CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS AISLADAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE LA ALMEJA PATA DE MULA *Anadara tuberculosa* EN EL CULTIVO DE INVERTEBRADOS MARINOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

ANA CLAUDIA SÁNCHEZ ORTIZ

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2015

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 12 del Mes de Noviembre del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación del potencial probiótico de bacterias aisladas del tracto digestivo de la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa* en el cultivo de invertebrados marinos de importancia comercial"

Presentada por el alumno:

Ana Claudia Sánchez Ortiz

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

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

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director de Tesis

Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Co-Director

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Tutor

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Tutor

Dr. Antonio Luna González
Co-Tutor

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de comités

Comité Tutorial

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, CIBNOR

Dr. José Manuel Mazón Suástegui, CIBNOR

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, CIBNOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez, CIBNOR

Dr. Antonio Luna González, CIIDIR-IPN

Comité Revisor de Tesis

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, CIBNOR

Dr. José Manuel Mazón Suástegui, CIBNOR

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, CIBNOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez, CIBNOR

Dr. Antonio Luna González, CIIDIR-IPN

Miembros del Jurado de Tesis

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, CIBNOR

Dr. José Manuel Mazón Suástegui, CIBNOR

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, CIBNOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez, CIBNOR

Dr. Antonio Luna González, CIIDIR-IPN

Suplentes

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra, CIBNOR

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña, CIBNOR

Resumen

Se llevó a cabo el aislamiento, caracterización y evaluación *in-vitro* e *in-vivo* de bacterias obtenidas del tracto digestivo de la almeja Pata de Mula *Anadara tuberculosa*, a fin de determinar su potencial probiótico. Se evaluaron *in-vitro* 151 cepas, determinando actividad hemolítica, hidrofobicidad, tolerancia a nitrógeno amoniacal, salinidad y pH, cinética de crecimiento, actividad enzimática extracelular, autoagregación y coagregación. Se seleccionaron siete cepas que se identificaron por métodos moleculares, de las que, en *Litopenaeus vannamei* se evaluaron las cepas MAt29, MAt35, GAtB1, GAtBAL7 y la mezcla de las cuatro. Se registró una diferencia significativa con GAtB1 en el conteo de hemocitos, en relación al grupo control. La mejor tasa de crecimiento específico (TCE) se obtuvo con la mezcla. En un segundo bioensayo se evaluaron diferentes concentraciones de otra mezcla bacteriana (GAtB1, MAt32 y MAt43). La mayor TCE y menor prevalencia de WSSV se obtuvo con la concentración de 10^6 UFC·gr^{-1} de mezcla bacteriana. Los menores porcentajes de prevalencia de IHHNV y WSSV+IHHNV, se obtuvieron a una concentración de 4 ×10^6 UFC·gr^{-1}. Se registraron diferencias significativas en la expresión de los genes proFO, SOD, LvToll y HSP70 en *L. vannamei* con la mezcla bacteriana. Las cepas GAtB1, MAt32 y MAt43 se evaluaron en cultivos de microalgas utilizadas como alimento de bivalvos, no encontrando efecto significativo en el crecimiento de las microalgas. Las cepas GAtB1, MAt32 y MAt42 se evaluaron en ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea.* Se registró un mayor crecimiento en los grupos adicionados con bacterias y menor mortalidad ante un reto con *Vibrio parahaemolyticus*. Se comprobó la adhesión de dichas cepas al epitelio de *C. sikamea*, mediante microscopía de fluorescencia. Las bacterias aisladas de *A. tuberculosa* tuvieron un efecto benéfico sobre el crecimiento y respuesta inmune de *L. vannamei* y *C. sikamea*, lo que sugiere que tienen potencial probiótico para su aplicación en la acuicultura de organismos marinos.

Palabras clave: probióticos, *Anadara tuberculosa, Litopenaeus vannamei, Crassostrea sikamea.*

Vo Bo.

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Abstract

Isolation, characterization, and evaluation *in-vitro* and *in-vivo* of bacterial strains obtained from the gut of Pata de Mula *Anadara tuberculosa* were carried out to determine their probiotic potential. A total of 151 strains was evaluated *in vitro* for hemolytic activity, hydrophobicity, ammonia nitrogen tolerance, salinity and pH, growth kinetics, extracellular enzymatic activity, self-aggregation and co-aggregation, and identified by molecular methods. Strains MAt29, MAt35, GAtB1, GAtBAL7 and their mix were evaluated in *Litopenaeus vannamei*. A significant difference was recorded in counting hemocytes with GAtB1 compared to the control group. The best specific growth rate (SGR) was obtained with the mixture. In a second bioassay, different concentrations of bacterial mixture (GAtB1, MAt32 and MAt43) were evaluated. The best SGR and lowest prevalence of WSSV were obtained by using a concentration of 10^6 CFU·g^{-1}. The lowest percentages of prevalence of IHHNV and WSSV + IHHNV were obtained at a concentration of 4 × 10^6 CFU·g^{-1}. The bacterial mixture showed significant differences in the expression of proPO, SOD, LvToll, and HSP70 genes in *L. vannamei*. Strains GAtB1, MAt32 and MAt43 were evaluated in cultures of microalgae used as food for bivalves with no significant effect found on algal growth. Strains GAtB1, MAt42 and MAt32 were evaluated in Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* finding better growth in the groups with added bacteria and lower mortality during a challenge against *Vibrio parahaemolyticus*. Adhesion of the same strains to *C. sikamea* epithelium was observed using fluorescence microscopy. In general, bacterial isolates of *A. tuberculosa* showed a beneficial effect on growth and immune response of *L. vannamei* and *C. sikamea*, suggesting they have potential as probiotics for application in marine organism aquaculture.

Keywords: probiotics, *Anadara tuberculosa, Litopenaeus vannamei, Crassostrea sikamea*

Dedicatoria

A mi padre

Enseñarás a volar,
pero no volarán tu vuelo.

Enseñarás a soñar,
pero no soñarán tu sueño.

Enseñarás a vivir,
pero no vivirán tu vida.

Sin embargo...
en cada vuelo,
en cada vida,
en cada sueño,

perdurará siempre la huella
del camino enseñado.

Caminante no hay camino… se hace camino al andar…y tú siempre me acompañas en mi camino.

Agradecimientos

Al CIBNOR por acogerme en sus instalaciones y brindarme las facilidades para llevar a cabo este proyecto. Gracias al CONACYT por la beca otorgada número 216604/209357, y beca mixta. A CIIDIR-IPN por brindarme el espacio y apoyo durante mi estancia.

A mis directores. Gracias al Doctor Mazón por todo su apoyo, por su paciencia y dedicación a lo largo de estos años de diferencias y trabajo. Gracias por su interés en mi progreso y por los buenos ratos en las carnes asadas. Gracias al Doctor Campa por aceptarme y brindarme todo su apoyo, sobre todo en los momentos confusos y difíciles.

A mis asesores, Doctores Luna, Ascencio y Tovar, gracias por su buena disposición, acertados comentarios y prácticos consejos.

Al personal del departamento de posgrado, servicios escolares, apoyos y becas. Muchas gracias por su amable y excelente atención a la Lic. Osvelia, Lic. Leticia, Tania y Claudia. Gracias por todos los apoyos otorgados.

Al apoyo técnico de los compañeros del Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Laboratorio de Mantenimiento de Organismos Acuáticos, Laboratorio de Cultivo de Moluscos, Laboratorio de Producción de Microalgas, Bioterio, Biblioteca y Horacio en cómputo de CIBNOR, así como a estudiantes, técnicos e investigadores en los laboratorios en el edificio de acuicultura de CIIDIR-IPN, Guasave, Sin.

Gracias por su apoyo en la edición del resumen en inglés a Diana Dorantes y su amable ayuda en la edición del segundo artículo.

Compañeros y amigos que de una manera u otra pusieron su granito de arena en la realización de este trabajo: Irasema, Ruth, Carmen, Amada, Diana, Fercho, Janeth, Yenni, y por supuesto a Ricardo.

Por su amistad Carol, Mau, Clau, Ivonne, Israel, Janeth, Fredy, Ivette, Claudia, Silvia, “las chicas”, los “roomies”. A todos aquellos que compartieron y departieron conmigo en algún momento durante estos cuatro años, aunque me faltara mencionarlos, les aprecio mucho y agradezco el tiempo compartido.

Muchas gracias al apoyo incondicional de mi familia. Víctor, Oscar, Pris, tios, primos. Principalmente de mi mamá, la mujer más admirable que conozco.

De manera muy especial agradezco a Lalo y a Ricardo por ser mi motivo para seguir adelante, ustedes son el mejor regalo que pudo haberme dado la vida. Gracias a mi hermana por ellos.

Contenido

Resumen en español i
Resumen en inglés ii
Dedicatoria iii
Agradecimientos iv
Contenido vi
Lista de figuras viii
Lista de tablas xi
1 INTRODUCCIÓN 1
2 ANTECEDENTES 5
2.1 Microbiota en moluscos bivalvos 5
2.2 Respuesta inmune en invertebrados marinos 7
2.3 Producción acuícola de camarón en México 9
2.4 Producción acuícola de moluscos bivalvos en México 12
2.5 Probióticos 17
2.6 Uso de probióticos en crustáceos 22
2.7 Uso de probióticos en moluscos bivalvos 24
3 JUSTIFICACIÓN 27
4 HIPÓTESIS 28
5 OBJETIVOS 29
5.1 OBJETIVO GENERAL 29
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES 29
6 MATERIALES Y MÉTODOS 30
6.1 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN *in vitro* E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS 30
6.1.1 Sitios de colecta de *A. tuberculosa* 30
6.1.2 Manejo de organismos y extracción del TD 32
6.1.3 Aislamiento de bacterias 33
6.1.4 Caracterización fenotípica 34
6.1.5 Actividad hemolítica en agar sangre 35
6.1.6 Actividad catalasa 35
6.1.7 Antibiograma 36
6.1.8 Actividad antagónica 36
6.1.9 Capacidad enzimática 37
6.1.10 Hidrofobicidad 38
6.1.11 Curva de crecimiento 39
6.1.12 Conteo de UFC 40
6.1.13 Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl y pH 40
6.1.14 Tolerancia al nitrógeno amoniacal (TAN) 40
6.1.15 Autoagregación y coagregación 41
6.1.16 Identificación molecular 42
6.2 EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS BACTERIAS SELECCIONADAS EN CULTIVOS EXPERIMENTALES DE *L. vannamei* 43
6.2.1 Preparación de las cepas seleccionadas 43
6.2.2 Primer bioensayo con *L. vannamei* 43

6.2.3 Segundo bioensayo con *L. vannamei* 51
6.3 EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS BACTERIAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS EN SEMILLAS DE OSTIÓN *C. sikamea* 59
6.3.1 Evaluación del crecimiento del alimento vivo (microalgas) en co-cultivo con las bacterias seleccionadas 59
6.3.2 Bioensayo con juveniles de ostión *C. sikamea* 61
6.3.3 Reto con *V. parahaemolyticus* 62
6.3.4 Crecimiento y supervivencia 63
6.3.5 Modulación de microbiota en el agua de cultivo 64
6.4 EVALUACIÓN DE ADHESIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS EN SEMILLAS DE *C. sikamea* 65
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 66
7 RESULTADOS 67
7.1 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS 67
7.2 EVALUACIÓN *in vitro* DE LAS CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS 68
7.3 EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LAS CEPAS SELECCIONADAS POR SU POTENCIAL PROBIÓTICO 79
7.3.1 Primer bioensayo con *L. vannamei* 79
7.3.2 Segundo bioensayo con *L. vannamei* 86
7.4 EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS BACTERIAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS EN OSTIÓN *C. sikamea* 94
7.4.1 Evaluación del crecimiento del alimento vivo, microalgas, con bacterias potencialmente probióticas 94
7.4.2 Evaluación *in vivo* de las bacterias potencialmente probióticas en ostión *C. sikamea* 95
7.5 EVALUACIÓN DE ADHESIÓN DE PROBIÓTICOS EN SEMILLAS DE *C. sikamea* 99
8 DISCUSIÓN 102
8.1 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN *in vitro* E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO 102
8.2 CARACTERIZACIÓN *in vitro* DE LAS CEPAS AISLADAS 103
8.3 EVALUACIÓN *in vivo* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE LAS CEPAS BACTERIANAS 110
8.3.1 Evaluación *in vivo* de las bacterias seleccionadas en cultivos experimentales de *L. vannamei* 110
8.3.2 Evaluación *in vivo* de probióticos en semillas de *C. sikamea* 118
8.4 Evaluación de adhesión de probióticos en semillas de *C. sikamea* 122
9 CONCLUSIONES 124
10 LITERATURA CITADA 126
11 ANEXOS 143

Lista de figuras

Figura 1.- Serie histórica de la producción de camarón en México dada en toneladas por comparativo de producción (arriba) y la producción por entidades (abajo) de acuerdo a CONAPESCA (2013)..... 10
Figura 2.- Producción histórica mundial de bivalvos según su captura por pesquerías y cultivo desde 1970 al 2005, de acuerdo a la FAO (2007). 12
Figura 3.- Producción de moluscos bivalvos en México de 1980 al 2005 por acuicultura. Fuente: Maeda-Martínez (2008). 13
Figura 4.- Producción de las cuatro especies cultivadas de moluscos bivalvos más importantes en México de 1980 al 2005. Fuente: Maeda-Martínez (2008). 14
Figura 5.- Tipo de asociaciones bacteria-invertebrado acuático. Fuente: Harris (1993). ... 18
Figura 6.- Guía esquematizada para la evaluación de probióticos en alimentos para consumo humano. Fuente: Ganguly *et al.* (2011). 21
Figura 7.- Macrolocalización del sitio de colecta que abarca el sistema lagunar Santo Domingo-Bahía Magdalena-Bahía Almejas (BM). 31
Figura 8.- Macrolocalización del sitio de colecta en la Bahía Navachiste en la ciudad de Guasave, Sinaloa, México. 32
Figura 9.- Hidrofobicidad y características de la superficie bacteriana de las cepas seleccionadas obtenidos por su capacidad de adhesión a solventes orgánicos: <30 %= baja, >30-<60 %= media, >60 %= alta. Las líneas sobre las barras respresentan EE. 72
Figura 10.- Tolerancia al nitrógeno amoniacal total (TAN) de cada uno de los aislados. Se muestra el promedio de tres réplicas. Las líneas sobre las barras respresentan EE. 73
Figura 11.- Curva de crecimiento de las cepas seleccionadas, obtenida por absorbancia a 600nm hasta por 96 h. 74
Figura 12.- Crecimiento de las cepas seleccionadas tras 24 h de incubación a 37 °C en medio TSB a diferentes concentraciones de NaCl. Las líneas sobre las barras respresentan el EE. 75
Figura 13.- Crecimiento de las cepas seleccionadas tras 24 h de incubación a 37°C en medio TSB a diferentes valores de pH. Las líneas sobre las barras respresentan el EE. 76
Figura 14.- Peso promedio (PP) y tasa de crecimiento específico (TCE) para los camarones tratados con bacterias potencialmente probióticas durante 28 días. C: Control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mix 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 30 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 80
Figura 15.- Conteo total de hemocitos CTH en camarón tras 28 días de tratamiento con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 9 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 81
Figura 16.- Concentración de anión superóxido en muestras de hemolinfa de camarón blanco tratado con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 9 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 82

Figura 17.- Concentración de fenoloxidasa (FO) en muestras de hemolinfa de camarón blanco tratado con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 27. 83
Figura 18.- Concentración de profenoloxidasa (proFO) en muestras de hemolinfa de camarón blanco tratado con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 27. Las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 83
Figura 19.- Concentración de proteinas totales en sobrenadante de lisado de hemocitos de camarón blanco tratado con bacterias potenciamente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 27. Las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 84
Figura 20.- Crecimiento en peso promedio semanal para los camarones tratados con mezcla de bacterias potencialmente probióticas. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 30. 87
Figura 21.- Peso promedio (PP) y tasa de crecimiento específico (TCE) para los camarones tratados con mezcla de bacterias potencialmente probióticas durante 32 días. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 30 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 87
Figura 22.- Expresión relativa de los genes superóxido dismutasa (SOD), profenoloxidasa (proFO), receptor LvToll (LvToll) y transglutaminasa (TG) en hemocitos. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE y los asteriscos señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 90
Figura 23.- Expresión génica relativa de la enzima superóxido dismutasa (SOD), profenoloxidasa (proFO), receptor LvToll (LvToll) y transglutaminasa (TG) en hemocitos, respecto al grupo control C. T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}.Las líneas sobre las barras respresentan el EE y los asteriscos señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 90
Figura 24.- Expresión génica relativa para tripsina (Trip), catepsina B (Cat-B) y proteína de estrés al calor (HSP70) en hepatopáncreas. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE y los asteriscos señalan diferencias significativas ($p<0.05$).. 92
Figura 25.- Expresión génica relativa para tripsina (Trip), catepsina B (Cat-B) y proteína de estrés al calor (HSP70) en hepatopáncreas, respecto al grupo control C. T1= 10^6UFC/g, T2= 2×10^6 UFC/g, T3= 4×10^6 UFC/g, T4= 6×10^6 UFC/g. Las líneas sobre las barras respresentan el EE y los asteriscos señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 92
Figura 26.- Crecimiento celular de las microalgas empleadas en el cultivo de moluscos bivalvos en interacción con bacterias potencialmente probióticas. C1= *Isochrysis galbana*, C2= *Chaetoceros calcitrans*, T1= Is+MAt32, T2= Is+MAt43, T3= Is+GAtB1, T4= Ch+MAt32, T5= Ch+MAt43, T6= Ch+GAtB1. Las barras sobre las líneas indican EE. 94
Figura 27.- Crecimiento celular de las bacterias potencialmente probióticas en co-cultivo con microalgas usadas en el cutivo de moluscos bivalvos. C3=MAt32, C4=

