de calidad "cero" se interpretaron como una base ambigua y se filtraron por el marcado de calidad (Q20) y las secuencias inferiores de 80 bp y mayores de 350 bp se eliminaron usando MOTHUR. Mediante QIIME, se empleó USEARCH61 para la eliminación de secuencias quiméricas. Asimismo, las secuencias no quiméricas fueron agrupados a una asignación de referencia abierta en OTUs (*Operational Taxonomic Unit*). Para las secuencias asignadas a OTUs, se aplicó *uclust* en la búsqueda de secuencias no oportunas a la base de datos SILVA (Edgar, 2010; Edgar *et al.*, 2011) del mismo modo se filtraron aquellos OTUs que estaban a menos de 0,005% del total (Bokulich *et al.*, 2013). Entonces las secuencias fueron asignadas a la base de datos SILVA al 97% de identidad en OTUs de acuerdo a su mejor puntuación y la identificación taxonómica fue determinada empleando la base de datos RDP (*Ribosomal Data Project*).

Análisis estadístico: La representación de los datos de supervivencia tanto en las infecciones experimentales como en tanques de producción de postlarvas de camarón, se realizó con el software InfoStat y R STUDIO, con análisis de varianza ANOVA de una sola vía para analizar las diferencias entre los diferentes grupos de tratamientos (tratamientos (P <0,05); asimismo se comprobó las diferencias entre los tratamientos con el test de Tukey y LSD.

Construcción de las curvas de rarefacción: El análisis de rarefacción de las secuencias de las 12 muestras fue llevado a cabo en QIIME (<http://qiime.org/>), asimismo los índices de Chao1 y Shannon fueron calculados para estimar la riqueza de género y α diversidad de cada muestra de los tratamientos.

Resultados

PCR de péptidos antimicrobianos y genes de lactonasas

Se realizaron pruebas específicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para péptidos antimicrobianos y lactonasa, donde el consorcio CA1 resultó positivo para el péptido antimicrobiano de la bacilisina y el gen de la lactonasa. Mientras que el consorcio CA2 dio positivo en la prueba de péptidos antimicrobianos, surfactina, subtilina, bacilisina y el gen de la lactonasa (Tabla 1).

Tabla 1. Prueba de PCR. PCR para el gen de Acil hemoresyne lactonasa (iia) y para genes antimicrobianos: bacilisin (bac), subtilin (sub) y surfactin (suf).

Muestra	Iaa	Bac	Sub	Sur
CA	+		+	
<i>Bacillus beijingensis</i>				
<i>Bacillus firmus</i>			+	
<i>Bacillus foraminis</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				
<i>Bacillus megaterium</i>				+
<i>Bacillus firmus</i>				
<i>Bacillus seohaeanensis</i>				
<i>Bacillus aerius</i>	+		+	
<i>Bacillus stratosphericus</i>			+	
<i>Bacillus toyonensis</i>				
<i>Bacillus anthracis</i>				
<i>Bacillus endophyticus</i>				
<i>Bacillus aquimaris</i>				
<i>Bacillus subterraneus</i>				
<i>Bacillus</i> sp.		+		+

Porcentaje de supervivencia de postlarvas de L. vannamei

Las tasas de supervivencia se establecieron en el día 60, mostrando en todos los casos valores aumentados entre animales control (CSP) y aquellos tratados con CA1 y CA2, estos aumentos fueron significativos en varios casos entre control y tratamientos CA1 y CA2 (Figura 1).

Análisis metagenómico de las muestras de L. vannamei

En el análisis metagenómico de las muestras de *L. vannamei*, según se puede observar en la Tabla 2, se obtuvo como resultado que el número de amplicones secuenciados estuvo entre 21 701 (CSPVn) y 118 908 (CA2Pd), el número de OTUs entre 52 (CSP) y 336 (CA2Pd), el número de familias bacterianas entre 16 (CSP) y 82 (CA2Pd) y el número de géneros bacterianos identificados por metagenómica entre 24 (CSP) y 134 (CA2Pd).

Además, se realizó el análisis de la curva de rarefacción resultando, en una curva asintótica casi horizontal en algunos tratamientos, donde indica que el número de OTUs no aumenta en relación con el número de amplicones secuenciados, es decir que todos los OTUs presentes en la muestra han sido identificados. Por lo tanto, el análisis metagenómico de la muestra control CSP corresponde a tal situación, confirmando su baja diversidad microbiana prácticamente totalmente caracterizada (Figura 2).

Consecuentemente la suplementación del alimento con mix de bacterias probióticas conduce a un enriquecimiento de la diversidad microbiana intestinal, siendo el CA2 más eficiente que el CA1 (Figura 2). Finalmente, parece que las infecciones experimentales con las diferentes bacterias patógenas conducen a procesos de enriquecimientos de la composición microbiana con los números de OTUs incrementando en función del número de amplicones secuenciados, en particular CA1Pa y CA2Pd (Figura 1).