MAt43, C5= GAtB1, T1= Is+MAt32, T2= Is+MAt43, T3= Is+GAtB1, T4= Ch+MAt32, T5= Ch+MAt43, T6= Ch+GAtB1. Las barras sobre las líneas indican EE. 95
Figura 28.- Crecimiento promedio de las semillas de *C. sikamea* con y sin administración de bacterias potencialmente probióticas antes del reto con *Vibrio*. Las barras de error indican el proemedio ± EE, y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 96
Figura 29.- Crecimiento promedio de las semillas de *C. sikamea* con y sin administración de bacterias con potencial como probióticos durante el tratamiento previo y posterior a la infección con *Vibrio*. Las barras sobre las líneas indican el promedio ± EE. 97
Figura 30.- Supervivencia en semillas de *C. sikamea* sin bacterias (C1-C3) y tratadas con bacterias potencialmente probióticas (T1-T4), posterior a la infección con *Vibrio*. Las barras sobre las líneas indican EE y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$). 98
Figura 31.- Prueba de adhesion de bacterias potencialmente probióticas en TD de semillas de *C. sikamea* una hora después de la administración de las cepas GAtB1 (a y b), MAt32 (c y d) y MAt42 (e y f) al agua de cultivo. La fluorescencia azul corresponde a las bacterias y la roja a las microalgas aún en tránsito. 100
Figura 32.- Prueba de adhesion de bacterias potencialmente probióticas en TD de semillas de *C. sikamea* 24 h después de la administración de las cepas GAtB1 (a, b y c), MAt32 (d, e y f) y MAt42 (g, h e i) al agua de cultivo. La fluorescencia azul corresponde a las bacterias y la roja a las microalgas aún en tránsito. 101
Figura 33.- Interacción bacteria-microalga. Fuente: Riquelme y Avendaño-Herrera (2003). 118

Lista de tablas

Tabla I.- Géneros de bacterias asociados al tracto gastrointestinal de distintos bivalvos: a) Harris, 1993; b) Romanenko *et al*., 2008; c) Trabal-Fernández *et al.*, 2012; d) Pujalte *et al*., 1999; e) Trabal-Fernández *et al.*, 2014. 6
Tabla II.- Registro de parásitos en moluscos bivalvos de importancia económica en América Latina. Fuente: FAO (2007). 15
Tabla III.- Revisión tomada de Prado *et al.* (2010) acerca de algunos ensayos realizados con probióticos en cultivos larvarios de bivalvos. 26
Tabla IV.- Diseño experimental aplicado en el bioensayo *in vivo* con *L. vannamei.* Se muestran las principales características de selección de las cepas. NA = no aplica, ND = no determinado. 45
Tabla V.- Concentración de mezcla de bacterias potencialmente probióticas administradas en el alimento durante el bioensayo *in vivo* con *L. vannamei.* 52
Tabla VI.- Mezcla de PCR empleada para los genes analizados en PCR punto final. 57
Tabla VII.- Protocolo de amplificación para los genes analizados en PCR punto final. 57
Tabla VIII.- Primers empleados para la amplificación de todos los genes analizados en *L. vannamei* tanto por PCR punto final como para PCR cuantitativa (qPCR). 58
Tabla IX.- Diseño experimental aplicado para evaluar si hay efecto por la adición de bacterias seleccionadas en el crecimiento de las microalgas cultivadas para alimento de ostión. Ig = *Isochrysis galbana*, Ch = *Chaetoceros calcitrans.* 60
Tabla X.- Diseño experimental de los tratamientos para evaluar el efecto potencialmente probiótico de bacterias aisladas de *A. tuberculosa* en semilla de *C. sikamea.* 62
Tabla XI.- Número de cepas aisladas en total en condiciones tanto de aerobiosis como anaerobiosis en cada uno de los medios empleados para ambos sitios de colecta. 67
Tabla XII.- Resultados del análisis *in vitro* de las cepas aisladas del TD de *A. tuberculosa*, mostrando pruebas realizadas y diagnóstico sobre su potencial probiótico. 68
Tabla XIII.- Resultados de la tinción Gram y las pruebas de catalasa y hemólisis de cepas seleccionadas provenientes de Bahía Magdalena (MAt), y cepas provenientes de Bahía Navachiste, Guasave, Sinaloa (GAt). 70
Tabla XIV.- Resúmen de resultados de las pruebas realizadas a algunas de las cepas aisladas a partir del TD de *A. tuberculosa* para catalasa (Ct), rojo congo (Rc), antagonismo con *Vibrio*, degradación en Skim Milk para proteasas (SM) y en Blue Spirit para lipasas (BS). 71
Tabla XV.- Total de aislados bacterianos provenientes del TD de *A. tuberculosa* tanto en B.C.S. (Bahía Magdalena o BM) y Sinaloa (Bahía Navachiste o BN) y número de cepas seleccionadas en base a sus características hemolíticas, tinción Gram e hidrofobicidad. 72
Tabla XVI.- Porcentaje de adhesión a tres solventes orgánicos de cada cepa seleccionada. 73
Tabla XVII.- Habilidad de autoagregación y coagregación de cada cepa con *Vibrio sp.* después de 5 h de incubación a temperatura ambiente en PBS (pH 7.2). 76
Tabla XVIII.- Resumen de resultados de la caracterización y pruebas *in vitro* para determinar el potencial probiótico de ocho cepas seleccionadas. También se muestra la identificación molecular de las cepas. 78
Tabla XIX.- Resumen de los parámetros de supervivencia y crecimiento para los camarones tratados con la mezcla potencialmente probiótica a diferentes

concentraciones. Pi= peso inicial, Pf= peso final, CA= crecimiento absoluto, TCE= tasa de crecimiento específico. (*) Indica diferencias significativas.....86
Tabla XX.- Porcentaje de camarones infectados con WSSV y/o IHHNV al principio y al final del bioensayo con camarones tratados con diferentes concentraciones de mezcla bacteriana. 88
Tabla XXI.- Resultados del crecimiento final promedio de las semillas de *C. sikamea* tratadas (T1-T4) y sin tratar (C1-C3) con bacterias potencialmente probióticas, posterior al reto con *VIbrio*. A= ancho en mm, L= longitud en mm, EE= error estándar, CA= Crecimiento absoluto, CV = coeficiente de variación. Los superíndices en los valores de longitud indican diferencias significativas p<0.05. 97

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos bivalvos es una actividad de gran importancia económica en México, con un mercado en consolidación y un creciente interés en la eficientización de la tecnología y procesos acuícolas que involucran trabajo en laboratorio y en campo, para obtener mejores productos e insumos para la producción. La tecnología tiene dos vertientes: la producción de semilla y la siembra y engorda de esa semilla en campo. En el caso de los moluscos bivalvos, el desarrollo de nuevos cultivos es necesario y también la incorporación de nuevas especies nativas con potencial. El mercado de estos productos acuícolas, se ha generado históricamente con base en el consumo regional de diversas especies cuyas poblaciones naturales se han sobreexplotado disminuyendo los volúmenes de extracción pesquera (FAO, 2012).

Al ser organismos filtradores, en la naturaleza no hay moluscos libres de bacterias. Generalmente los estudios bacteriológicos en moluscos se centran en la investigación de las enfermedades asociadas a su microbiota y en la caracterización y control de las especies patógenas (Romalde y Barja, 2010). Además, existen investigaciones con un enfoque hacia la sanidad del producto derivado de la pesca o del cultivo, cuyo propósito es la detección y el control de bacterias que, sin afectar al molusco en determinada concentración, son dañinas para el ser humano. Sin embargo, no todas las especies bacterianas son patógenas, algunas pueden ser inocuas para el consumidor e incluso ser benéficas para el hospedero, aunque aún no se ha dilucidado con claridad su mecanismo de acción (Kesarcodi-Watson *et al*., 2008).

A las bacterias que integran la comunidad microbiana dentro del tracto gastrointestinal (TGI) del hospedero, se les puede clasificar por su tiempo de permanencia dentro del TGI en residentes y transeúntes. A las bacterias que

pasan por el TGI del organismo pero no se adhieren ni colonizan el epitelio intestinal se les conoce como transeúntes (transientes, transitorios). En cambio, aquellas bacterias capaces de adherirse al epitelio y colonizarlo se les considera residentes o permanentes. Sin embargo, algunas bacterias transeúntes logran crecer su población cuando las condiciones dentro del TGI son óptimas, por lo que se les puede llegar a considerar de manera equivocada como bacterias residentes (Harris, 1993). Para entender el papel fisiológico de las especies patógenas y benéficas (Moriarty, 1997) en los invertebrados marinos, particularmente en moluscos bivalvos (Kesarcodi-Watson *et al*., 2008), es necesario conocer y estudiar la comunidad microbiana presente en el TGI del hospedero y la dinámica de interacción entre especies residentes y transitorias (Harris, 1993), así como la variación en la composición y diversidad específica de la comunidad microbiana en función de las condiciones climáticas y de estrés (Trabal-Fernández *et al.*, 2014).

En el medio marino, las bacterias son importantes actores en los procesos ecológicos ya que realizan distintas funciones vitales para el buen funcionamiento de los ecosistemas, pero también tienen un importante rol metabólico como simbiontes que conforman la microbiota residente y transitoria en el TGI de moluscos y otras especies de invertebrados. De manera general, la microbiota contribuye a la degradación del alimento, participa en procesos oxidativos y proporciona diversos beneficios al hospedero, que le permiten desarrollarse en diferentes ambientes, por ejemplo, de alta salinidad o de baja concentración de oxígeno (Harris, 1993).

Los beneficios que tiene la aplicación de una o de varias cepas bacterianas en el alimento o el agua de cultivo de especies de interés comercial, ha llevado a la introducción del concepto de “probiótico” (Parker, 1974), cuya definición aún se encuentra en debate (Fuller, 1989; Gismondo *et al.*, 1999; Verschuere *et al*., 2000; Kesarcodi-Watson *et al*., 2008).

Se ha distinguido el término de “probiótico” para separar a los microorganismos que actuarán en el TGI del hospedero, de aquellos empleados en la investigación enfocada hacia la biorremediación de agua y suelos en las estanquerías de cultivo mediante el uso de clusters o consorcios microbianos que incluyen cepas bacterianas con capacidad para remover nitrógeno amoniacal. Debido a lo anterior, Gatesoupe (1999) propone catalogar el uso de las preparaciones microbianas en acuicultura reservando el término “probiótico” a bacterias transitorias o residentes en el tracto digestivo (Tannock, 1997), el término “biocontrol” para las cepas antagónicas a patógenos (Maeda *et al.*, 1997) y “biorremediación” para los microorganismos empleados para eliminar residuos contaminantes en el agua de cultivo (Gatesoupe, 1999).

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación de la ONU (FAO, 2006) se considera probióticos a aquellos “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero”. Debido a sus potenciales beneficios, el uso de probióticos se ha extendido a diversas especies de cultivo tanto en ambiente marino como dulceacuícola.

El manglar es un ecosistema de gran valor económico y ecológico en el cual, diversos organismos acuáticos obtienen refugio y alimento; es un hábitat de innumerables peces e invertebrados, que utilizan este ambiente para fines de alimentación, reproducción, dearrollo juvenil, reclutamiento y protección ante depredadores. Al ubicarse en la zona costera intermareal, el manglar es una zona de inundación y el suelo es fangoso. Los cambios periódicos en el nivel del mar por efecto de las mareas ocasionan una gran variación en la concentración del oxígeno disuelto y la salinidad del agua, por la evaporación asociada a la insolación y vientos dominantes, durante la marea baja. Esta zona fangosa y altamente variable en sus parámetros ambientales, es el hábitat natural de la especie objetivo de la presente investigación: la almeja Pata de Mula *Anadara tuberculosa*, la cual se encuentra perfectamente adaptada a esas condiciones

ambientales que serían estresantes para otros moluscos bivalvos. La especie presenta un pie musculoso con el que excava el sustrato para poder realizar migraciones verticales diarias.

A. tuberculosa es un molusco de amplia distribución en las costas del Pacífico, desde la Laguna de Ballenas (Baja California) hasta Perú. En México no existe un programa de manejo pesquero y acuícola, a pesar de que se trata de una especie de interés pesquero comercial, muy apreciado para el consumo regional, con demanda en el mercado nacional. El estudio de esta especie nativa llama la atención por sus características ecofisiológicas particulares derivadas de su adaptación al ambiente estresante del manglar. Entre otros, la salinidad es un factor muy importante en la distribución de esta especie y su proceso reproductivo (Silva-Benavides y Bonilla-Carrión, 2001). La particularidad e importancia del ambiente en el que se desarrolla, convierten a la pata de mula en una especie de gran interés científico. El estudio de la microbiota residente asociada a su tracto digestivo (TD) es importante porque pudiera incluir microorganismos con potencial probiótico, particularmente adaptados a las condiciones de estrés del manglar, a las que *A. tuberculosa* se encuentra expuesta.

2 ANTECEDENTES

2.1 Microbiota en moluscos bivalvos

Han sido pocos y relativamente recientes los estudios científicos sobre la microbiota en moluscos bivalvos. Existe una gran diversidad de grupos bacterianos residentes del TGI en distintas especies de moluscos bivalvos (Tabla I), especialmente para otro representante del género *Anadara,* la especie *A. broughtoni* (Romanenko *et al.,* 2008), que presenta una mayor diversidad de grupos bacterianos respecto a las demás, entre las que se encuentran el género *Bacillus*, uno de los géneros más conocidos por su potencial probiótico (Hong *et al*., 2005; Kumar *et al*., 2006; Nimrat *et al.,* 2012; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

Tabla I.- Géneros de bacterias asociados al tracto gastrointestinal de distintos bivalvos: a) Harris, 1993; b) Romanenko *et al*., 2008; c) Trabal-Fernández *et al.*, 2012; d) Pujalte *et al*., 1999; e) Trabal-Fernández *et al.*, 2014.

	Achromobacter	*Acinetobacter*	*Actinobacteria*	*Aeromonas*	*Alcaligenes*	*Alteromonas*	*Bacillus*	*Bacterium*	*Bacteroidetes*	*Bizionia*	*Borrelia*	*Brevundinomas*	*Burkholderia*	*Cellulomonas*	*Chloroflexi*	*Chromobacterium*	*Citrobacter*	*Corynobacterium*	*Cristospira*	*Cytophaga*	*Enterobacterium*	*Firmicutes*	*Flavobacterium*	*Fusobacteria*	*Halomonas*	*Micrococus*	*Moraxella*	*Oceanospirillum*	*Paenibacillus*	*Pantoea*	*Paracoccus*	*Photobacterium*	*Propionibacterium*	*Pseudoalteromonas*	*Pseudomonas*	*Psychrobacter*	*Ruegeria*	*Saccharothrix*	*Salegentibacter*	*Shewanella*	*Sphingobacterium*	*Sphingomonas*	*Staphylococcus*	*Sulfitobacter*	*Vibrio*
Donax gouldii [a]																																		x										x
Mytilus edulis [a]																															x													x
Crassostrea virginica [a]																			x																									
Cryptomya californica [a]																			x																									
Teredo furcifera [a]														x																													
Nototeredo knoxi [a]														x																													
Anadara broughtoni [b]				x			x			x		x													x				x	x				x	x	x		x	x		x		
Crassostrea gigas [c]							x						x																		x						x						x
Crassostrea corteziensis [c]											x		x																				x										
Ostrea edulis [d]						x	x													x					x							x		x						x			x
Crassostrea sikamea [e]			x						x													x		x								x											
Crassostrea gigas [e]			x						x						x							x		x								x											
Crassostrea corteziensis [e]			x						x						x							x		x								x											

2.2 Respuesta inmune en invertebrados marinos

Como se mencionó en las secciones anteriores, las enfermedades infecciosas son el principal causante de pérdida en el cultivo tanto de camarón como de moluscos. Con el fin de implementar nuevas estrategias para contrarrestar el daño por las enfermedades y disminuir sus agentes causales, es necesario conocer los mecanismos naturales propios que los organismos de cultivo emplean para defenderse ante una infección.

Tanto la cutícula en camarones como las valvas en los moluscos, son una barrera mecánica que evita la entrada de agentes invasores. Sin embargo, cuando un organismo patógeno logra introducirse en su hospedero, el sistema inmune entra en acción. El sistema inmune de los invertebrados no cuenta con memoria adaptativa, por lo que depende de la respuesta innata y sus dos componentes: celular y humoral (Ellis *et al.*, 2011).

La respuesta celular está dada por los hemocitos, que constituyen la principal línea de defensa contra agentes invasores. En moluscos se distinguen dos tipos de hemocitos: granulares y hialinos, mientras que, en crustáceos, además de los anteriores, se reconoce también un tercer tipo: los hemocitos semigranulares (Bachère *et al*., 1995).

Uno de los procesos de defensa interna de los hemocitos para eliminar el agente invasor es la fagocitosis. La fagocitosis conlleva una serie de pasos comenzando por la quimiotaxis, mediante la cuál el hemocito “persigue” el rastro químico del agente invasor. Al entrar en contacto con el agente invasor tiene lugar el reconocimiento por medio de moléculas presentes en la membrana de los hemocitos y en la del agente invasor, además de la secreción de moléculas denominadas “opsoninas”. Los receptores y el mecanismo de reconocimiento son fundamentales en la activación de la respuesta inmune. Finalmente, se internaliza el agente invasor dentro del “fagosoma” el cual forma el “fagolisosoma” al

fucionarse con un lisosoma. De esta manera se liberan una serie de enzimas lisosomales que actuarán ya sea intracelular o extracelularmente para destruir al agente o partícula invasora (Jiravanichpaisal *et al.,* 2006).

La generación de radicales libres es un proceso asociado a la fagocitosis por su alto potencial microbicida. Durante lo que se conoce como "estallido respiratorio" se producen especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como O_2^-, H_2O_2 y OH^-, las cuales, una vez que cumplieron su objetivo, deben ser eliminadas rápidamente del sistema pues también pueden ocasionar daño celular al organismo. Para la eliminación de las EROs los organismos cuentan con una maquinaria enzimática especializada, integrada por enzimas antioxidantes como la súperoxido dismutasa (SOD), encargada de la eliminación del O_2^-, y la catalasa, que elimina el H_2O_2. La generación de óxido nítrico es otro sistema microbicida de alta efectividad (Destoumieux *et al.*, 1997).

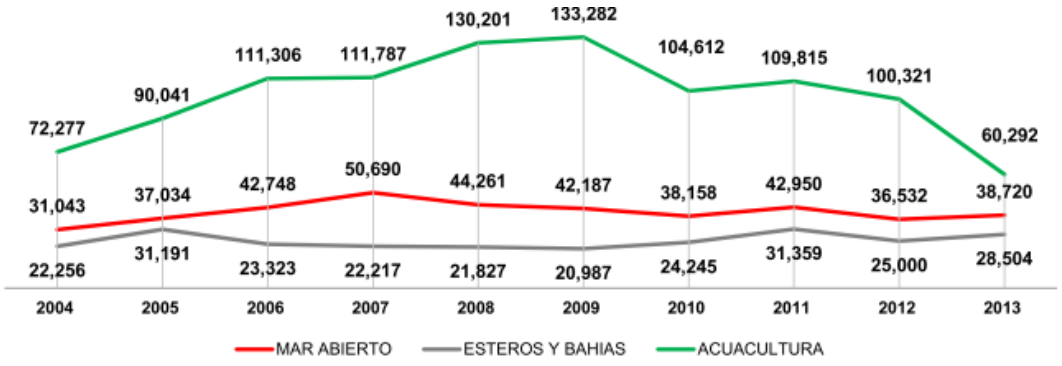
En el caso de crustáceos, se presenta un sistema para la eliminación de patógenos conocido como el sistema profenoloxidasa. Cuando la pared celular del agente microbiano invasor es reconocida, se activa una proteasa serina conocida como la enzima activadora de la profenoloxidasa (ppA). La forma activada de la ppA activa, a su vez, a la enzima profenoloxidasa (proFO) y se desencadena una cascada enzimática de proteínas y factores asociados al sistema proFO. Un factor de adhesión celular liberado por los hemocitos induce la desgranulación de los hemocitos granulares y semigranulares, amplificando la generación del sistema proFO, además de estimular la fagocitosis por los hemocitos hialinos (Sritunyalucksana y Soderhall, 2000).

La respuesta humoral se refiere a la producción de efectores solubles tales como las enzimas lisosomales, bactericidinas, aglutininas y lectinas, implicados en el reconocimiento y mecanismos de defensa contra agentes patógenos. Las lectinas pueden actuar como opsoninas tanto en moluscos bivalvos como en crustáceos. En el caso de los crustáceos se ha identificado una familia de péptidos antimicrobianos (PAM) denominados peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997). En

moluscos también se han identificado PAM como MGD2 de la familia de las defensinas, mytilina y mytimicina en *Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis* (Ellis *et al.*, 2011).

2.3 Producción acuícola de camarón en México

A nivel mundial, México ocupa el sexto lugar de producción de camarón, lo que ubica a la camaricultura como una de las principales actividades productivas del país. El cultivo de camarón en México aporta más de la mitad de la producción nacional de este recurso, incrementándose cada vez más debido al estancamiento de las capturas (Figura 1). En 2013 se registró una producción total de pesca y cultivo de camarón con valor de $7 521 403, de la cual más del 47% corresponde a la producción acuícola, con la mayor producción en el estado de Sinaloa (61,002 t, 47.84% de la producción total del país) y Sonora (25,639 t) (CONAPESCA, 2013).



SERIE HISTÓRICA DE LA PRODUCCIÓN DE CAMARÓN

TONELADAS
2004-2013

ENTIDAD	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
TOTAL	125,576	158,266	177,377	184,695	196,289	196,456	167,015	184,123	161,852	127,517
SINALOA	32,727	45,764	60,076	66,255	60,441	55,838	59,498	79,020	63,870	61,002
SONORA	53,441	67,179	78,598	78,405	96,557	101,045	58,447	52,424	47,116	25,639
TAMAULIPAS	13,366	20,062	13,437	14,459	13,497	11,801	16,182	11,618	12,205	9,192
NAYARIT	8,480	8,645	8,148	8,611	9,567	8,645	9,114	16,255	13,831	9,085
BAJA CALIFORNIA SUR	1,990	3,504	5,013	4,765	4,264	4,464	6,150	6,946	7,652	5,920
CAMPECHE	4,222	2,730	3,050	4,044	3,611	6,121	8,155	7,995	7,647	5,130
CHIAPAS	2,405	2,134	1,427	1,990	1,911	1,842	1,724	2,460	1,939	2,758
OAXACA	1,899	2,026	1,405	1,184	1,342	1,683	1,767	1,694	1,549	2,457
VERACRUZ	2,381	2,389	2,605	2,036	2,037	2,086	2,479	1,829	2,020	2,038
OTRAS*	4,664	3,834	3,618	2,945	3,062	2,930	3,498	3,882	4,023	4,296

* BAJA CALIFORNIA, COLIMA,GUERRERO, JALISCO, QUINTANA ROO, TABASCO Y YUCATÁN.

Figura 1.- Serie histórica de la producción de camarón en México dada en toneladas por comparativo de producción (arriba) y la producción por entidades (abajo). Fuente: CONAPESCA (2013).

Es importante destacar que la producción por acuicultura en 2012 sobrepasó el 67% del total del país, pero se redujo de manera importante durante 2013 a causa de la incidencia de patógenos que causaron grandes mortalidades en las granjas comerciales de engorda. El constante incremento en la aportación de la acuicultura a la producción mundial de alimentos de calidad, ha generado un amplio campo de estudio (FAO, 2012), particularmente en el cultivo de camarón y enfocándose principalmente a la prevención y control de enfermedades, tanto de origen viral como bacterianas (Lightner y Redman, 1998).

Una de las enfermedades más devastadoras y persistentes en el cultivo de camarón es el la enfermedad del síndrome de la mancha blanca o WSSD, por sus siglas en inglés (Lightner, 1996; Lightner y Redman, 1998). El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) fue inicialmente descrito en China y Japón en 1992-1993 (Inouye *et al*., 1994) y en EUA en 1995, presentando una rápida dispersión en Tailandia, Vietnam, Malasia, India, Nicaragua, Guatemala y Honduras (Jory y Dixon, 1999). Las infecciones por WSSV se extienden a diversas especies de peneidos tales como: *Penaeus monodon, Litopenaeus vannamei, L. stylirostris, Marsupenaeus japonicus* y *Fenneropenaeus chinensis,* y otros crustáceos como *Macrobrachium rosenbergii y Procambarus clarkii* (Lo *et al.*, 1996; Lightner y Redman, 1998; Wang *et al.*, 1999). Esta enfermedad es detectable visualmente por la letargia y nado errático de los organismos y por la presencia de manchas blancas (que confieren el nombre la enfermedad), producidas por la formación de depósitos de calcio en la cutícula. El WSSV puede ocasionar hasta el 100% de mortalidad dentro de los 10 días siguientes a la aparición de los primeros signos de enfermedad, causando grandes pérdidas económicas (Lightner, 1996).

Los invertebrados marinos, como el camarón, no tienen sistema inmune adaptativo, por lo que dependen completamente de la respuesta innata humoral y celular para la detección y eliminación de patógenos (Roch, 1999; Bachére *et al.*, 2004; Jiravanichpaisal *et al.,* 2006). Debido a que la incidencia de patógenos y sus enfermedades asociadas, son factores críticos en el cultivo de camarón, muchos estudios se han enfocado en incrementar su respuesta immune mediante diferentes estrategias tales como: terapia por fagos (Karunasagar *et al.*, 2007), vacunas (Karunasagar *et al.*, 1996; Namikoshi *et al.*, 2004), vacunas de ADN (Rout *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008), prebióticos (Li *et al.*, 2007; Yousefian y Amiri, 2009), probióticos (Lakshmi *et al.*, 2013) y simbióticos (Li *et al.*, 2009; Wongsasak *et al.*, 2015).

2.4 Producción acuícola de moluscos bivalvos en México

De acuerdo a la FAO (2007), desde hace varias décadas, la producción de moluscos bivalvos por cultivo sobrepasa las pesquerías a nivel mundial (Figura 2).

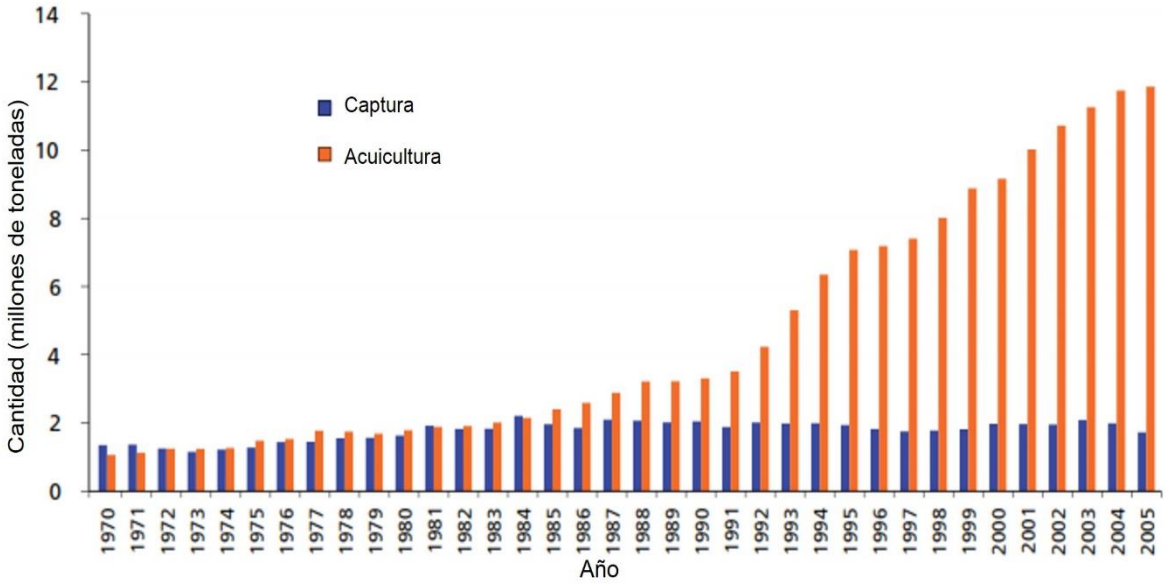


Figura 2.- Producción histórica mundial de bivalvos según su captura por pesquerías y cultivo desde 1970 al 2005, de acuerdo a la FAO (2007).

México ocupa el cuarto lugar en la producción de bivalvos en América Latina, a pesar de las grandes variaciones que ha presentado (Figura 3) debido a las grandes pérdidas causadas por patógenos o fenómenos climáticos adversos, siendo la producción de larvas y obtención de semillas la etapa más crítica en la cadena de producción (Maeda-Martínez, 2008).

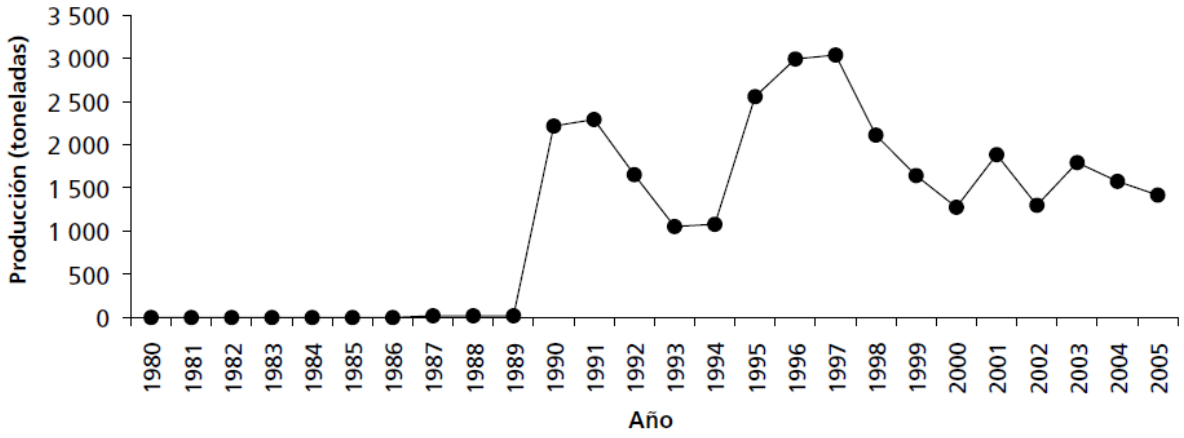


Figura 3.- Producción de moluscos bivalvos en México de 1980 al 2005 por acuicultura. Fuente: Maeda-Martínez (2008).

Las principales especies cultivadas para consumo humano son Crasso*strea gigas, Crassostrea corteziensis, Mytilus galloprovincialis* y *Argopecten ventricosus,* y *Pteria sterna* para la producción de perlas y productos cosméticos de concha nácar (Figura 4). Los principales factores que limitan la acuicultura de moluscos bivalvos son: disponibilidad de alimento, salinidad, depredación y la ocurrencia de enfermedades asociadas a patógenos y parásitos, además de aspectos sociales y logísticos de la producción (Maeda-Martínez, 2008).

Las principales causas de la disminución en la producción son: la reducida disponibilidad de semillas, la baja calidad del agua, los florecimientos algales nocivos, enfermedades, contaminación, pesticidas y reducida abundancia del fitoplancton. Cuando se presenta una enfermedad, normalmente los efectos se incrementan debido a agentes estresantes como altas temperaturas, disminución en el nivel de oxígeno disuelto y disponibilidad de nutrientes. Las estrategias de manejo correctas pueden disminuir el estrés, y el uso de líneas genéticas seleccionadas, puede incrementar la resistencia a enfermedades. La transferencia de agentes infecciosos vía el transporte de moluscos vivos ha sido la principal causa de brotes de enfermedades y epizootias (Martínez-Guzmán, 2008). Las enfermedades más importantes que afectan el cultivo de moluscos son:

Perkinsiosis, Marteiliosis, Haplosporidiosis, Mickrocytosis y Bonamiosis (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2008). Algunos de los principales agentes patógenos de moluscos se presentan en la Tabla II. La obtención de semillas de calidad es un punto crítico para la acuicultura de moluscos, por lo que el control de patógenos durante la etapa de larvicultura es de vital importancia, así como la dieta, temperatura y alimentación, entre otros factores tanto endógenos como exógenos (Martínez-Guzmán, 2008).

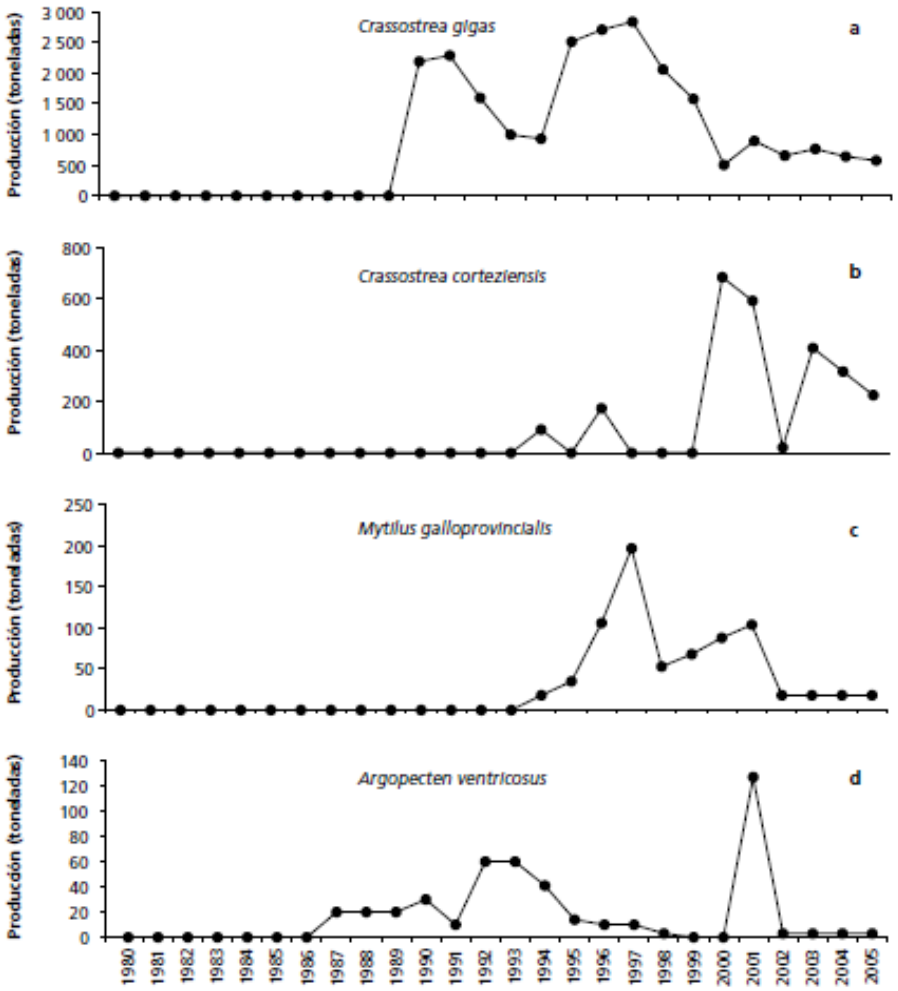


Figura 4.- Producción de las cuatro especies cultivadas de moluscos bivalvos más importantes en México de 1980 al 2005. Fuente: Maeda-Martínez (2008).

Tabla II.- Registro de parásitos en moluscos bivalvos de importancia económica en América Latina. Fuente: FAO (2007).

Hospedero	Parásito o simbionte	Distribución	Efecto	Referencias
Tiostrea chilensis	Neoplasia hemocítica	Sur de Chile	Infiltración hemocítica y reemplazo celular	Mix y Breese, 1980; Rojas *et al*., 1999; Campalans *et al*., 2000
Crassostrea gigas	Hipertrofia gametocítica viral Virus Tipo *Papillomavirus*	Noroeste de México	No asociado a mortalidades	Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001
C. gigas	Herpesvirus del ostión OsHV	Baja California, Sonora, Sinaloa, México	Asociado a mortalidades de juveniles	Vásquez-Yeomans *et al*., 2004; Vásquez-Yeomans, 2006
Crassostrea corteziensis, Mytilus californianus, Mytilus galloprovincialis, Mytilus edulis, Aulacomya atra, Ostrea puelchana, Chione fluctifraga, Pitar rostrata, Argopecten purpuratus, Aequipecten tehuelchus	Inclusiones tipo Rickettsia o Chlamydia	Baja California, Sonora, Nayarit, México. Uruguay. Bahía Tongoy, Chile. Provincia Chubut, Argentina	No asociado a mortalidades	Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001, 2007; Lohrmann *et al*., 2002; Cáceres-Martínez, 2004; Cremonte *et al*., 2005a; Cremonte *et al*., 2005b
Crassostrea virginica	*Perkinsus marinus*	Golfo de México	Asociado a mortalidades	Burreson *et al*., 1994; Román-Magaña, 2002
P. rostrata	*Perkinsus olseni*	Uruguay	Asociado a severas infiltraciones hemocíticas	Cremonte *et al*., 2005b
T. chilensis *O. puelchana*	*Bonamia* sp.	Chile. Provincia de Río Negro, Argentina	Posiblemente asociado a mortalidades	Kern, 1993; Campalans *et al*., 2000; Kroeck y Montes, 2005
T. chilensis	Microcélulas de Haplosporidio	Chile	¿	Campalans *et al*., 2000
C. gigas, C.corteziensis	Ciliados tipo *Ancistrocoma*	Noroeste de México	No asociado a mortalidades	Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans 2001, 2007.