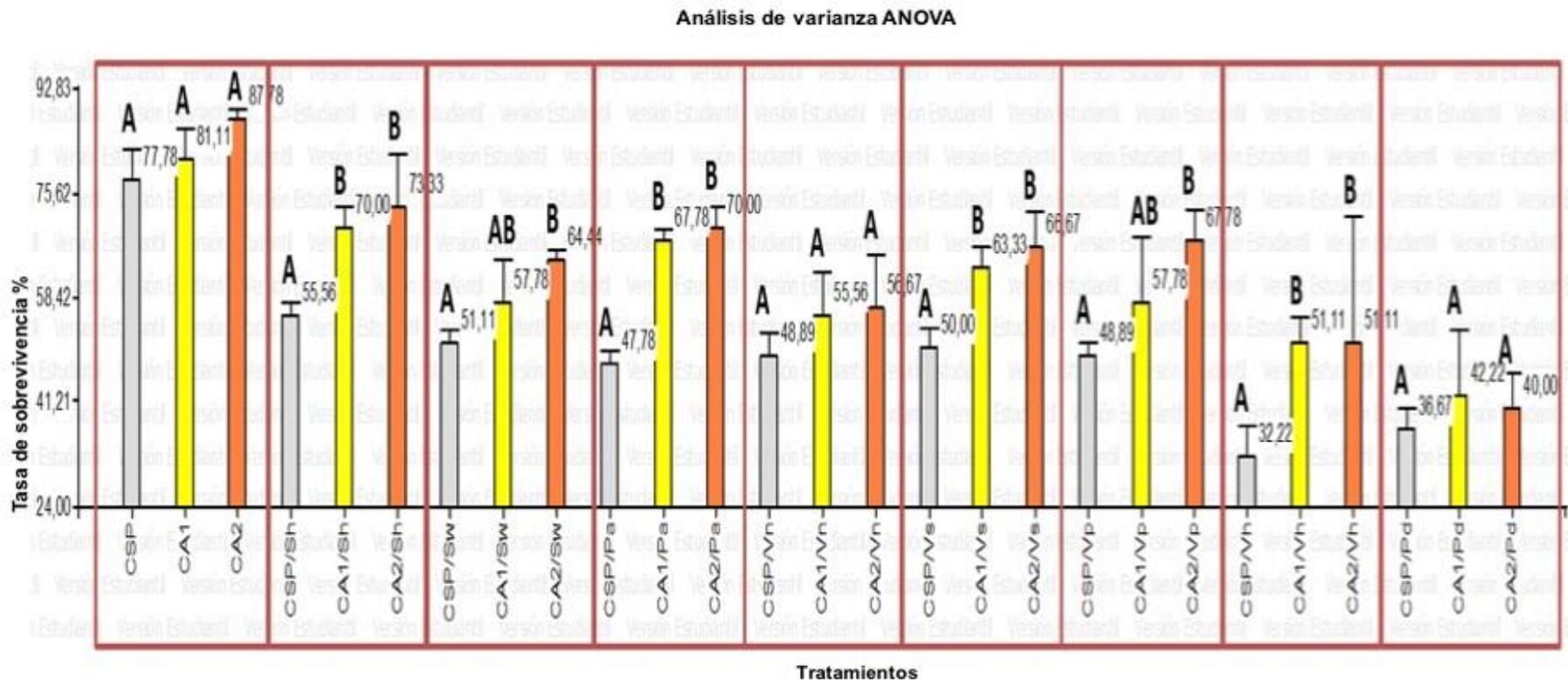


Figura 1. Porcentaje de supervivencia en la prueba experimental de camarón *Litopenaeus vannamei*. Camarones alimentados durante 30 días con comercial balanceado (CSP: color gris), suplementado con consorcio de bacterias probióticas CA1 (color amarillo) o CA2 (color naranja). Camarones infectados los días 30 y 45 con cepas patógenas *S. hameolyticus* (Sh), *S. warneri* (Sw), *P. aureginosa* (Pa), *V. nigripulchritudo* (Vn), *V. sinaloensis* (Vs), *Vibrio parahaemolyticus* (Vs), *Vibrio harveyi* (Vh) y *P. damsela* (Pd). Prueba de comparación de medias usando el método LSD (valor $p > 0,05$). Recuperado de software InfoStat, 2017.

Tabla 2. Análisis de secuencia. Camarones alimentados durante 30 días con alimento balanceado (CSP) o con alimento balanceado inoculado con mix de cepas probióticas CA1 o CA2 y luego no desafiado (CSP, CA1, CA2) o desafiado (días 30 y 45) con varias bacterias patógenas cepas: *V. nigrripulcritudo* (Vn), *P. aeruginosa* (Pa), *V. harveyi* (Vh) o *P. damselae* (Pd).