Continuación Tabla II.- Registro de parásitos en moluscos bivalvos de importancia económica en América Latina. Fuente: FAO (2008).

Hospedero	Parásito o simbionte	Distribución	Efecto	Referencias
M. mactroides	Coccidios	Provincia de Buenos Aires, Argentina	Por lo general no asociado a mortalidades	Cremonte y Figueras, 2004; Fiori *et al*., 2004
C. gigas, C.virginica, C. corteziensis, A. purpuratus, A. ventricosus, N. subnodosus, C. fluctifraga, O. chilensis, Choromytilus chorus, Mesodesma donacium	Gusano perforador *Polydora* sp. *Dypolydora giardi, Dodecaceria choromyticola, Polydora bioccipitalis, Polydora ricketsi*	México. Chile	No asociado a mortalidades	Carrasco, 1977; Rozbaczylo *et al*., 1980; Blake, 1983; Oliva *et al*.,1986; Basilio *et al*., 1995; Cáceres-Martínez *et al*., 1998a; Cáceres-Martínez *et al*., 1999; Sato-Okoshi y Takatsuka, 2001; Tinoco-Orta y Cáceres-Martínez, 2003; Cáceres-Martínez, 2003
C. gigas, C. corteziensis, M. californianus, M. galloprovincialis, C. fluctifraga, N. subnodosus, P. rostrata, Protothaca antiqua	Trematodos	Noroeste de México. Uruguay. Provincia de Chubut, Argentina	Por lo general no asociado a mortalidades	Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 1999, 2001, 2007; Cremonte *et al*., 2005a; Cremonte *et al*., 2005b
Amiantis purpurata T. plebeius, P. antiqua	Digeneos: Monorchiidae Fellodistomidae Gymnophallidae	Provincia de Buenos Aires y Provincia de Chubut, Argentina	No asociado a mortalidades	Cremonte *et al*., 2001; Vázquez *et al*., 2006; Cremonte *et al*., 2005a
A. ventricosus, N. subnodosus, T. plebeius	Nematodos *Echinocephalus* sp. Spirurina	Baja California Sur, México. Provincia de Buenos Aires, Argentina	No asociado a mortalidades	Gómez del Prado, 1982; Vázquez *et al*., 2006
A. ventricosus, A. purpuratus A. tehuelchus, P. antiqua	Céstodos Oncobothriidae? Phillobotriinae? Tetraphyilidea, *Rhinebothrium* sp.	Norte de Chile. Baja California Sur, México. Provincia de Chubut, Argentina	No asociado a mortalidades	Oliva, 1986; Garduño, 1999; Cremonte *et al*., 2005a, Oliva y Sánchez, 2005
C. corteziensis, N. subnodosus, Argopecten ventricosus, M. mactroides	Planarias Hypotrichinidae	Baja California Sur, Nayarit, México. Provincia de Buenos Aires, Argentina	No asociado a mortalidades	Garduño, 1999; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001, 2007; Cremonte y Figueras, 2004
Crassostrea virginica	*Perkinsus marinus*	Golfo de México	Asociado a mortalidades	Burreson *et al*., 1994; Román-Magaña, 2002
P. rostrata	*Perkinsus olseni*	Uruguay	Asociado a severas infiltraciones hemocíticas	Cremonte *et al*., 2005b
T. chilensis O. puelchana	*Bonamia* sp.	Chile. Provincia de Río Negro, Argentina	Posiblemente asociado a mortalidades	Kern, 1993; Campalans *et al*., 2000; Kroeck y Montes, 2005
T. chilensis	Microcélulas de Haplosporidio	Chile	¿	Campalans *et al*., 2000
C. gigas, C.corteziensis	Ciliados tipo *Ancistrocoma*	Noroeste de México	No asociado a mortalidades	Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans 2001, 2007.
C. gigas, C.corteziensis, Nodipecten subnodosus, Mesodesma mactroides, A. purpuratus, Tagelus plebeius, A. tehuelchus	Ciliados tipo *Trichodina*	Noroeste de México. Bahía de Tongoy, Chile. Provincia de Chubut, Provincia de Buenos Aires, Argentina	Por lo general no asociado a mortalidades	Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001; Lohrmann *et al*., 2002; Cremonte y Figueras, 2004; Fiori *et al*., 2004; Cáceres-Martínez, 2006; Vázquez *et al*., 2006
M. mactroides	Gregarinas	Provincia de Buenos Aires, Argentina	No asociada a mortalidades	Cremonte y Figueras, 2004
C. Corteziensis, M. Californianus, M. galloprovincialis, C. fluctifraga, P. rostrata, A. tehuelchus, Pododesmus rudis	Gregarinas tipo *Nematopsis*	Baja California, Sonora, Nayarit, México. Uruguay. Provincia Chubut, Argentina	No asociado a mortalidades	Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001; Cáceres-Martínez, 2004; Cremonte *et al*., 2005a; Cremonte *et al*., 2005b

2.5 Probióticos

La administración de antibióticos como control patogénico en la acuicultura ha sido descartada debido a la generación de resistencia por parte de los microorganismos patógenos en el hospedante (Inglis, 2000; Defoirdt *et al.,* 2007). El abuso de los antibióticos hace inefectivos los tratamientos, eleva costos de producción y representa un riesgo ambiental debido a su potencial efecto sobre la microbiota normal en el ambiente o dentro del hospedero (Goh *et al.*, 2002; Holmström *et al*., 2003). Ya que los antibióticos pueden permanecer activos por largos períodos en el agua o sedimentos, puede dar lugar a la generación de bacterias resistentes, algunas patógenas para los organismos de cultivo e incluso para el ser humano (Navarrete y Caruffo, 2015). Además, el uso de antibióticos puede reducir la tasa de crecimiento de los organismos cultivados, y afecta la palatibilidad del producto debido a la bioacumulación y magnificación del medicamento (Nwachi, 2013).

El uso de microorganismos probióticos ofrece una amplia expectativa para la generación de nuevo conocimiento, potencialmente aplicable en procesos industriales y de producción acuícola. En diversos estudios se han demostrado los beneficios de la administración de bacterias probióticas por su impacto positivo en diversos procesos metabólicos y como inmunomoduladores, lo cual se traduce en incrementos en peso y mayor supervivencia del hospedero (Sánchez-Ortiz, 2009).

Para poder establecer los mejores o más eficientes criterios de selección de un probiótico, es necesario primero entender sus mecanismos de acción, el modelo al cuál se desea enfocar su actividad, el método de producción y procesamiento así como de administración al hospedero modelo. Es muy importante cosiderar la bioseguridad y la ubicación dentro del hospedero en la que se espera que el probiótico lleve a cabo su acción (Gómez-Gil *et al*., 2000).

En la figura 5 se muestra un esquema presentado por Harris (1993) en el que se muestran las posibles interacciones que pueden darse en un ambiente acuático, cuando una bacteria entra al TGI de su hospedero. El método de acción más popular como criterio de selección de un probiótico es la exclusión competitiva o por producción de agentes antimicrobianos para el control de agentes patógenos. Otros métodos de acción esquematizados y abordados en diversos estudios evalúan la capacidad de producción de enzimas extracelulares que puedan incrementar la digestibilidad del hospedero, y en menor medida el aporte nutricional del microorganismo ya sea como fuente de nitrógeno o por su producción de metabolitos tales como vitaminas que puedan ser absorbidas por el hospedero de interés.

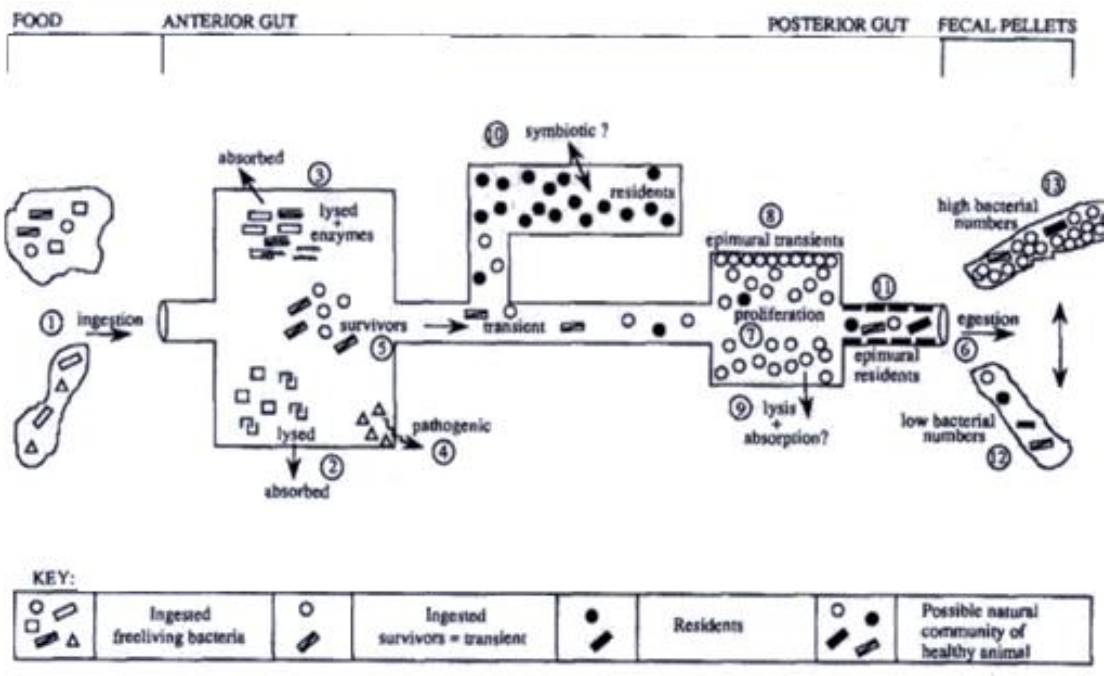


Figura 5.- Tipo de asociaciones bacteria-invertebrado acuático. Fuente: Harris (1993).

Como menciona Farzanfar (2006), el propósito de los probióticos es generar una relación benéfica entre el microorganismo y el hospedero, y una relación útil entre el probiótico y la microflora patogénica en los órganos digestivos del hospedero. Se espera que un buen probiótico cumpla con alguna o varias de las siguientes propiedades (Farzanfar, 2006; Zhou *et al.,* 2009):

1) Antagonismo con patógenos por exclusión competitiva o por la producción de antimicrobianos tales como bacteriocinas, ácido orgánicos, peróxido de hidrógeno y lisozima. También pueden estimular la respuesta inmune del hospedero, incrementando su resistencia ante los agentes causales de las principales enfermedades.

2) Producción de ácido láctico, acético o propiónico puede disminuir el pH intestinal, permitiendo a la bacteria dominar en el ambiente intestinal.

3) Producción de metabolitos que disminuyan el amonio no ionizado NH_3 y el amonio en intestino.

4) Producción de sustancias de interés nutricional tales como biotina y vitamina B_{12} para promover el crecimiento del hospedero.

5) Capacidad de sobrevivir y colonizar el TGI del hospedero por adhesión, el cuál es uno de los más importantes criterios de selección para las bacterias probióticas.

6) Estabilidad por largos períodos de almacenamiento.

7) Inocuidad tanto para el hospedero como para el humano, como consumidor final, por lo que no deben ocasionar efectos secundarios adversos por patogenicidad o toxicidad tanto en el hospedero como en su entorno.

8) Provenir de especies animales, considerando el hábitat original de las bacterias seleccionadas por razones ecológicas.

Gómez-Gil *et al.* (2000) proponen un proceso de seis pasos como método generalizado para la selección de un agente probiótico para larvicultura de animales acuáticos:

1) Revisión bibliográfica,
2) Adquisición (aislamiento) de la cepa potencialmente probiótica,
3) Valoración de la patogenicidad de la cepa potencialmente probiótica,
4) Evaluación de su capacidad inhibitoria ante cepas patogénicas,
5) Evaluación en las larvas de la especie hospedera objetivo, y
6) Análisis económico costo-beneficio de su producción y aplicación.

En la figura 6 se muestra, de manera más detallada, el proceso de evaluación de un probiótico, teniendo al ser humano como consumidor final. Para asegurar la eficacia y seguridad del producto final, se define una serie de parámetros considerados necesarios por el Concilio de Investigación Médica de la India (ICMR, por sus siglas en inglés).

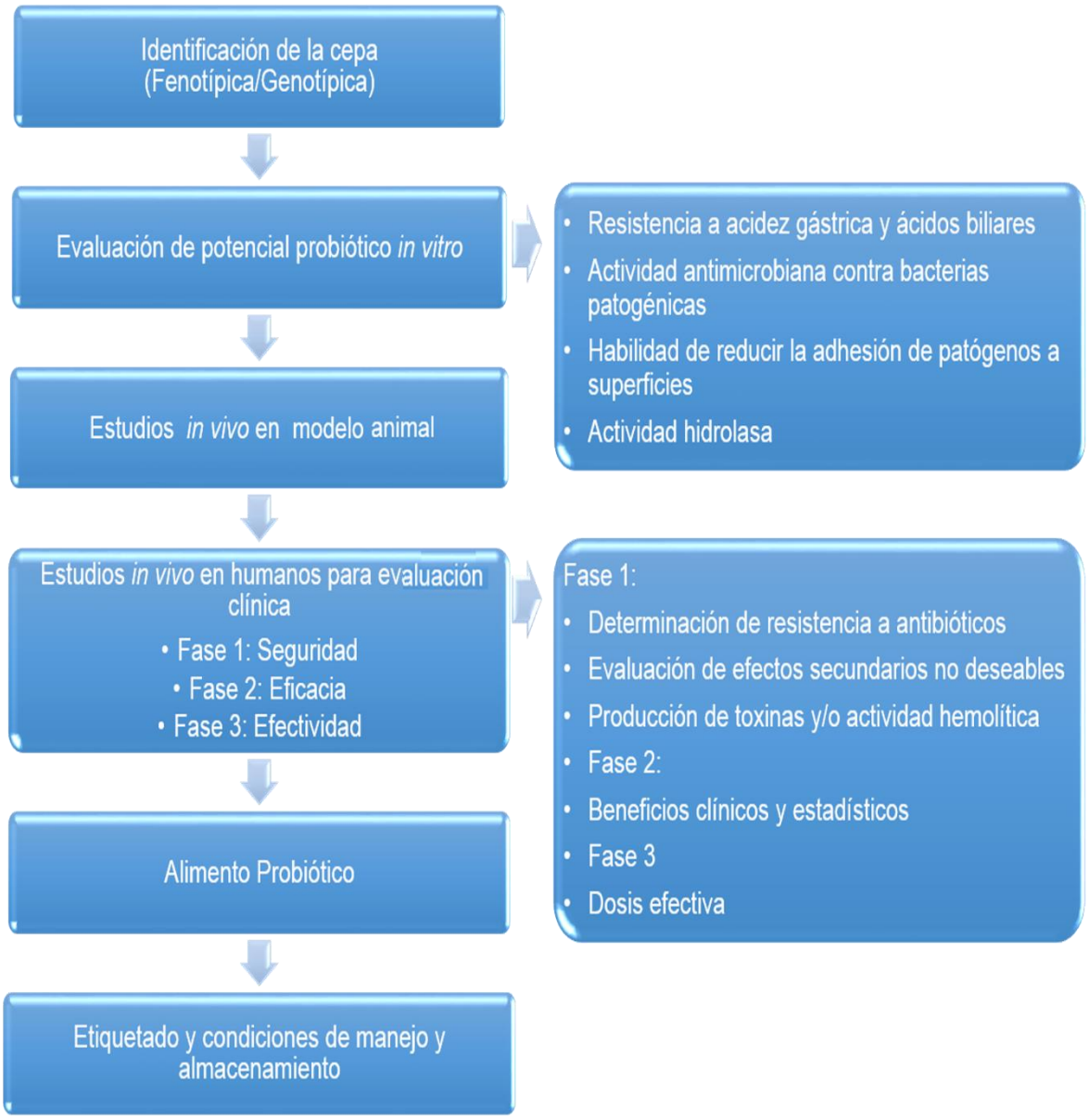


Figura 6.- Guía esquematizada para la evaluación de probióticos en alimentos para consumo humano. Fuente: Ganguly *et al.* (2011).

2.6 Uso de probióticos en crustáceos

Por sus potenciales beneficios, la introducción de probióticos en los sistemas productivos acuícolas se ha extendido y su uso como complementos dietéticos para la alimentación de diversas especies de camarones peneidos va ganando terreno. Los resultados obtenidos, importantes aunque variables, han tenido un gran impacto a nivel mundial, lo que ha provocado la ampliación y especificidad de las investigaciones dedicadas a formular nuevas dietas enriquecidas, que incrementen la ganancia en peso de los camarones y por ende, una mayor productividad y rentabilidad de la industria camaronícola mundial.

Rengpipat *et al.* (1998) emplearon dietas adicionadas con *Bacillus* sp. para la alimentación de camarón *P. monodon*, encontrando que los grupos alimentados con el probiótico mostraron un incremento en peso y supervivencia, pero además comprobaron que la presencia del microorganismo probiótico en el intestino de los camarones impidió la infección por *Vibrio harveyi*.

Ochoa-Solano y Olmos-Soto (2006) comprobaron los efectos probióticos de *B. subtilis*, al incluirlo en un alimento para camarón, mejorando el factor de conversión alimenticio (FCA). Con este trabajo se demostró que *B. subtilis* ayuda al hospedero a incrementar su resistencia al estrés.

Wang (2007) probó los efectos de una dieta adicionada con bacterias probióticas en el crecimiento de *P. vannamei*. En dicha dieta se incorporaron cantidades iguales de *Rhodobacter sphaeroides* y *Bacillus* sp. El autor reporta un incremento en el peso final de los camarones alimentados con esa dieta enriquecida con el probiótico bacteriano, así como un incremento en la actividad enzimática intestinal asociada a una mayor actividad de proteasas, amilasas, celulasas y lipasas, con un potencial efecto positivo en la digestibilidad y asimilación del alimento proprocionado.