	TRATAMIENTOS												
	CSP	CA1	CA2	CSPVn	CA1Vn	CA2Vn	CA1Vh	CA2Vh	CA1Pa	CA2Pa	CA1Pd	CA2Pd	CSP
<i>TAMAÑO DE LA MUESTRA</i>													
Número total de secuencias	72841	71373	41635	21701	46961	47162	45119	38100	53201	45658	55310	118908	72841
Numero de OTUs	82	207	207	198	313	288	305	237	327	248	287	336	82
Filo	5	5	10	8	9	8	9	7	12	8	9	11	5
Clase	9	11	17	14	23	20	22	17	22	20	18	25	9
Familia	19	31	57	63	84	76	83	73	94	68	68	104	19
Genero	26	82	123	114	169	157	145	146	174	130	201	218	26
<i>INDICES DE DIVERSIDAD Y RIQUEZA ESTIMADA</i>													
Chao1	49,902	157,452	189,039	185,761	293,558	271,611	246,660	241,870	315,216	215,642	251,289	340,978	49,902
Shannon	1,682	3,568	4,988	4,836	4,973	4,662	3,604	3,894	5,568	2,702	4,338	5,249	1,682

Así mismo, la riqueza microbiana fue estimada utilizando los índices de Shannon, así como la diversidad microbiana se estimó usando los índices de Shannon, siendo la microbiota de CSP, la que cuenta con la más baja riqueza y diversidad (Chao1: 49,90; Shannon: 1,68) y la microbiota de CA2Pd la que presenta los más altos valores (Chao1: 340,97; Shannon: 5,24; Tabla 2).

Complementariamente debemos señalar que el tratamiento con el menor número de especies únicas fue el tratamiento CA1Pd con 3, mientras que el tratamiento CA1Vh tuvo el mayor número de especies únicas con un total de 37 especies, mientras que los otros tratamientos CSP, CSPVn, CA1, CA2, CA1Vn, CA2Vn, CA2Vh, CA1Pa, CA2Pa y CA2Pd con un número de especies únicas de 11, 7, 18, 23, 9, 23, 10, 13, 6 y 32, respectivamente.

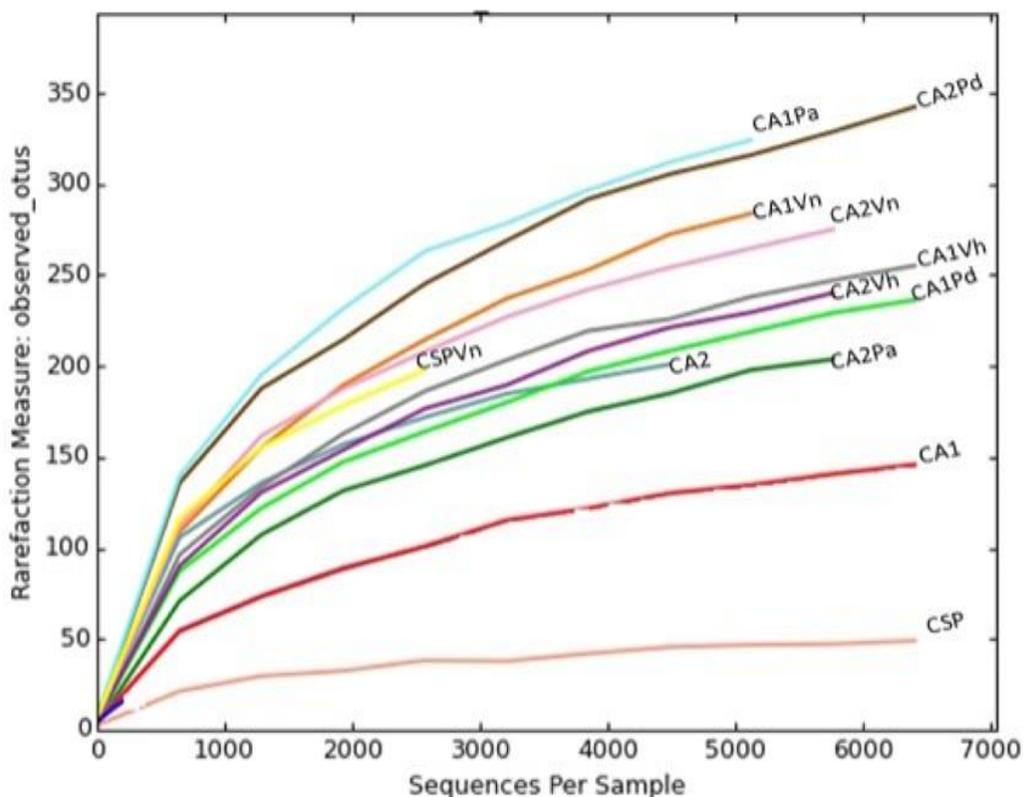


Figura 2. Curvas de tizón del intestino del camarón. La curva de rarefacción se calculó para los 12 conjuntos de datos metagenómicos del gen del ARN 16S bacteriano del intestino de camarón al 97% de similitud. Recuperado de software QIIME, 2017.