Aspergillus oryzae ha sido probada por su efecto favorable sobre la digestión debido a la producción de enzimas amilolíticas y proteolíticas, pero también se menciona su efecto hipocolesterolémico, además de que puede modular la microflora intestinal del hospedero actuando como sustrato para bacterias favorables (Lee *et al.*, 2006).

Rengpipat *et al.* (2000) encontraron un incremento en la actividad fenoloxidasa y antibacterial en camarones (*P. monodon*) tratados con una bacteria aislada del TGI de la misma especie. Los autores realizaron un reto con el patógeno *V. harveyi,* encontrando un mayor porcentaje de supervivencia en los camarones tratados con el probiótico y un incremento en la respuesta inmune tanto humoral como celular. Cabe resaltar que las diferencias fueron significativas sólo después de 10 días de tratamiento después de la infección con el patógeno y que no encontraron efectos sobre la calidad del agua de cultivo.

Powedchagun *et al.* (2011) caracterizaron una cepa aislada del TGI de *P. monodon* con un porcentaje de similitud del 99.9% con *B. subtilis.* La cepa presentó una alta capacidad de sobrevivir a un amplio rango de pH, temperatura y concentraciones de sal, además de la capacidad de producir esporas. Esto sugiere que es un buen candidato para ser empleado como probiótico en el cultivo de *P. monodon.*

Luis-Villaseñor *et al*. (2011) probaron el efecto de cuatro cepas no hemolíticas, con capacidad antagónica, de adhesión y crecimiento en mucus, aisladas del TGI de camarones sanos. Al aplicarlas en *L*. *vannamei,* encontraron una mayor supervivencia larvaria y una mayor tasa de desarrollo larvario.

Diversas especies de *Lactobacillus* han sido objeto de investigación como agentes probióticos por promover el crecimiento y por su capacidad de protección del organismo hospedero ante agentes patogénicos, esto por competencia y gracias a la producción de bacteriocinas (Pascual *et al.*, 1999; Reid y Burton, 2002; Suzer *et al*., 2008; Sánchez Ortiz *et al.*, 2013).

2.7 Uso de probióticos en moluscos bivalvos

La investigación sobre el uso de cepas probióticas se ha expandido hacia el cultivo de moluscos bivalvos, aunque aún hay pocos trabajos al respecto. El género *Vibrio* es uno de los principales agentes etiológicos responsables de altas tasas de mortalidad en los cultivos larvarios de moluscos bivalvos (Prado *et al.,* 2005). Por esta razón, se han realizado diversas investigaciones enfocadas a combatir o mitigar las pérdidas generadas por dicho patógeno. Una línea de investigación es el estudio de bacterias productoras de agentes con actividad antibacterial inhibitoria del crecimiento de diferentes especies de *Vibrio* (Ruiz-Ponte *et al*., 1999; Tiirola *et al*., 2002; Longeon *et al*., 2004; Gibson *et al.*, 2007).

Desde 1998 se reportan estudios sobre la capacidad de los probióticos para incrementar la supervivencia larval en moluscos infectados con *Vibrio,* al administrar una cepa de *Aeromonas media* en un cultivo larvario de *C. gigas* infectadas con *Vibrio tubiashii* (Gibson *et al*., 1998).

Dado que la mortalidad larvaria es uno de los principales focos rojos en el cultivo de moluscos marinos, Kesarcodi-Watson *et al.* (2009) evaluaron la supervivencia de larvas de *Perna canaliculus* ante una infección por *Vibrio,* administrando probióticos. El empleo de *Alteromonas macleodii* y *Neptunomonas* sp. incrementó la supervivencia larvaria en estos mejillones (Kesarcodi-watson *et al.*, 2010). La acción probiótica de estas especies se ha comprobado en cultivos larvarios de *C. gigas, Ostrea edulis* y *Pecten maximus*, junto con la administración de *Pseudoalteromonas* y *Phaeobacter gallaeciensis* (Kesarcodi-Watson *et al*., 2012b). También se evaluó el efecto de la mezcla de dichas bacterias probióticas en la supervivencia larvaria de *P. canaliculus* (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2012a).

Prado *et al.* (2009) encontraron cepas aisladas de cultivos de moluscos bivalvos, pertenecientes al género *Phaeobacter* con un elevado potencial probiótico debido a su capacidad inhibitoria ante tres especies de *Vibrio*

identificadas como patógenos de larvas, a diferencia de otras cepas aisladas del mismo medio que tan sólo lograron inhibir al menos una especie de *Vibrio.*

El uso de probióticos en el cultivo de moluscos ofrece amplias posibilidades para la acuicultura (Campa-Córdova *et al.,* 2009; Aguilar-Macías *et al.*, 2010; Campa-Córdova *et al.*, 2011; Abasolo-Pacheco *et al.*, 2015). Sin embargo, aún son relativamente pocos los trabajos en este campo, enfocados a incrementar la supervivencia larval y actividad antimicrobiana (Tabla III).

Aguilar-Macías *et al*. (2010) probaron el uso de una cepa de *Lactobacillus* sp., *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura marina *Yarrowia lipolytica* en el cultivo de juveniles de *Pinctada mazatlanica.* Los autores encontraron que, al administrar los microorganismos, se presentó una mayor supervivencia y crecimiento a diferencia del grupo control no tratado con ningún aditivo probiótico, de un grupo tratado con antibiótico y uno más tratado con un probiótico comercial. El mayor crecimiento y supervivencia lo encontraron al administrar la cepa de *Lactobacillus* sp.

Campa-Córdova *et al*. (2011) probaron el potencial probiótico de una bacteria ácido láctica y una mezcla de bacilos en la supervivencia y crecimiento larvario de *C. corteziensis*, encontrando mayor supervivencia con la mezcla de bacilos que con la bacteria ácido láctica, y que ambos tratamientos fueron mejores que los obtenidos en el grupo control, al cuál no se le administró ningún agente probiótico.

Además del mejoramiento en la producción acuícola de moluscos bivalvos, el uso de probióticos puede modular una microbiota no patogénica, lo que sugiere una potencial aplicación como biocontrol, para control de sanidad, en la comercialización de moluscos bivalvos (Teplitski *et al.*, 2009).

Tabla III.- Revisión tomada de Prado *et al.* (2010) acerca de algunos ensayos realizados con probióticos en cultivos larvarios de bivalvos.

Autor	Año	Probiótico	Efecto	Especie Blanco
Lodeiros *et al.*	1989	*Flavobacterium* sp. P14	Actividad antibacterial	*Pecten ziczac*
Douillet y Langdon	1993	*Alteromonas* sp. CA2	Incremento de tasa de crecimiento	*C. gigas*
			Incremento de supervivencia	
Douillet y Langdon	1994	*Alteromonas* sp. CA2	Incremento de tasa de crecimiento	*C. gigas*
Riquelme *et al.*	1996	*Alt. Haloplanktis*	Proteccion contra infección	*Argopecten purpuratus*
		INH	Actividad antibacterial (*Vibrio anguillarum*)	
Riquelme *et al.*	1997	*Pseudomonas* sp. 11	Proteccion contra infección	*A. purpuratus*
			Actividad antibacterial (*Vibrio anguillarum*)	
		Vibrio sp. C33	Incremento de supervivencia	*A. purpuratus*
			Actividad antibacterial (*Vibrio anguillarum*)	
Gibson *et al.*	1998	*Aeromonas media* A199	Incremento de supervivencia	*C. gigas*
			Actividad antibacterial (*Vibrio tuibiashii*)	
Avendaño y Riquelme	1999	*Vibrio* sp. C33	Actividad antibacterial (*Vibrio anguillarum*)	*A. purpuratus*
Nakamura *et al.*	1999	S21	Incremento de supervivencia	*C. gigas*
			Actividad antibacterial (*Vibrio alginolyticus*)	
Ruiz-Ponte *et al.*	1999	*Roseobacter gallaeciensis*	Incremento de supervivencia	*Pecten maximus*
		BS107	Actividad antibacterial (*Vibrio pectinicida*)	
Riquelme *et al.*	2001	*Vibrio* sp. C23	Incremento de supervivencia	*A. purpuratus*
		Pseudomonas s. 11		
		Bacillus sp. B2		
Longeon *et al.*	2004	*Pseudoaltermononas* sp.	Incremento de supervivencia	*P. maximus*
		X153	Decremento en la tasa de crecimiento	
Prado	2006	*Phaeobacter gallaeciensis*	Incremento de supervivencia	*Ostrea edulis*
		154	Actividad antibacterial	

3 JUSTIFICACIÓN

Se ha documentado que la microbiota del tracto gastrointestinal de los organismos marinos ejerce un papel fundamental facilitando la digestión del hospedero y regulando la infección por bacterias patógenas. Sin embargo, este tipo de estudios en moluscos bivalvos es, hasta la fecha, muy limitado, y más aún para el caso específico de la pata de mula *A. tuberculosa*. Para esta especie no existen estudios que describan su microbiota natural, por lo que resulta de gran interés la generación de nuevo conocimiento sobre esta especie comercialmente importante en el Pacífico mexicano.

El estudio de la microbiota se ha centrado fundamentalmente en la búsqueda de microorganismos con potencial probiótico para uso acuícola, ya que la FAO recomienda que los organismos a emplear como probióticos provengan del mismo medio que los organismos a los que se aplique, en este caso del medio marino.

Los probióticos ofrecen una alternativa amigable con el ambiente, con bajo costo de producción, que permite mejorar el estado de salud de los organismos en cultivo, evitando o mitigando infecciones por patógenos, evitando el uso de antibióticos y reduciendo la mortalidad.

Las condiciones ambientales a las que se enfrenta la Pata de Mula sugieren que su microbiota residente del TD sea especializada para un ambiente tan particular por sus condiciones extremas y estresantes. Por esta razón, resulta de gran interés su caracterización *in vitro* y su evaluación *in vivo* para el aprovechamiento de sus potenciales capacidades probióticas en otras especies de cultivo, incluyendo moluscos y crustáceos de interés acuícola comercial.

4 HIPÓTESIS

Si el ambiente de manglar contiene una amplia diversidad bacteriana debido a la acumulación de materia orgánica, y si los moluscos son concentradores de la diversidad bacteriana del ambiente debido a su alta capacidad de filtración, entonces, en un molusco que habita en el ambiente de manglar, como lo es *A. tuberculosa*, habrá de encontrarse una amplia diversidad de grupos y especies bacterianas con distintos potenciales fisiológicos.

Si la comunidad microbiana presente en el TD de *A. tuberculosa* presenta amplias capacidades dadas por las condiciones ambientales a las que se enfrenta en el ambiente que se desarrollan, dichas capacidades podrán tener un efecto benéfico al ser aplicadas como probióticos en cultivos experimentales de otros invertebrados marinos como el camarón blanco *–L. vannamei-* y el ostión Kumamoto *-Crassostrea sikamea-*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar, caracterizar y evaluar bacterias del tracto digestivo (TD) de *Anadara tuberculosa* y determinar su potencial probiótico en el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1) Aislar, identificar y caracterizar la microbiota presente en el TD de *A. tuberculosa*.
2) Evaluar *in vitro* el potencial probiótico de las bacterias aisladas del TD de *A. tuberculosa* de acuerdo a criterios de inocuidad, resistencia y beneficios potenciales de antagonismo y/o exclusión frente a patógenos y producción de enzimas exógenas.
3) Evaluar *in vivo* el potencial probiótico de bacterias previamente seleccionadas *in vitro*, en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) infectados con WSSV.
4) Evaluar el efecto de la interacción de bacterias seleccionadas por su potencial probiótico, con microalgas utilizadas como alimento vivo en el cultivo de moluscos bivalvos.
5) Evaluar *in vivo* el potencial probiótico de bacterias previamente seleccionadas *in vitro*, en semillas de ostión Kumamoto (*C. sikamea*), con reto final ante *Vibrio parahaemolyticus.*
6) Evaluar *in vivo* la capacidad de adhesión de bacterias seleccionadas por su potencial probiótico, en el TD de juveniles de *C. sikamea*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN *in vitro* E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

6.1.1 Sitios de colecta de *A. tuberculosa*

Se colectaron ejemplares adultos de *A. tuberculosa* en dos regiones con características estuarinas:1) Bahía Magdalena, La Paz, B.C.S. (BM) y 2) Bahía Navachiste, Guasave, Sinaloa (BN).

El material biológico del primer sitio de colecta fue recabado en la localidad Las Botellas, que forma parte del sistema lagunar Santo Domingo-Bahía Magdalena-Bahía Almejas (Figura 7). Este sitio forma parte de un humedal de ámbito marino-costero de sistema estuarino con subsistema intermareal de clase humedal arbustivo, perteneciente a los municipios de La Paz y Comondú, B.C.S.

En BM, se colectaron 60 adultos maduros de *A. tuberculosa*, con una longitud media de 57±5 mm; se tomaron las biometrías correspondientes: longitud, altura y anchura, y se transportaron en una hielera al laboratorio de patogénesis microbiana del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en La paz, B.C.S. (CIBNOR), donde se dividieron en tres grupos de 20 individuos cada uno. Un primer grupo (N= 20) fue procesado mediante disección a su llegada al laboratorio para separar el TD del resto del cuerpo blando. Los dos grupos restantes (2 y 3) fueron sometidos a un proceso de depuración en taras plásticas de 60 L de capacidad, con agua esterilizada y aireación constante, sin administración de alimento y con recambio total de agua cada 24 h, durante tres y cinco días, respectivamente.

Figura 7.- Macrolocalización del sitio de colecta que abarca el sistema lagunar Santo Domingo-Bahía Magdalena-Bahía Almejas (BM).

En el segundo sitio de colecta se obtuvieron cinco individuos maduros de talla similar a BM, provenientes de Bahía Navachiste (BN), Sinaloa (Figura 8), que fueron transportados en frío al laboratorio de acuicultura del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-IPN (CIIDIR) en Guasave, Sinaloa. Los organismos se procesaron de inmediato, sin depuración.

Figura 8.- Macrolocalización del sitio de colecta en la Bahía Navachiste en la ciudad de Guasave, Sinaloa, México.

6.1.2 Manejo de organismos y extracción del TD

Para ambas localidades, el material biológico se trabajó en condiciones estériles. Se lavó el exterior del organismo empleando un cepillo para eliminar cualquier sustrato adherido a la superficie de las valvas, posteriormente se enjuagó la superficie valvar con agua de mar estéril para después separar las valvas empleando material estéril de disección, cortando con un bisturí los músculos aductores para facilitar la extracción del organismo. Una vez extraído el cuerpo blando, se enjuagó una vez con etanol al 70% y por triplicado con agua de mar estéril para eliminar la microbiota adherida a la superficie. Se extrajo el TD completo de cada individuo, se homogeneizó por separado en 150 µL de solución

salina al 2.5%, empleando pistilos estériles, y posteriormente se agregaron 150 µL más de la misma solución para terminar de homogeneizar.

6.1.3 Aislamiento de bacterias

A partir de los homogeneizados de TD de los tres grupos de moluscos colectados en BM, se inocularon 150 µL en placas Petri conteniendo medios sólidos no selectivos por el método de dispersión: TSA (BIOXON 211670), LB (DIFCO 244520), Medio Marino 2216 (DIFCO 279110); y selectivos: MRS (FLUKA 69964), Rogosa (DIFCO 248020), YPD (DIFCO 242820), YM (DIFCO 271210), MacConkey (DIFCO 212123) y TCBS (DIFCO 265020). Cada muestra se inoculó por duplicado en cada medio y se incubó a 37 °C. De la misma manera se inocularon los mismos medios por duplicado para su incubación en condiciones anaeróbicas a 30 °C.

Una parte del homogeneizado de TD de los moluscos provenientes de BN se inoculó por duplicado (100 µL) en cajas Petri conteniendo medio sólido MRS (2.5% NaCl) adicionado con azul de anilina (SIGMA 415049) (200 $mg \cdot L^{-1}$). El resto del homogeneizado se incubó a 80 °C durante 10 min y se inoculó por duplicado (100 µL) en cajas Petri conteniendo medio TSA (2.5% NaCl). Las cajas se incubaron a 30 °C. De las cajas con TSA se aislaron y purificaron todas las colonias encontradas por estría cruzada. De las cajas con medio MRS se aislaron y purificaron solamente aquellas colonias que mostraron una tonalidad azul a azul intenso.

Todas las cajas se observaron a las 24, 48, 72 h y a los 10 d de incubación. Se identificaron por valoración visual las distintas morfologías coloniales en cada caja y se picaron con un asa bacteriana para sembrarlas por el método de estrías cruzadas en cajas nuevas conteniendo el mismo medio de cultivo. Los aislados se incubaron durante 24 h, en anaerobiosis o aerobiosis según correspondiese, y pasado el tiempo de incubación se resembraron tres veces más aplicando el

mismo procedimiento y medio de cultivo, para obtener cultivos axénicos. A partir de los cultivos puros se realizaron cultivos masivos para preservar por separado cada una de las cepas aisladas a -80 °C en medio con glicerol al 15%.

6.1.4 Caracterización fenotípica

Los cultivos axénicos se describieron por sus características morfológicas coloniales a simple vista, y por su forma y tamaño celular bajo el microscopio mediante tinción Gram, empleando el kit comercial Golden Bell (Zapopan, Jalisco, Mexico, 82000), para determinar si se trataba de bacterias Gram (+) o Gram (-).

Con el fin de caracterizar las cepas aisladas y definir su potencial probiótico, se llevaron a cabo diferentes pruebas de valoración *in vitro*, aplicando los principales criterios de selección y parámetros de referencia (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009) que se describen a continuación:

a) Inocuidad tanto para el hospedero como para el consumidor final. Se apicaron las pruebas de hemólisis, catalasa y antibiograma;
b) Que ofrezca un beneficio al hospedero. Se determinó la capacidad antagónica con cepas patógenas y la capacidad de producir enzimas exógenas que pudiesen ayudar a la digestión del alimento;
c) Que la cepa no pierda su capacidad de ofrecer el beneficio y pueda llegar al sitio en donde actuará. Se evaluó la resistencia de cada cepa mediante las pruebas de crecimiento, conteo de UFC, concentración de NaCl, pH, y tolerancia al nitrógeno amoniacal (TAN). Se evaluó también la capacidad de adhesión de cada aislado, mediante las pruebas de hidrofobicidad, autoagregación y coagregación.

Siguiendo los criterios anteriores se realizó una selección *in vitro,* posteriormente se llevó a cabo la identificación molecular de las cepas seleccionadas y, finalmente, se evaluaron mediante en experimentos *in vivo.*

6.1.5 Actividad hemolítica en agar sangre

A partir de cultivos en TSB con 2.5% de NaCl y 24 h de crecimiento (centrifugado a 3900 rpm por 10 min y ajustado a pH 6.8-7.0), se obtuvieron 50 µL de sobrenadante de cada cepa y se sembraron en agar sangre (10% sangre humana) en pozos de 6 mm de diámetro. Se incubaron a 35 °C y se observaron a las 24 h. Se seleccionaron las cepas que no mostraron ningún halo, es decir, aquellas con hemólisis del tipo γ (no hemolíticas). Se descartaron las cepas que presentaron halo de degradación o hemólisis β (hemolíticas) y aquellas sin halo pero con coloración verdosa o con hemólisis α (con hemólisis parcial) (Cowan y Steel, 1993).

6.1.6 Actividad catalasa

Se midió la actividad catalasa por el método del portaobjetos colocando una asada de cada cepa (procedente de cultivos en medio agar, con 18-24 h de crecimiento) sobre un portaobjetos, dentro de una caja Petri. Se colocó una gota de H_2O_2 sobre la muestra, se cubrió con la tapa de la caja Petri y se observó sobre un fondo negro. La observación de efervescencia o la formación de burbujas en la placa se consideraron como los criterios indicadores de la presencia de catalasa (Cowan y Steel, 1993).

6.1.7 Antibiograma

Se realizó un antibiograma siguiendo la técnica de Bauer *et al.* (1966). Los cultivos seleccionados se incubaron en caldo TSB 2.5% NaCl durante 24 h a 37 °C y posteriormente se inocularon por dispersión en placas Petri con medio Muller Hinton. Con ayuda de pinzas estériles se colocaron diferentes sensidiscos con antibióticos: Ampicilina 10 ug, Penicillina-Estreptomicina 10 U, Bacitracina 10 U y Gentamicina, y después de incubar durante toda la noche ("o/n"), se midió el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de la cepa correspondiente.

6.1.8 Actividad antagónica

Para la selección de bacterias productoras de compuestos inhibidores se empleó el método descrito por Balcázar *et al*. (2007). Se emplearon 50 µL de cultivo (TSB 2.5% NaCl, "o/n"), de sobrenadante y de concentrado de células (obtenidos estos últimos centrifugando a 12000 × g por 10 min y filtrando el sobrenadante a 2 µm. Cada cepa se sembró por duplicado en orificios de 6 mm de diámetro en agar TSA 1% NaCl tapizado con *Vibrio* sp*.* de 24 h de crecimiento, empleando como control el medio sin inóculo. A las 24 h de incubación a 30 ºC se evaluaron los resultados midiendo el diámetro del halo de inhibición.

Basándose en la misma técnica, se realizaron orificios de 6 mm de diámetro en agar TSA 1% NaCl tapizado con *Vibrio* sp. de 24 h de crecimiento. Se rellenaron los espacios con agar suave TSA y sobre éste se sembraron las distintas cepas aisladas del TD de *A. tuberculosa* y se incubaron durante 24 h a 37 ºC, empleando como control medio TSB sin inóculo.

En cada caso se midió el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de *Vibrio* y el diámetro de crecimiento de cada cepa.

6.1.9 Capacidad enzimática

Para determinar la capacidad enzimática de las cepas aisladas se realizaron bioensayos para detectar la actividad hidrolítica de sustratos tipo proteínas, lípidos y carbohidratos. Se empleó el sobrenadante de cutivos en TSB 2.5% NaCl crecido “o/n” a 37 ºC y el concentrado celular del mismo, obtenidos al centrifugar los cultivos a 12,000 × g 10 min. El sobrenadante se filtró a 2 µm. El sobrenadante y el concentrado celular se sembraron en pozos, tal cual se describió con anterioridad (Balcázar *et al*., 2007). También se sembró una asada de cada cepa crecida “o/n” en medio agar a 37 °C, para la obtención de macrocolonias (Sánchez-Ortiz, 2009).

6.1.9.1 Prueba de degradación de proteínas

Se prepararon placas con medio TSA 1% NaCl adicionado con 2.5% de Skim Milk (v/v). Se realizaron perforaciones de 6 mm diámetro con un horadador estéril. Los pozos fueron inoculados y las placas incubadas según se describen anteriormente, utilizando como control el mismo medio de cultivo. Como parámetro de repuesta positiva a la prueba se midió el halo transparente formado alrededor de las colonias (Sánchez-Ortiz, 2009).

6.1.9.2 Prueba de degradación de carbohidratos

Se prepararon placas con medio Columbia el cuál contiene un 0.5% de almidón, se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro con un horadador estéril. Los pozos fueron inoculados y las placas incubadas de la manera previamente descrita. Pasadas 24 h de incubación se midió el halo de degradación en los aislados que dieron positivos para esta prueba. Para poder visualizar el halo

de degradación se colocó un grano de yodo dentro de la tapa sin agar de la caja Petri. La caja tapada se colocó por lapsos de tres segundos del lado sin agar sobre una plancha caliente para liberar los gases de yodo hasta teñir el medio (Sánchez-Ortiz, 2009).

6.1.9.3 Prueba de degradación de lípidos

Se prepararon placas con medio Spirit Blue adicionado con 2.5% de aceite de olivo v/v, se realizaron perforaciones de 6 mm diámetro con un horadador estéril. Los pozos fueron inoculados y las placas incubadas según lo descrito previamente. A las 24 h se midió el halo de degradación en las cepas, considerando como indicador la zona incolora formada alrededor de la colonia (Sánchez-Ortiz, 2009).

6.1.10 Hidrofobicidad

a) Prueba de hidrofobicidad con Rojo Congo

La hidrofobicidad se midió mediante la prueba de rojo Congo, sembrando cada cepa por triplicado por estría simple en medio TSA adicionado con 1% NaCl y 0.03% de Rojo Congo. Se observaron las cepas tras 24 h de incubación a 37 ºC considerando como resultado positivo para esta prueba una coloración rojiza y negativa una coloración de tono blanco a translúcido.

b) Prueba de hidrofobicidad por adhesión a solventes

La adhesión microbiana a solventes se midió de acuerdo al método propuesto por (Rosenberg *et al*., 1980). Se utilizó el solvente p-Xileno, debido a que la adhesión bacteriana a este solvente refleja el carácter hidrofóbico o hidrofílico de la superficie celular. Las bacterias se cultivaron en caldo “o/n” y se centrifugaron a

5000 × g, por 15 min. La biomasa se lavó un par de veces y se resuspendió en buffer PBS (NaCl, 137 mM; KCl, 2.7 Mm; Na2HPO4, 2 Mm; pH, 7.4) a OD_{600} de 1.0 ± 0.05 (A_0). Se agregó un mililitro de xileno a 3 mL de la suspensión celular. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se obtuvo un sistema de dos fases, el cual se mezcló en el vortex por 2 min. La fase acuosa se removió después de 20 min de incubación a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 600 nm (A_1). El porcentaje de adhesión bacteriana al solvente xileno se calculó como:

$$(1-A_1/A_0) \times 100 \qquad (1)$$

De la misma manera en que se probó la adhesión a un solvente apolar, el xileno, se probó la adhesión a un solvente polar ácido, como lo es el cloroformo, y a un solvente polar básico, para lo que se empleó acetato de etilo, para describir las propiedades donadoras o receptoras de electrones de la superficie celular de la bacteria (Xu *et al*., 2009).

6.1.11 Curva de crecimiento

Se realizó una curva estándar de crecimiento para cada cepa, inoculando 20 µL de cada aislado en 100 mL de caldo TSB 2.5% NaCl o MRS 2.5% NaCl y se midió la absorbancia de las muestras a 580 nm a las 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Se graficaron los resultados obtenidos para identificar cada una de las fases de crecimiento de las cepas y el tiempo en que alcanzan su fase estacionaria.

6.1.12 Conteo de UFC

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro en los cultivos de las cepas, se inocularon 10 µL de cada cepa de un cultivo “o/n”. Se tomó un mililitro de ese cultivo y se realizaron diluciones seriadas; se tomaron 100 µL de cada dilución y se sembraron por dispersión en placa en agar TSA 2.5% NaCl, cada cepa por duplicado. Se contó el número de colonias en cada dilución a las 24 h de incubación a 35 °C.

6.1.13 Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl y pH

Se inocularon por duplicado 20 µL de un cultivo “o/n” de cada cepa, en 10 mL de medio TSB en un gradiente de concentración de NaCl desde 0.5% (sin sal añadida) hasta 12%. Se empleó como control TSB 2.5% NaCl. Los tubos se incubaron a 35 °C durante 24 h al cabo de las cuáles se midió la absorbancia a 550 nm empleando un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, North Caroline, USA).

De la misma manera se midió la resistencia de los aislados al pH inoculando 20 µL de cada cultivo, por triplicado, en caldo TSB 2.5% NaCl en un rango de pH de 4 a 10 adicionando HCl 1N ó NaOH 1N. Se empleó TSB 2.5% NaCl como control (pH 6.5) y se midió la absorbancia a 550 nm.

6.1.14 Tolerancia al nitrógeno amoniacal (TAN)

A las cepas que presentaron hemólisis gamma e hidrofobicidad alta y media se les realizó la prueba de tolerancia al nitrógeno amoniacal siguiendo la técnica descrita por (Devaraja *et al.,* 2013). Se manejaron las siguientes concentraciones de nitrógeno amoniacal: 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50,

55, 60. 65, 70, 75, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 $\mu g \cdot L^{-1}$. Se inocularon 20 µL de un cultivo “o/n” de cada cepa en 10 mL de medio en tubos falcon de 15 mL, por triplicado, empleando TSB 2.5% NaCl como control. Se midió la absorbancia de cada muestra a las 24 h de incubación a 35°C a 580 nm en un lector de microplacas Multiskan GO 1.00.40 serie 1510-01282, empleando el software SkanIt 3.2.0.36 RE for Multiskan GO.

6.1.15 Autoagregación y coagregación

Se realizó la prueba de autoagregación y coagregación de acuerdo a Xu *et al*. (2009) para cada aislado preseleccionado, con cultivos “o/n” de las cepas seleccionadas y empleando una cepa de *Vibrio* sp. para la prueba de coagregación. Los cultivos se centrifugaron a 5000 × g durante 10 min, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en PBS a OD_{600} de 1.0 ± 0.05. Se tomaron 3 mL de cada cepa, se colocaron en tubos Falcon estériles de 15 mL y se mezclaron en vortex por 10 s. Todas las cepas se incubaron por triplicado a 37 °C y se midió la absorbancia a 600 nm cada hora durante 5 h. El porcentaje de autoagregación se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Autoagregación (\%)} = (1-A_{tn}/A_{t0}) \times 100 \qquad (2)$$

Para evaluar coagregación, se mezclaron volúmenes iguales de *Vibrio* con la cepa correspondiente, se mezcló en vórtex 10 s y se incubaron a 37 °C durante 2 h. después de dicho lapso se midió la absorbancia de cada mezcla a 600 nm y se calculó el porcentaje de coagregación con la siguiente fórmula:

$$\text{Coagregación (\%)} = [1-A_{mezcla}/ (A_{cepa}+A_{Vibrio})/2] \times 100 \qquad (3)$$

6.1.16 Identificación molecular

Para la identificación de los aislados seleccionados se llevó a cabo la amplificación del gen de la subunidad ribosomal 16S y de un espaciador interno del transcrito (ITS por sus siglas en inglés). Los primers utilizados para la amplificación fueron: F 27f 5'-AGAGTTTTGATCCTGGCTCAG- 3' y R 1492r 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT- 3' (Lane, 1991; Gómez-Doñate *et al*., 2012) y F G1-16S 5'-GAAGTCGTAACAAGC-3' y R L2-23S 5'-GGGTTTCCCCATTCGGA-3' (Breidt y Fleming, 1996; Kingcha *et al.,* 2012) a una concentración final de 0.2 mM. La mezcla de reacción para la PCR se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL en un volumen total de 25 µL, como sigue: 14 µL de H_2O; 2.5 µL de búfer de reacción 10×; 1.0 µL de dNTPs (10 mM cada uno; Promega); 2.5 µL de cada oligo (100 µM) y 0.5 µL de Taq polimerasa (5 $U \cdot \mu L^{-1}$; Promega). Se añadió 1 µL del DNA obtenido en la extracción. La amplificación se realizó en un termociclador Biometra Tpersonal (Whatman) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min para la extensión final. Los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis (incluido un marcador de peso molecular de 1kb) en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio, con luz UV. Las bandas de ADN obtenidas se cortaron y purificaron usando un kit de extracción de DNA (Qiagen, Alemania).

Con el fin de aumentar la cantidad de producto de PCR para amplificaciones débiles, las cepas fueron clonadas utilizando el sistema pGEM-T easy vector de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, WI). Los productos de la PCR y los plásmidos contiendo el vector con el fragmento de interés fueron enviados para su secuenciación a Servicios Genómicos CINVESTAV-LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato. Las secuencias obtenidas se compararon contra el banco de datos utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y se sometieron a la base de datos del GenBank

perteneciente al National Center for Biotechnology Information (NCBI) (número de acceso en la base de datos 1755621).

6.2 EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS BACTERIAS SELECCIONADAS EN CULTIVOS EXPERIMENTALES DE *L. vannamei*

6.2.1 Preparación de las cepas seleccionadas

Las cepas previamente seleccionadas se cultivaron “o/n” en el medio sólido correspondiente para su activación. Las cepas reactivadas se inocularon en 250 mL de caldo TSB 2.5%NaCl, y después de incubarse “o/n”, se centrifugaron suavemente, se lavaron con solución salina 2.5% o buffer PBS, y se resuspendieron a una DO_{600} de 1.0.

Los bioensayos con camarón blanco se llevaron a cabo en las instalaciones del edificio de Acuicultura del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, CIIDIR-IPN, unidad Guasave, Sinaloa.

6.2.2 Primer bioensayo con *L. vannamei*

Se evaluaron los potenciales probióticos aislados de *A. tuberculosa* en camarón (*L. vannamei*) dada su importancia económica y valor comercial para la acuicultura nacional.

La empresa "Acuícola Cuate Machado", Guasave, Sinaloa, México, proporcionó 180 camarones juveniles de 1.8±0.3 g que fueron trasladados al laboratorio de Acuicultura del CIIDIR-IPN en recipientes de plástico con aireación continua. Los organismos se aclimataron durante 24 h a temperatura ambiente y

aeración constante en tinas de 120 L de capacidad con 80 L de agua de mar filtrada a 20 µm. La salinidad fue ajustada progresivamente a 35 ups (unidades prácticas de salinidad) aumentando o disminuyendo a razón de 2 ups·h^{-1}.

6.2.2.1 Preparación del alimento

Las cepas seleccionadas de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas *in* vitro para su evaluación *in* vivo, fueron: MAt29 (*Enterococcus casseliflavus*), MAt35 (*Citrobacter koseri*), GAtB1 (*Bacillus subtilis* subesp. *subtilis*), GAtBAL7 (*Staphylococcus* sp.)

Se emplearon cultivos de 24 h en caldo MRS (para GAtBAL7) y TSB para el resto de las cepas seleccionadas, centrifugados a 3000 × g y lavados con agua salina 2% estéril. Cada cepa se resuspendió en la misma solución salina a una densidad óptica de 1.0. La bacteria correspondiente se mezcló con 200 µL de Dry Oil (DO, Innovaciones Acuícolas, Culiacán, México) como agente adherente, se adicionó por aspersión a razón de 10^6 UFC·g^{-1} de alimento comercial Camaronina® (Purina, 35% de proteína) y se dejó secar a temperatura ambiente. El alimento se preparó semanalmente y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

6.2.2.2 Diseño experimental

La evaluación *in vivo* se llevó a cabo durante un período de 28 d. Los camarones previamente aclimatados se distribuyeron en 18 tinas de plástico de 80 L de capacidad, a una densidad de 10 camarones·$tina^{-1}$. El diseño experimental incluyó seis tratamientos por triplicado: C (grupo control, sin adición de bacterias cultivadas), T1 (cepa MAt29), T2 (cepa MAt35), T3 (cepa GAtB1), T4 (cepa GAtBAL7), y T5 (mezcla de cepas 1: 1: 1: 1) (Tabla IV).

Tabla IV.- Diseño experimental aplicado en el bioensayo *in vivo* con *L. vannamei.* Se muestran las principales características de selección de las cepas. NA = no aplica, ND = no determinado.

Tratamiento	Aislado	Hemólisis	Hidrofobicidad	TAN
C	Control	NA	NA	NA
T1	MAt29	ɣ	Baja	ND
T2	MAt35	ɣ	Alta	Alta
T3	GAtB1	ɣ	Media	Alta
T4	GAtBAL7	ɣ	Media	Alta
T5	Mix 1:1:1:1	NA	NA	NA

El alimento se proporcionó a razón de 10% del peso corporal en animales de 1-4 g y posteriormente se redujo a 6.2% cuando los camarones alcanzaron un peso > 4-5 g. La cantidad correspondiente de alimento se ofreció en dos raciones (09:00 y 17:00 h). El alimento preparado con las bacterias seleccionadas se suministró cada 48 h y los días que no se aplicó alimento preparado, se utilizó el alimento comercial sin ningún aditivo a todos los tratamientos por igual.

Se monitoreó diariamente la temperatura. Cada tercer día se determinó el pH, salinidad y oxígeno disuelto en cada tina. Se determinaron nitritos, nitratos y amonio al inicio y final del experimento. Cada tercer día se limpió el fondo de cada tina por sifoneo para eliminar el exceso de detritos con reposición del agua extraída. Se realizaron recambios totales de agua cada cinco días.