Caracterización de la composición microbiana

En la caracterización de la composición microbiana de los intestinos de juveniles de *L. vannamei*, el filo Proteobacteria estuvo presente en todos los tratamientos, siendo más predominante en CSP, CA1, CA2, CSPVn, CA1Vn, CA2Vn, CA2Pa, CA1Vh, CA2Vh, CA1Pd habiendo alcanzado niveles de 88,2%, 84,1%, 75,3%, 80,9%, 90,6%, 86,8%, 93,3%, 78,0% y 85,7%, respectivamente, del total de bacterias, pero fue menos frecuente en CA1Pa (67,4%) y CA2Pd (69,8%). El filo Bacteroidetes fue el segundo filo más abundante, también estuvo presente en todos los tratamientos, pero con mayor predominancia en CA2Vh (17,9%) y CA2Pa 18,8% (Figura 3).

Tabla 3. Top 20 de los géneros y especies de interés patógenos y su abundancia relativa. Camarones alimentados con balanceado e inoculado mix de bacterias probióticas CA1 o CA2 y luego no desafiado (CSP, CA1, CA2) o desafiado (días 30 y 45) con varias cepas bacterianas patógenas: *V. nigripulchritudo* (Vn), *P. aeruginosa* (Pa), *V. harveyi* (Vh) o *P. damsela* (Pd).

GÉNERO	TRATAMIENTOS											
	CSP	CA1	CA2	CSPVn	CA1Vn	CA2Vn	CA1Pa	CA2Pa	CA1Vh	CA2Vh	CA1Pd	CA2Pd
Proteobacteria; <i>Vibrio</i>	94,5%	56,3%	7,1%	25,7%	16,4%	13,5%	17,8%	67,1%	56,5%	2,7%	15,0%	6,3%
Proteobacteria; <i>Roseobacter</i>	0,0%	2,9%	13,4%	14,6%	19,3%	32,6%	12,6%	6,7%	5,6%	14,1%	15,0%	21,5%
Proteobacteria; <i>Tropicimonas</i>	0,0%	2,1%	20,1%	3,6%	7,4%	5,7%	6,5%	4,0%	1,4%	39,0%	24,3%	7,6%
Verrucomicrobia; <i>Roseibacillus</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,3%	4,6%	1,6%	0,0%	0,0%	0,5%	2,2%
Proteobacteria; <i>Paracoccus</i>	0,0%	3,4%	3,8%	2,4%	1,5%	1,9%	2,1%	1,5%	0,4%	0,6%	0,6%	1,9%
Proteobacteria; <i>Psychromonas</i>	0,0%	0,1%	1,7%	1,5%	2,9%	0,6%	0,0%	1,4%	0,9%	2,2%	8,0%	3,7%
Proteobacteria; <i>Photobacterium</i>	0,8%	0,2%	0,0%	0,0%	0,6%	0,9%	0,0%	1,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,6%
Proteobacteria; <i>Loktanella</i>	0,0%	0,3%	2,9%	3,8%	3,7%	7,0%	2,5%	1,3%	1,0%	4,1%	3,6%	5,4%
Proteobacteria; <i>Ascidiaeihabitans</i>	0,0%	0,1%	2,4%	2,3%	2,7%	4,3%	1,7%	0,9%	0,4%	2,3%	2,1%	2,9%
Proteobacteria; <i>Ruegeria</i>	0,0%	2,2%	3,6%	2,6%	7,9%	3,1%	4,7%	0,9%	0,3%	0,4%	1,4%	3,5%
Proteobacteria; <i>Pseudoalteromonas</i>	0,0%	1,1%	0,3%	1,6%	4,6%	0,8%	1,0%	0,6%	0,7%	0,6%	3,4%	1,5%
Bacteroidetes; <i>Costertonia</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	2,1%	0,1%	2,5%	0,5%	0,0%	1,3%	1,8%	2,1%
Proteobacteria; <i>Celeribacter</i>	0,0%	0,2%	2,5%	0,8%	0,7%	0,5%	0,7%	0,5%	0,1%	2,1%	1,3%	0,7%
Firmicutes; <i>Bacillus</i>	0,0%	1,0%	3,6%	2,2%	0,8%	0,5%	3,8%	0,4%	0,8%	0,5%	0,7%	0,6%
Proteobacteria; <i>Phaeobacter</i>	0,0%	0,2%	1,5%	1,0%	0,5%	2,4%	0,1%	0,3%	0,0%	0,2%	0,3%	0,2%
Bacteroidetes; <i>Maribacter</i>	0,0%	0,1%	0,1%	0,2%	6,1%	1,5%	5,2%	0,2%	0,2%	13,1%	5,6%	8,7%
Proteobacteria; uncultured bacterium	0,0%	8,8%	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Tenericutes; candidatus <i>Bacilloplasma</i>	0,0%	0,0%	0,0%	10,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteroidetes; <i>Saccharicrinis</i>	0,0%	11,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; <i>Pseudomonas</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,4%	0,2%	0,1%	0,8%	0,0%	0,6%	0,1%	0,0%	0,1%

Los 20 géneros identificados en las microbiotas intestinales de los juveniles de camarón correspondientes a los diferentes tratamientos y con mayor abundancia relativa son presentados en la Tabla 3. En donde se aprecia que es el género *Vibrio* el más predominante en los tratamientos CSP (94,5%), CA1 (56,3%), CA2Pa (67,1%), CA1Vh (56,5%); mas no en los otros tratamientos. Además, el género *Roseobacter* fue más frecuentes en los tratamientos CA2Vn (32,6%), CA2Pd (21,5%), CA1Vn (19,3%) y ausente en el tratamiento control CSP. También se aprecia que el género *Tropicimonas*, se encontró con mayor abundancia en los tratamientos CA2Vh (39,0%), CA1Pd (24,3%), CA2 (20,1%). El género *Paracoccus* fue más abundante en los tratamientos CA1 (3,4%) y CA2 (3,8%). Los demás géneros identificados fueron: *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Psychromonas*, *Celeribacter*, *Loktanella*, *Marinobacter* y *Asciidiaceihabitans*.

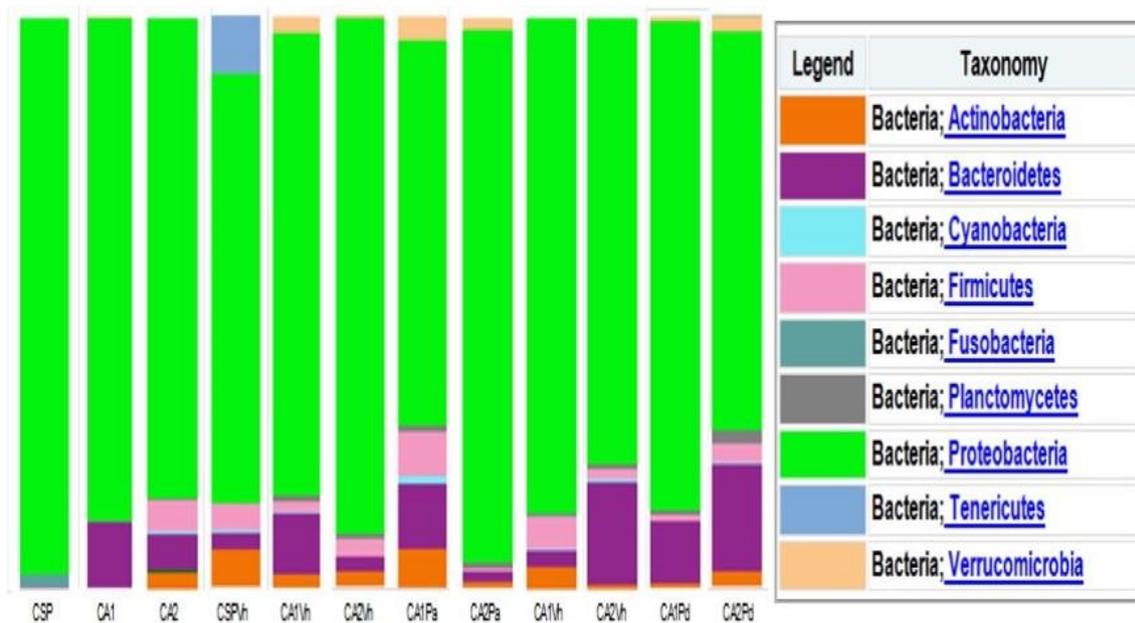


Figura 3. Composición de microbiotas a nivel de filo. Camarones alimentados con consorcio de bacterias probióticas CA1 o CA2 y luego inoculados (CSP, CA1, CA2) o inoculados (días 30 y 45) con varias cepas bacterianas patógenas: *V. nigripulchritudo* (Vn), *P. aeruginosa* (Pa), *V. harveyi* (Vh) o *P. damsela* (Pd). Recuperado de software QIIME, 2017.

En cuanto al género *Bacillus*, correspondiente a las bacterias probióticas, podemos señalar que estuvo ausente en el tratamiento control CSP, pero presente en todas las microbiotas correspondientes a tratamientos con los mix de bacterias probióticos CA1 y CA2. Además, se realizó la representación del Heafman, considerando los géneros en las microbiotas de los tratamientos (Figura 4), en donde se puede observar que la agrupación de los tratamientos (arriba) fluctuaba en relación a las infecciones con bacterias patógenas.