6.2.2.3 Análisis de virus de mancha blanca (WSSV)

Para determinar la presencia de WSSV en los organismos, tanto al inicio como al final del experimento, y para valorar prevalencia del virus, se tomó una muestra de 100 mg de tejido de músculo abdominal y el primer pleópodo por cada camarón, con DNAzol (Invitrogen®). EL tejido se maceró con un pistilo estéril y se

incubó por 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el macerado se centrifugó a 12000 × g durante 10 min, se tomaron 300 μL del sobrenadante al cual se agregaron 600 μL de etanol absoluto frío. La mezcla se dejó reposar por 15 min con agitación constante y nuevamente se centrifugó a 10000 × g durante 5 min descartando el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 10000 × g durante 5 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla se secó en un termoblock a 55 °C y se resuspendió en 30 μL de agua Mili-Q. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

A partir del ADN extraído de las muestras de camarón, se verificó la presencia del virus de la mancha blanca mediante la amplificación del gen WSSV1 y WSSV2 por PCR anidado, empleando como control el gen GAPDH que codifica la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa el cual funciona como un control interno del DNA genómico del camarón (Tang *et al.,* 2000)

Los primers utilizados en cada caso fueron: WSSV1 out, WSSV2 out y WSSV1 in y WSSV2 in para el anidado, que amplifican un fragmento de 982 pb y 570 pb, respectivamente y para el gen GAPDH: GAPDH298F y GAPDH298R que codifican un fragmento de 298 pb (Tabla VIII).

Para la mezcla de PCR se emplearon: 2.5 μL de búfer de reacción 10X (Bioline), 1.0 μL de $MgCl_2$ (50 mM, Bioline), 0.5 μL de dNTPs (100 μM, Bioline), 0.5 μL de cada oligo (10 mM cada uno, Sigma-Genosys), 0.25 μL de Taq polimerasa (5 $U\mu \cdot L^{-1}$, Bioline) y 1 μL de DNA para un volumen total de 25 μL. La amplificación se realizó en un termociclador Tpersonal (Biometra) usando el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95 °C 4 min, 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C 4 min. Se verificó la amplificación en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. En el PCR anidado se redujo a 45 s el tiempo de polimerización a 72 °C.

6.2.2.4 Infección con WSSV

Se verificó la presencia del virus WSSV en el lote de los camarones empleados para el bioensayo. Adicionalmente, se realizaron dos refuerzos de carga viral los días 8 y 12 de cultivo, agregando 1 g a cada tina de un macerado de tejido muscular, branquias y pleópodos de camarones que resultaron positivos a WSSV con baja carga viral. El macerado se proporcionó por la mañana, a los camarones en ayuno y no se administró alimento los días de la infección.

Al concluir el bioensayo (28 d), se evaluaron los distintos parámetros de respuesta: supervivencia, crecimiento, prevalencia viral (WSSV e IHHNV), respuesta immune a partir de muestras de hemolinfa para conteo total de hemocitos (CTH), cuantificación de actividad fenoloxidasa (FO) y anión supróxido intracellular (ASO). Por el método descrito por Bradford (1976) se cuantificó la concentración de proteína (P) en plasma y sobrenadante de lisado de hemocitos (SLH).

6.2.2.5 Supervivencia y tasa de crecimiento específico

Diariamente se contabilizaron y se retiraron los organismos muertos. Se realizaron biometrías semanales para de ajustar la cantidad de alimento. Se pesaron todos los organismos restantes al final del experimento, calculando la tasa de crecimiento específico (TCE) en función de:

$$TCE\ (\%/día) = 100\ (\ln P_f - \ln P_i)/t \qquad (4)$$

Donde: P_f es el peso final, P_i el peso inicial y t es el número de días de cultivo (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006).

6.2.2.6 Respuesta inmune

Para determinar la respuesta inmune o capacidad inmunoestimuladora de las bacterias potencialmente probióticas, se utilizaron parámetros de respuesta celulares (conteo de hemocitos) y bioquímicos (concentración de anión superóxido y actividad fenoloxidasa).

Empleando jeringas para insulina se extrajo aproximadamente 200 mL de hemolinfa por camarón (27 G × 13 mm) por punción ventral en la zona del segundo par de pleópodos. Las jeringas se cargaron previamente con solución isotónica anticoagulante para camarón SIC-EDTA-Na_2 (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM + EDTA-Na_2 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm·kg^{-1}), previamente enfriada a 4 °C (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Esta solución se utilizó en proporción 2:1 (SIC-EDTA/hemolinfa v/v). La hemolinfa así tratada se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se dispuso para: conteo de hemocitos, cuantificación de actividad ASO, proFO, y FO y cuantificación de proteínas.

6.2.2.7 Conteo de hemocitos

Se realizó un hemograma a partir de tres muestras de cada tratamiento y sus réplicas, tomando 50 µL de la dilución correspondiente de hemolinfa que se mezclaron con 150 µL de formol 6 % (proporción 1:3). Los hemocitos presentes en la muestra se contabilizaron en una cámara Neubauer y el conteo total de hemocitos (CTH) se registró como células·mL^{-1}.

6.2.2.8 Anión Superóxido Intracelular

El anión superóxido (ASO) se cuantificó de acuerdo a Song y Hsieh (1994). Se tomaron 100 µL de hemolinfa de cada grupo y se centrifugó a 800 × g durante cinco min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó tres veces con HBSS y se tiñó con una solución NBT (0.3 % 100 µL) durante 30 min a 37 ºC. Pasado el tiempo se centrifugó brevemente, se eliminó la NBT y se añadió metanol absoluto. Se lavó tres veces con metanol al 70 %, se secó y se añadieron 120 µL de KOH más 140 µL de DMSO para disolver el formazán citoplasmático. Se realizó la lectura de absorbancia a 630 nm para cada tratamiento.

6.2.2.9 Actividad fenoloxidasa

La actividad profenoloxidasa (proFO) y fenoloxidasa (FO) se determinó de acuerdo a (Hernández-López *et al.*, 1996). A 50 µL de muestra, se le adicionaron 50 µL de búfer de cacodilato 10 mM, pH 7 y 50 µL de L-Dopa (3 $mg \cdot mL^{-1}$ en agua destilada). Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (aprox. 25 °C), posteriormente se adicionaron 800 µL de búfer de cacodilato y se determinó la absorbancia a 492 nm empleando cacodilato como control negativo. Para medir la actividad proFO se adicionó tripsina (0.1 $mg \cdot mL^{-1}$ en agua destilada) con el fin de convertirla en FO. La actividad total se expresó como actividad específica de la proteína, como el cambio en la absorbancia a 492 $nm \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ de proteína de cada camarón. La cantidad de proFO disponible en la muestra se calculó mediante:

$$FO + FO \text{ activada con tripsina} = FO \text{ total} \quad (5)$$

$$FO \text{ total} - FO = \text{proFO} \quad (6)$$

6.2.2.10 Proteínas totales

Para el cálculo de proteínas totales a partir de muestras de hemolinfa se aplicó la técnica de Bradford (1976); se utilizaron nueve camarones por tratamiento (tres por cada réplica) y cada muestra se evaluó por triplicado, acumulando un total de 27 mediciones por tratamiento. La hemolinfa se centrifugó a 800 × g durante 6 min a 4 °C y se almacenó a -80 °C. El paquete celular se lavó con 1 mL de SIC frío. La muestra lavada se centrifugó a 800 × g durante seis min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante. Al paquete celular se adicionaron 300 µL de búfer de cacodilatos 10 mM (pH 7) y se centrifugó a 14000 × g por 10 min a 4 °C, recuperándose el sobrenadante del lisado de hemocitos (SLH), el cual se guardó a -80 °C. Se hizo un pool de plasma y otro de SLH. Se realizaron las lecturas a 595 nm en placas de 96 pozos.

6.2.3 Segundo bioensayo con *L. vannamei*

A partir de los resultados obtenidos en el primer bioensayo con camarón blanco, se evaluó el potencial probiótico de cepas seleccionadas pero en este caso únicamente en forma de mezcla, a diferentes concentraciones.

6.2.3.1 Preparación del alimento

Para la segunda evaluación *in vivo* de las cepas seleccionadas *in vitro,* se utilizaron las cepas MAt32 (*B. licheniformis*), MAt43 (*B. subtilis*) y GAtB1 (subsp *B. subtilis* subesp*. subtilis*). Se preparó una mezcla de *Bacillus* spp. en proporción 1:1:1 a partir de cultivos en TSB 2.5% NaCl durante 24 h a 35 °C, centrifugados suavemente, lavados y resuspendidos con solución salina 2%. La estimación del número de bacterias viables para la inoculación del alimento se determinó basándose en el recuento de UFC·mL^{-1} de cada suspensión bacteriana con densidad óptica de 1.0. Semanalmente se mezcló la cantidad correspondiente de cada cepa con 200 µL de Dry Oil, se roció en el alimento comercial Camaronina®, se secó a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

6.2.3.2 Diseño experimental

Para este bioensayo, la evaluación se llevó a cabo durante un período de 32 d, utilizando camarones juveniles con un peso inicial promedio de 1.0 ±0.1 g, aclimatados durante 24 h según se describió en el primer bioensayo. Los camarones se distribuyeron aleatoriamente en 15 tinas de plástico de 80 L de capacidad llenados a ¾ partes de su capacidad con agua marina esterilizada, proporcionando aireación constante. Las tinas se dispusieron de acuerdo a los

tratamientos señalados en la Tabla V, con tres réplicas por tratamiento. Los camarones fueron alimentados dos veces al día a razón de 10-13% de su peso corporal, ajustando la cantidad de alimento de acuerdo a las biometrías realizadas semanalmente. El alimento preparado con la mezcla bacteriana se proporcionó cada 48 h, dando alimento comercial sin ningún aditivo a todos los tratamientos por igual los días que no se administró el alimento preparado.

Tabla V.- Concentración de mezcla de bacterias potencialmente probióticas administradas en el alimento durante el bioensayo *in vivo* con *L. vannamei.*

Tratamiento	**Concentración de bacteria (UFC·gr^{-1} de alimento)**
C	Sin bacteria (Control)
T1	1×10^6
T2	2×10^6
T3	4×10^6
T4	6×10^6

Al igual que en el bioensayo anterior, se realizaron cambios totales de agua cada cinco días y sifoneo cada tres días para eliminar los detritos del fondo, compensando las pérdidas de agua por evaporación y del agua extraída por el sifoneo. Se monitoreó diariamente la temperatura y cada tercer día se determinó el pH, salinidad y oxígeno disuelto. Al término del bioensayo (32 d) se midió supervivencia y crecimiento.

6.2.3.3 Supervivencia y Crecimiento

El peso individual de los camarones se midió al principio y al final del ensayo con el fin de obtener un crecimiento absoluto y tasa de crecimiento específico.

El crecimiento absoluto (CA) se calculó como:

$$CA\ (g) = Pf\text{-}Pi \qquad (7)$$

Para la tasa de crecimiento específico (TCE) se empleó la misma fórmula utilizada en el primer bioensayo con camarón en el que se emplearon las cepas individuales y una mezcla.

6.2.3.4 Análisis de virus de mancha blanca (WSSV) e IHHNV

Al inicio del bioensayo, se tomaron 30 muestras de ADN a partir de pleópodo y branquia del lote experimental de camarones, utilizando DNAzol (Invitrogen) con el fin de detectar la presencia viral por PCR convencional para IHHNV y PCR anidado para WSSV. El gen GAPDH se utilizó para confirmar los resultados negativos. Del mismo modo, al final del bioensayo, se tomaron muestras de ADN de pleópodo y branquia de cuatro camarones por cada unidad experimental para detectar la prevalencia viral. La mezcla de PCR utilizada fue: 2.5 µL Buffer 10×, $MgCl_2$ 50 mM 1.0 µL, 0.50 µL dNTP's 10 mM, 0.50 µL cada primer (sentido y contrasentido), 0.25 µL Taq 5 u, para un volumen final de 25 µL. Para IHHNV, WSSV y GAPDH, se añadió 100 ng de ADN, y para la PCR anidada

(WSSV in), se utilizó 1 µL de producto de PCR. La amplificación génica se realizó en un termociclador Tpersonal (Biometra).

Los primers utilizados se muestran en la Tabla VIII y el protocolo de amplificación en la Tabla VII.

6.2.3.5 Infección con WSSV

Adicionalmente a la carga viral inicial, se realizó una reinfección (refuerzo viral) los días 12 y 24 del experimento, agregando 0.25 g a cada unidad experimental, de un inóculo viral consistente en un macerado de tejido muscular, branquias y pleópodos de muestras de camarones que resultaron positivos al virus WSSV con baja carga viral. El macerado se suministró a los camarones en ayuno y no se proporcionó alimento a los camarones los días de la infección.

6.2.3.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Al final de los 32 días se tomaron dos muestras de hemolinfa de camarones por cada unidad experimental. Se emplearon jeringas previamente cargadas con 600µL de anticoagulante (27 mM citrato trisódico, NaCl 385 mM, glucosa 115 mM, pH 7.5) frío, que se utilizaron para extraer 100 µL de hemolinfa de cada camarón, para formar dos pools de hemolinfa por tina, seis por tratamiento, para un total de 30 muestras. La hemolinfa se centrifugó a 800 ×g durante 10 min a 4 °C y se lavó con 250 µL de anticoagulante frío. Los hemocitos se suspendieron en 300 µL de Trizol preenfriado Reagent® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se almacenaron a -80 ° C hasta su uso.

Se tomaron muestras de hepatopáncreas de dos camarones por tina y se colocaron individualmente en 600 µL de Trizol preenfriado y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La extracción de ARN de hemocitos y hepatopáncreas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN total extraído se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm.

Para la síntesis de ADNc, se utilizaron 5 µL de RNA (20 $ng \cdot \mu L^{-1}$) para la PCR con transcriptasa inversa (Improm II, Promega®, Madison, WI, EE.UU.) con el primer DT_{20}, se añadieron 130 µL de agua ultrapura para un volumen total de 150 µL de ADNc. La síntesis de ADNc se comprobó por amplificación del gen β-actina (Tabla VIII).

6.2.3.7 Expresión génica por qRT-PCR

Las amplificaciones se realizaron en un equipo CFX96 Touch Real-Time (Bio-Rad®) con el software CFX Gerente Bio-Rad® Versión 2.1. Se emplearon placas de 96 pocillos con 15 µL de volumen final, conteniendo 7.5 µL de PCR Master Mix [(búfer 1.5 µL 10×, 0.75 µL $MgCl_2$ 50 mM, 0.3 µL dNTPs 10 mM, 0.75 µL EvaGreen® 20× (Biotium, Hayward, CA, EE.UU.), 0.1 µL Biolase DNA polimerasa 5 $U \cdot \mu L^{-1}$ (BiolineTM, Taunton, MA, EE.UU.)], 0.35 µL de cada primer 10 mM (Sigma® Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), (Tabla VIII) y 5 µL de ADNc.

Condiciones del termociclador para la qPCR: desnaturalización a 95 °C por 5 min, 45 ciclos a 95 °C por 5 s, 60 °C por 10 s y un paso final de variación de temperatura de 65 °C a 90 °C con un incremento de 0.5 °C por 5 s. Después de la amplificación se realizó un análisis de la curva de disociación (Melt step) usando el software iCycler iQ Optical System Software, Bio-Rad para confirmar el producto amplificado.

Para comprobar que todos los primers amplificarían con el ADNc sintetizado, se realizó una prueba en qPCR para cada par de primers (Tabla VIII) (para hemocitos y hepatopáncreas) empleando un pool de 5 µL de cada ADNc (30 de hemocitos + 30 de hepatopáncreas).

Después de comprobar que todos los primers amplificaronn con el ADNc sintetizado, se realizaron las curvas de calibración para cada gen empleando cinco diluciones seriadas del mismo pool de ADNc empleado para la prueba de amplificación.

En base a los valores de Treshold y la pendiente obtenida en las curvas de calibración con eficiencia cercana a 100% (90-105%) y R^2 igual o cercana a 1, se realizaron las qPCR para cada gen, con cada cDNA individual por triplicado.

Se amplificaron cuatro genes de referencia: β-actina, EFα, L21 y 40S-S24, y se analizaron con la aplicación web RefFinder (http://www.leonxie.com/referencegene.php), utilizando los algoritmos GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) para determinar su estabilidad. La expresión relativa se calculó de acuerdo a Vandesompele *et al*. 2002.

Gen blanco / Media geométrica de los genes de referencia RQ (8)

Donde RQ = cantidades relativas, se obtuvo a partir de:

$$RQij = E\,[(Cq\ media) - Cq\ (ij)] \quad (9)$$

Donde E representa la eficiencia de genes específicos calculado a partir de una pendiente de cinco diluciones en serie (factor de dilución 5) de un pool de cDNA [E=10 (-1/pendiente)-1] · [(Cq media-Cq (ij)] que representa la diferencia absoluta para cada muestra Cq contra la media Cq en el conjunto de datos para cada gen.

Tabla VI.- Mezcla de PCR empleada para los genes analizados en PCR punto final.

	1× (µL)	
	WSSV Sencillo/ IHHNV/ GAPDH	WSSV Anidado
Buffer 10x	2.50	2.50
$MgCl_2$ 50mM	1.00	1.00
dNTP´s 10mM	0.50	0.50
Primer Forward	0.50	0.50
Primer Reverse	0.50	0.50
Taq 5 $U \cdot \mu L^{-1}$	0.25	0.25
H2O	14.75	18.75
	100 ng de DNA	1 µL de producto de PCR sencillo
VF	25.00	25.00

Tabla VII.- Protocolo de amplificación para los genes analizados en PCR punto final.

PCR		Tm	WSSV Out	WSSV In	Tm	IHHNV	Tm	GAPDH	Tm	β-actina
1×	95		4´	4´		4´		3´		2´
	94		1´	1´		30´´		30´´		40´´
35×		58	1´	1´	60	30´´	55	30´´	55	45´´
	72		1´	45´´		30´´		45´´		40´´
1×	72		4´	4´		4´		3´		4´
1×	10									

Tabla VIII.- Primers empleados para la amplificación de todos los genes analizados en *L. vannamei* tanto por PCR punto final como para PCR cuantitativa (qPCR).