Discusión

La determinación de la relación huésped microbiota de las bacterias intestinales ayuda en la identificación de microorganismos con potencial para su desempeño como probióticos, los cuales son utilizados cada vez más como un medio alternativo para prevenir el uso de antibióticos en la crianza de animales acuáticos (Chai *et al.*, 2016; Nayak, 2010). Por ende, en la industria acuícola del camarón la supervivencia es uno de

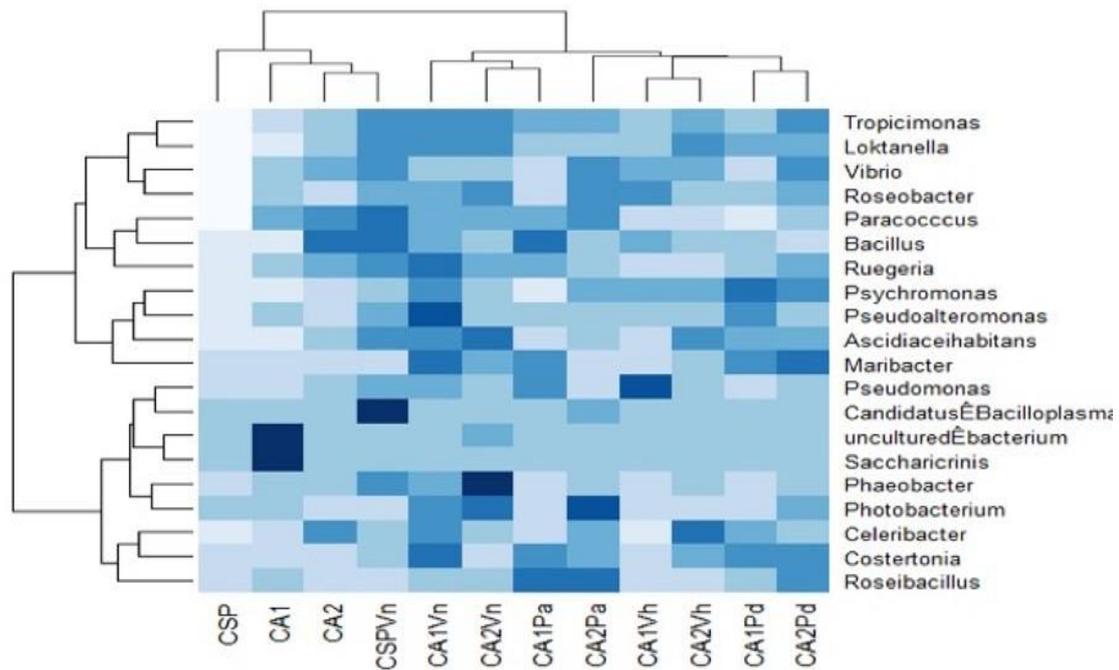


Figura 4. Heatmap de la diversidad bacteriana de los diferentes tratamientos. Camarones alimentados con consorcio de bacterias probióticas CA1 o CA2 y luego inoculados (CSP, CA1, CA2) o inoculados (días 30 y 45) con varias cepas bacterianas patógenas: *V. nigripulchritudo* (Vn), *P. aeruginosa* (Pa), *V. harveyi* (Vh) o *P. damsela* (Pd). Recuperado de software R STUDIO, 2017.

los factores más importantes, asimismo, está estrechamente ligada en la determinación de la calidad y potencial de los probióticos. Así teniendo como resultado, que los camarones suplementados con el mix de bacterias probióticas CA1 o CA2 (10^4 UFC/mL) sean o no inoculados con bacterias patógenas, fueron influenciados positivamente en la supervivencia. Determinando que la administración de los mix de bacterias probióticas CA1 y CA2, aumentan la resistencia de los camarones frente a bacterias patógenas entre ellas *Vibrios*, coincidiendo con Liu *et al.* (2015), quienes aislaron y caracterizaron *Bacillus* spp. antagonistas a *Vibrios* spp. para su uso como probióticos en acuicultura.

En los datos de análisis de bioinformática obtenidos del secuenciamiento de los amplicones bacterianos dirigida al ADN ribosomal 16S, mediante la técnica PGM de Ion Torrent, mostró que los tratamientos contenían entre 82 - 336 OTUs y 5 - 12 filos diferentes, estos datos fueron similares a los obtenidos por Huang *et al.* (2014), en los que estudiaron los cambios de la composición microbiana intestinal durante el crecimiento de *L. vannamei* con números de OTUs (50 - 240) detectados por el método 454 Pirosecuenciación y siendo inferior a los datos obtenidos por Rungrassamee *et al.* (2014) en una muestra de camarón salvaje *Penaeus monodon* el cual tuvo mayor número de OTUs (806).

Estas discrepancias pueden resultar de los diferentes métodos de secuenciación utilizados, así como de las diferentes especies de camarón examinadas o de las condiciones de cultivo y los tratamientos utilizados. En el trabajo realizado por Louis-Villaseñor *et al.* (2013), se demuestra que la composición microbiana intestinal presenta una de diversidad mayor mediante el análisis de índice de Shannon.

En este estudio, los valores de los índices de Shannon sugirieron que el tratamiento CSP (índice de Shannon = 1,682) tenía menor diversidad en la composición microbiana en comparación a los otros tratamientos y la menor diversidad podría ser por efecto de la presencia del patógeno y la pobre riqueza en diversidad de especies sugiriendo una

mayor susceptibilidad a la invasión de patógenos (Dillon *et al.*, 2005), pero suplementando la mezcla de cepas probióticas con o sin desafío a bacterias patógenas el índice de Shannon fue mayor que el tratamiento control CSP.

Sin embargo, en este estudio los datos no fueron similares a los presentados por Luis-Villaseñor *et al.* (2013), quienes informaron que la suplementación dietética con la mezcla de *Bacillus* redujo significativamente la diversidad de la composición microbiana del intestino del camarón *L. vannamei*, en contraste a lo mencionado por De Schryver y Vadstein (2014), quienes afirman que las comunidades ricas en especies muestran más resistencia a la colonización de un patógeno.

Además, en el análisis del índice de Chao1 para la riqueza de la composición microbiana en intestinos de camarón estuvieron en un rango de 49 - 340 filotipos. Todos los valores de Chao1 fueron inferiores a los OTUs observados en todos los tratamientos, lo que sugiere que hubo una elevada cobertura de las especies bacterianas en el cuerpo de las postlarvas e intestinos de juveniles.

El análisis bioinformático, reveló que la composición microbiana presenta varios OTUs compartidos en el intestino del camarón *L. vannamei* en los diferentes tratamientos (Figura 3, Tabla 3), entre ellos Rhodobacteraceae y Vibrionaceae (Familia) pertenecientes a Proteobacteria (filo). Siendo el filo Proteobacteria predominante en la composición microbiana intestinal del camarón (Huang *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015), con abundancia relativamente baja de Bacteroidetes y Firmicutes.

Este patrón de composición microbiana está relacionado con hallazgos recientes de otros estudios de investigación con diferentes especies de camarón (Cardona *et al.*, 2016; Chaiyapechara *et al.*, 2012; Luis-Villaseñor *et al.*, 2013; Rungrassamee *et al.*, 2014). Mientras que Zhang *et al.*, (2014), determinó que Proteobacteria y Tenericutes fueron los filos dominantes en los intestinos de *L. vannamei*, independientemente de la dieta, en contraste a este estudio, la abundancia de Tenericutes fue demasiado bajo en todos los grupos de tratamiento.

La discrepancia entre este estudio y el de Zhang *et al.*, (2014) puede atribuirse a condiciones de crecimiento, diferentes tratamientos de desafíos o el ambiente externo. En cuanto a nivel de género, *Vibrio* de la familia Vibrionaceae fue predominante en la mayoría de los tratamientos (Tabla 3). Siendo el género *Vibrio* un patógeno potencial para el camarón, y, en brotes, son causantes de vibriosis dando lugar a grandes pérdidas económicas para el sector camaronero (Hong *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2017).

Además, el clado *Roseobacter* de la familia Rhodobacteraceae está en todos los tratamientos; menos en el tratamiento control CSP. El aumento de este clado puede contribuir a aumentar la resistencia de los camarones en presencia de infecciones bacterianas, así mismo estudios previos mencionan que los miembros del clado *Roseobacter* ejercen efectos probióticos y se utilizan como suplementos para algunos animales acuáticos, como los nauplios de artemia (Grotkjaer *et al.*, 2016), debido a que los *Roseobacter* son metabolizadores de azufre y carbono (Gram *et al.*, 2015), y productoras de un compuesto antibacteriano como el ácido tropoditiético (TDA), por lo que tienen un gran potencial en la mejora de la calidad del agua y la actividad antibacteriana.

Además, la gráfica del Heafman mostro que los diferentes tratamientos no estaban bien distribuidos dentro de un mismo grupo, lo que indica fluctuaciones en la composición de la diversidad microbiana. Esto contrasta con los resultados de Rungrassamee *et al.*, (2014); y Sha *et al.*, (2016), quienes demostraron que la composición microbiana del intestino del camarón fluctuaba menos cuando crecía bajo los mismos tratamientos. Por

lo tanto, la caracterización de la composición microbiana de intestinos de *L. vannamei* es de gran interés para el avance de la comprensión de la relación entre el huésped y el microorganismo (patógeno o no), teniendo en cuenta que algunos simbioses microbianos son beneficiosos para el desarrollo y la fisiología de su huésped (Rungrassamae *et al.*, 2014).

Los dos mix de bacterias probióticas CA1 y CA2 han conducido a cambios importantes en la composición de la microbiota intestinal y del tracto digestivo, en particular a nivel de diversidad de la microbiota. Por lo tanto, se debe realizar futuras investigaciones de metagenómica enfocadas al estudio de la microbiota de otros órganos (hepatopáncreas, hemolinfa, ovarios, etc.) o de los sistemas de cultivo (biofilm, perifitón, bioflocs, suelos, aguas, etc.). Además, Este estudio de metagenómica de la microbiota de *L. vannamei* abre la vía a una mejor comprensión de las relaciones camarón-bacterias patógenas/probióticas para la selección de mix de bacterias probióticas y el uso de prebióticos.

Agradecimientos

A Dios por ser nuestra guía espiritual. A Concytec por el financiamiento de esta investigación (asignación 132-2015-FONDECYT). A la Universidad Nacional de Tumbes y todo el equipo técnico y científico de IncaBiotec S.A.C. y Concepto Azul S.A. por el financiamiento, asistencia en ensayos con animales, pruebas de laboratorio y redacción/revisión de este documento.

Bibliografía

1. Bokulich, N. A. *et al.* (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods*, 10(1), 57-59.
2. Boonyawiwat, V. *et al.* (2017). Impact of farm management on expression of early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease (EMS/AHPND) on penaeid shrimp farms in Thailand. *J. Fish Dis.*, 40(5), 649-659.
3. Caporaso, J. G. *et al.* (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108, 4516-4522.
4. Cardona, E. *et al.* (2016). Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiol.*
5. Chaiyapechara, S. *et al.* (2012). Bacterial Community Associated with the Intestinal Tract of *P. monodon* in Commercial Farms. *Microb. Ecol.*, 63, 938-953.
6. De Schryver, P., Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *ISME Journal*, 8, 2360-2368.
7. Del Carmen Flores-Miranda, M. *et al.* (2012). Isolation and characterization of infectious *Vibrio sinaloensis* strains from the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Rev. Biol. Trop.*, 567-76.
8. Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A. (2005). Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.*, 8, 1291-1298.
9. Dong, X. *et al.* (2017). Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* strain 20130629003S01 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. *Gut. Pathog.*, 1, 9-31.
10. Dubert, J. *et al.* (2016). Reclassification of the larval pathogen for marine bivalves *Vibrio tubiashii* subsp. europaeus as *Vibrio europaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 4791-4796.
11. Edgar, R. C. *et al.* (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 2194-2200.
12. Edgar, R. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460-2461.
13. Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.*, 110(2), 166-73.

14. Gomez-Gil, B. *et al.* (2014). Draft Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* Strain M0605, Which Causes Severe Mortalities of Shrimps in Mexico. *Dis. Aquat. Organ.*, 105, 45-55.
15. Goudenège, D. *et al.* (2013). Comparative genomics of pathogenic lineages of *Vibrio nigripulchritudo* identifies virulence-associated traits. *ISME Journal*, 1985-1996.
16. Gram, L. *et al.* (2015). Phaeobacter inhibens from the Roseobacter clade has an environmental niche as a surface colonizer in harbors. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 483-493.
17. Grotkjaer, T. *et al.* (2016). Isolation of TDA-producing Phaeobacter strains from sea bass larval rearing units and their probiotic effect against pathogenic *Vibrio* spp. in Artemia cultures. *Syst. Appl. Microbiol.*, 39(3), 180-8.
18. Hong, X.P. *et al.* (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish. Dis.*
19. Huang, Z. *et al.* (2014). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*.
20. Lightner, D. V. *et al.* (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, 110(12), 174-83.
21. Liu, L. *et al.* (2017). Rapid diagnosis of *Vibrio owensii* responsible for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease with isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Mol. Cell. Probes*, 33, 4-7.
22. Liu, X. F. *et al.* (2015). Isolation and characterization of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*
23. Louis-Villaseñor, I. E. *et al.* (2013). Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 29, 257-265.
24. Meiling, Z. *et al.* (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434, 449-455.
25. Mora, I. *et al.* (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14, 213-223.
26. Moreno, E. *et al.* (2017). Draft Genome Sequence of a *Vibrio harveyi* Strain Associated with Vibriosis in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Genome Announc.*
27. Nunan, L. *et al.* (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Organ.*, 111(1), 81-6.
28. Quimi, J. *et al.* (2017). Nuevas tecnologías moleculares de metagenómica independiente del cultivo para detectar e identificar bacterias de la microbiota del camarón: cambio de paradigma en diagnóstico y patología microbiana. *Cámara Nacional de Acuicultura*, 116, 29-31.
29. Rungrassamee, W. *et al.* (2014). Characterization of Intestinal Bacteria in Wild and Domesticated Adult Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Plos One*.
30. Schloss, P. D. *et al.* (2009). Introducing mothur: open- source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(23), 7537-41.
31. Sha, Y. *et al.* (2016). Bacterial Population in Intestines of *Litopenaeus vannamei* Fed Different Probiotics or Probiotic Supernatant. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(10), 1736-1745.
32. Suo, Y. *et al.* (2017). Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 63, 87-96.
33. Tandel, G. M. *et al.* (2017). Current status of viral diseases in Indian shrimp aquaculture. *Acta Virol.*, 61(2), 131-137.
34. Xiao, J. *et al.* (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Sci. Rep.*
35. Xiong, J. *et al.* (2016). The Underlying Ecological Processes of Gut Microbiota Among Cohabiting Retarded, Overgrown and Normal Shrimp. *Microb. Ecol.*, 73(4), 988-999.
36. Xiong, J. *et al.* (2015). Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
37. Xiong, J. *et al.* (2017). Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environ. Microbiol.*, 19(4), 1490-1501.