PCR punto final

Tejido	Gen blanco	Sequencias 5´-3´	Referencia
Branquias y pleópodo	WSSV Out	F ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC	Kimura et al., 1996
		R GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT	
	WSSV In	F TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC	Kimura *et al.,* 1996
		R TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG	
	IHHNV	F GGG CGA ACC AGA ATC ACT TA	OIE, 2004
		R ATC CGG AGG AAT CTG ATG TG	
	GAPDH	F TCA CCG TCT TCA ACG AGA TG	Tang *et al.,* 2000
		R ACC CTC CAG CAT CTC GAA CT	
qPCR			
Tejido	Gen blanco		Referencia
Hemocitos	Superóxido dismutasa	F ATC CAC CAC ACA AAG CAT CA	Wang *et al.*, 2010
		R AGC TCT CGT CAA TGG CTT GT	
	Profenoloxidasa	F GAG ATC GCA AGG GAG AAC TG	Wang *et al.,* 2010
		R CGT CAG TGA AGT CGA GAC CA	
	LvToll	F ATG TGC GTG CGG ATA CAT TA	Wang *et al.,* 2010
		R GGG TGT TGG ATG TCG AGA GT	
	Transglutaminasa	F CCT CAG GAT CTC CTT CAC CA	Wang *et al.,* 2010
		R TTG GGA AAA CCT TCA TTT CG	
Hepatopancreas	Tripsina	F TCC AAC ATC ATC CAC ACG A	Stephens *et al.,* 2012
		R GAC CCT GAG CGG GAA TAT C	
	Catepsina B	F GGA TGT AAC GGA GGC TTC	
		R CTG TAT GCT TTG CCT CCA	
	HSP70	F CTC CTG CGT GGG TGT GTT	
		R GCG GCG TCA CCA ATC AGA	
Genes de referencia	EF-α	F CTG TGG TCT GGT TGG TGT TG	Wang *et al.,* 2010
		R TCG GAT GAG TTC TTG GGT TC	
	β-actina	F CCA CGA GAC CAC CTA CAA C	
		R AGC GAG GGC AGT GAT TTC	
	L21	F GTT GAC TTG AAG GGC AAT G	Stephens *et al.,* 2012
		R CTT CTT GGC TTC GAT TCT G	
	40S-S24	F CAG GCC GAT CAA CTG TCC	
		R CAA TGA GAG CTT GCC TTT CC	

6.3 EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS BACTERIAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS EN SEMILLAS DE OSTIÓN *C. sikamea*

6.3.1 Evaluación del crecimiento del alimento vivo (microalgas) en co-cultivo con las bacterias seleccionadas

A diferencia del camarón, los moluscos son alimentados con organismos vivos que son microalgas cultivadas y no con alimento peletizado. Por ello se consideró necesario evaluar el efecto que pudiera tener en el alimento vivo, la adición de cepas potencialmente probióticas al agua de cultivo, antes de evaluar su efecto en semillas de ostión.

Para llevar a cabo esta evaluación se emplearon dos microalgas de uso común en la alimentación de bivalvos marinos: *Isochrysis galbana* (*Ig*) y *Chaetoceros calcitrans* (*Ch*); y las cepas: GAtB1, MAt32 y MAt43, las tres pertenecientes al género *Bacillus*.

6.3.1.1 Diseño experimental

Se emplearon once matraces previamente esterilizados, con un volumen final de 700 mL de agua de mar estéril (35 ups) enriquecida con 750 µL de medio Guillard F/2, con un pH máximo de 8. Los matraces se colocaron dentro de una campana de flujo laminar para inocular las microalgas (a razón de 4.5×10^4 células) y las bacterias (a razón de 1×10^4 UFC·mL^{-1}) correspondientes, según los tratamientos experimentales por triplicado indicados en la Tabla IX. La concentración de bacterias necesarias se obtuvo de cultivos “o/n” en TSB 2.5% NaCl, lavados dos veces con agua de mar estéril y resuspendidos en la misma, a una densidad óptica de 1.0.

Tabla IX.- Diseño experimental aplicado para evaluar si hay efecto por la adición de bacterias seleccionadas en el crecimiento de las microalgas cultivadas para alimento de ostión. Ig = *Isochrysis galbana*, Ch = *Chaetoceros calcitrans.*

Tratamiento	Organismo añadido
C1	*Isochrysis galbana*
C2	*Chaetoceros calcitrans*
C3	MAt32
C4	MAt43
C5	GAtB1
T1	Ig+MAt32
T2	Ig+MAt43
T3	Ig+GAtB1
T4	Ch+MAt32
T5	Ch+MAt43
T6	Ch+GAtB1

Los matraces inoculados se incubaron a 28±1 ºC, con un fotoperíodo 16:8 dado por lámparas fluorescentes Daylight horizontales que brindan una intensidad lumínica de 5940 lux máximo/5370 lux mínimo. Se proporcionó aireación continua por burbujeo por medio de una varilla de vidrio con un filtro de algodón.

El crecimiento de cada microalga se determinó por conteo directo en una cámara Neubauer tomando 1 mL de cultivo y empleando un microscopio de luz Olympus BH-2 (microscopio óptico con el objetivo 40×). Se tomaron alícuotas para conteo celular inicial al momento de la inoculación (T=0) y los días 3, 5 y 7. Para los días 5 y 7 se realizó una dilución 1:10 para facilitar el conteo celular, empleando agua de mar estéril como diluyente y los resultados se expresaron en células·mL^{-1}.

El análisis bacteriológico se llevó a cabo sembrando muestras de los cultivos microalgales sobre placas con agar TSA, MRS con azul de anilina, MH y TCBS los mismos días que se realizó el conteo celular. Las placas se incubaron a

35 °C por 24 h, 72 h para el medio MRS y se contabilizaron las colonias, los días 5 y 7 se realizaron previamente diluciones seriales y los resultados se expresaron en UFC·mL^{-1}.

6.3.2 Bioensayo con juveniles de ostión *C. sikamea*

Para evaluar el efecto probiótico de las cepas seleccionadas aisladas del TD de *A. tuberculosa*, se emplearon semillas saludables (con certificado de sanidad acuícola) de *C. sikamea*, de 5-6 mm de longitud, que fueron donadas por el laboratorio ostrícola de la empresa Acuacultura Robles.

6.3.2.1 Diseño experimental

Se manejaron siete tratamientos los cuáles se muestran en la Tabla X. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las cepas empleadas en los tratamientos fueron: MAt32 (*Bacillus licheniformis)*, MAt42 (*B. subtilis*) y GAtB1 (*B. subtilis* subesp. *subtilis*). Se suministraron bacterias con 24 h de incubación a 37°C en medio TSB que fueron agregadas directamente al agua cada tercer día a una concentración de 10^6 UFC·mL^{-1}. La mezcla de bacterias se preparó a una proporción 1:1:1 para una concentración final de 10^6 UFC·mL^{-1}.

El experimento se llevó a cabo durante un lapso de cinco semanas. Para el grupo C3 se adicionó una mezcla 1:1 de los antibióticos Ampicilina y Estreptomicina para una concentración final de 10 ppm.

Tabla X.- Diseño experimental de los tratamientos para evaluar el efecto potencialmente probiótico de bacterias aisladas de *A. tuberculosa* en semilla de *C. sikamea.*

Tratamiento	**Bacteria**	**Infección con *Vibrio parahaemolythicus***	**Antibiótico**
C1	No	No	No
C2	No	Si	No
C3	No	Si	Si
T1	MAt32	Si	No
T2	MAt42	Si	No
T3	GAtB1	Si	No
T4	Mezcla 1:1:1	Si	No

Se utilizaron cubetas plásticas de 5 L conteniendo 2 L de agua de mar filtrada a 2 µm y esterilizada por UV, con un sistema de aireación continua a temperatura de 25±1 ºC y salinidad de 36±1 ups. Se colocaron 60 semillas por cubeta. Se realizaron recambios totales de agua cada tercer día.

Las semillas fueron alimentadas con las microalgas *I. galbana* y *C. calcitrans* en proporción 1:1, a una densidad inicial de 1×10^5 células·mL^{-1}, la cual se incrementó hasta 175×10^3 células·mL^{-1} según demanda de los moluscos. El alimento se administró en cuatro raciones diarias. Para el ajuste de alimento, diariamente se realizó conteo de células de microalgas remanentes previo a la administración de la primera dosis de alimento del día.

6.3.3 Reto con *V. parahaemolyticus*

Para evaluar el efecto protector de las bacterias potencialmente probióticas seleccionadas en juveniles de *C. sikamea* ante la infección con un patógeno, se realizó un reto con *V. parahaemolyticus.* Se emplearon los mismos organismos

tratados durante cuatro semanas con las bacterias, y los controles, en las mismas unidades experimentales.

V. parahaemolyticus es considerado como agente del grupo de riesgo II, ya que se trata de un agente causal de enfermedades a humanos o animales que, bajo circunstancias normales, no produce riesgos serios a trabajadores de laboratorio, la comunidad, los recursos naturales o el medio ambiente, por lo que se manipuló aplicando las normas internacionales de seguridad (LCDC, 1996; OMS, 2005; FAO/OMS, 2010), en las instalaciones del área húmeda del Bioterio del CIBNOR, dirigido por el Dr. Amaury Cordero Tapia

Se administró suficiente *V. parahaemolyticus* para una concentración final de 10^6 UFC·mL^{-1} de agua de mar.

6.3.4 Crecimiento y supervivencia

Se evaluó la supervivencia al final de las seis semanas de eperimentación en los diferentes tratamientos y sus tres réplicas.

Semanalmente y al final del bioensayo se realizaron biometrías colocando 30 semillas de cada cubeta sobre papel milimétrico laminado, tomando una imagen fotográfica para medir largo y ancho empleando el programa Image-pro plus versión 5.1. Se evaluó la talla final promedio alcanzada en cada tratamiento, así como el crecimiento absoluto (CA) según la fórmula:

$$CA=Lf-Li \qquad (10)$$

Donde Lf= Longitud media final, y Li= Longitud media inicial.

Para la evaluación final del crecimiento se midió la longitud final, anchura final, y el coeficiente de variación respecto a la longitud, calculado como:

$$CV=S / \overline{X}*100 \qquad (11)$$

Donde S= desviación típica o varianza, y $\overline{X}$= media muestral.

6.3.5 Modulación de microbiota en el agua de cultivo

Al término de las semanas uno, tres y cinco se tomaron 1 mL del agua de cada unidad experimental en tubos Eppendorf estériles, se realizaron diluciones seriales y a partir de la quinta dilución se tomaron 20 µL para sembrar por dispersión en placa Petri conteniendo medio sólido. De cada muestra se sembraron 20 µL en medio TSA (Tryptic Soy Agar) 2.5% NaCl, en MH (Muller Hinton) 2.5% NaCl para conteo de heterótrofas totales, en MRS 2.5% NaCl (con 20 $mg \cdot \mu L^{-1}$ de azul de anilina) para bacterias ácido lácticas y en TCBS 2.5% NaCl para conteo de *Vibrios* sp. Cada medio se sembró por duplicado para cada muestra. Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 72 h. A las 24 h de incubación se contaron las colonias en los medios TSA, MH y TCBS. Las colonias que presentaron una coloración azul en el medio MRS se contabilizaron a las 72 h de incubación.

Finalmente se evaluó la microbiota interna de los organismos cultivados, para lo cual se extrajo el tejido blando de dos organismos por cada cubeta y el producto se lavó, se pesó y se colocó en tubos Eppendorf estériles por separado. En seguida se agregaron 200 µL de agua de mar estéril para macerar con ayuda de pistilos estériles. Se agregaron 800 µL más y se homogeneizó cada muestra, para, posteriormente, por duplicado sembrar por dispersión 10 µL del

homogeneizado en medio TSA, MH, MRS y TCBS. Las placas se incubaron y se cuantificaron las colonias según se describió con anterioridad.

6.4 EVALUACIÓN DE ADHESIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS EN SEMILLAS DE *C. sikamea*

Para comprobar la presencia y colonización de las bacterias probióticas, se evaluó su adhesión en el TD de *C. sikamea*. Se utilizaron las cepas MAt32, MAt42 y GAtB1 (empleadas en los bioensayos anteriores), marcadas con DTAF (Sherr *et al*., 1987). Para marcar las bacterias se emplearon cultivos en medio TSB 2.5% NaCl incubados durante 24 h a 37 °C, centrifugados durante 10 min a 3000 ×g, a temperatura ambiente. A continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el concentrado celular en 10 mL de solución DTAF [Na_2HPO_4 0.05 M, 0.85 % NaCl, y 20 mg/mL DTAF (SIGMA D-0531)]. La mezcla se incubó dos h en baño María a 37 °C y se centrifugó a 4000 × g a temperatura ambiente durante 10 min para eliminar el sobrenadante y realizar un lavado con agua de mar estéril. Las bacterias se resuspendieron en agua de mar con 30% de glicerol y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para evaluar *in vivo* la adhesión de las bacterias previamente marcadas con DTAF en ostión, se colocaron 15 juveniles de *C. sikamea* de 10±0.5 mm de longitud en cubetas de 5 L conteniendo 2 L de agua de mar estéril, con aireación constante a 25±1 °C de temperatura. Por cada cepa se manejaron tres réplicas. Se agregaron 10^6 UFC de cada cepa marcada con DTAF directo al agua en cada unidad experimental, y no se administró alimento durante ese día. Las bacterias marcadas con DTAF fueron manipuladas en condiciones de obscuridad, y las cubetas de cultivo se mantuvieron tapadas para evitar cualquier entrada de luz. Para realizar los cortes que se colocaron en portaobjetos cubiertos con

cubreobjetos, se tomaron tres organismos por cubeta una hora después de administrar las semillas y nuevamente a las 24 h.

A fin de observar la fluorescencia, las muestras se transportaron protegidas de la luz al laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR, y se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus Bx41, empleando el filtro 1WV, con el objetivo 20×. Se empleó el programa Image Pro Plus version 7.0 para la observación y análisis de las imágenes capturadas con una cámara Nikon DS-Ri1. Cabe señalar que las microalgas mostraban una auto-fluorescencia roja, mientras que las bacterias marcadas, una fluorescencia verde.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron las pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Bartlett) para establecer si se aplicarían pruebas paramétricas o no paramétricas para el análisis de los datos. Cuando los datos mostraron una distribución normal se sometieron a un ANDEVA ($p<0.05$) y un análisis Tukey en caso de encontrar diferencias significativas con el fin de identificar dichas diferencias. En caso contrario se sometieron a pruebas no paramétricas, para lo que se aplicó una prueba Kruskal-Wallis.

Se utilizó un análisis unidireccional de la varianza (ANDEVA) para examinar las diferencias en AG, SGR, la prevalencia viral y la expresión génica relativa. Los valores de $p<0.05$ se consideraron significativamente diferentes. Los resultados disponibles como porcentaje se transformaron por arcoseno de acuerdo con Daniel (1997). Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizó Tukey o prueba de Duncan para identificar el origen de estas diferencias ($p<0.05$). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, EE.UU.).

7 RESULTADOS

7.1 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

Se obtuvieron aislados bacterianos a partir del TD de adultos de *A. tuberculosa*, de organismos procedentes de dos localidades (BM y BN) ubicados respectivamente en Baja California Sur y en Sinaloa, depurados y sin depurar. El aislamiento fue realizado en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis y en de culivo medios generales o selectivos. Se obtuvieron en total 101 cepas bacterianas que fueron caracterizadas de conformidad con sus distintas morfologías coloniales (Tabla XI).

Tabla XI.- Número de cepas aisladas en total en condiciones tanto de aerobiosis como anaerobiosis en cada uno de los medios empleados para ambos sitios de colecta.

Origen	Medio	Sin depurar	Depuradas	Anaerobiosis	Total
BAHÍA MAGDALENA (BM)	2216	10		2	12
	LB	15		2	17
	MK	0	6	2	8
	MRS	3	3	7	13
	R	1		6	7
	TCBS	0		1	1
	TSA	25		2	27
	Y	2	7	0	9
	YPD	0		7	7
BAHÍA NAVACHISTE (BN)	MRS+Azul de anilina (BAL)	23			23
	TSA (pretratadas a 80 °C para bacilos)	27			27
	TOTAL	**106**	**16**	**29**	**151**

7.2 EVALUACIÓN *in vitro* DE LAS CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS

A partir de los 101 aislados bacterianos provenientes del TD de adultos de *A. tuberculosa*, fueron seleccionadas las cepas más resistentes, manejables y con potencial probiótico. En la Tabla XII se presentaran los resultados obtenidos durante los bioensayos *in vitro*.

Tabla XII.- Resultados del análisis *in vitro* de las cepas aisladas del TD de *A. tuberculosa*, mostrando pruebas realizadas y diagnóstico sobre su potencial probiótico.

Prueba	Resultado	Indica	Diagnóstico
Hemólisis (H)	ɣ	No hemolíticas	Aceptable
Catalasa (Ct)	-	No produce catalasa	Preferible
Rojo Congo (RC)	- + ++	Incolora Rojiza Mayor intensidad	Esta prueba corresponde a la hidrofobicidad pero se considera que una coloración intensa puede indicar virulencia.
Xileno (X)	> 50	Hidrofobicidad	
Antagonismo con *Vibrio* (V)	++	Inhibición o competencia	Preferible si muestra resultados similares tanto células como sobrenadante
Degradación de proteínas (SM)	++	Producción de proteasas	Preferible si muestra resultados similares tanto células como sobrenadante
Degradación de carbohidratos (C)	++	Producción de carbohidrasas	Preferible si muestra resultados similares tanto células como sobrenadante
Degradación de lípidos (SB)	++	Producción de lipasas	Preferible si muestra resultados similares tanto células como sobrenadante
Producción de enzimas (AZ)	+	En función de las pruebas seleccionadas	
Antibiograma	- - - -	Ampicilina Penicilina-Estreptomicina Bacitracina Gentamicina	Cepas resistentes a > 1antibióticos.

Para las pruebas V, SM, C y S, el halo de degradación medido se calificó de acuerdo a lo siguiente: (-) no se presentó zona de degradación, (+) halo < 10mm de diámetro y, (++) halo ≥ 10mm de diámetro (Dopazo *et al.*, 1988).

Para la prueba para degradación de lípidos, se consideró como resultado positivo la coloración azul de las cepas calificándose como (–) otro color, (+) coloración azul pálido, azul claro o azul grisáceo y (++) azul rey. En las pruebas donde no se midió halo de degradación sólo se consideran los resultados positivos (+) o negativos (-).

Respecto a la prueba de la catalasa (Tabla XIII), solo se obtuvieron dos resultados negativos, al igual que para la prueba de Rojo Congo (Tabla XIV).

Para las pruebas V, SM, C y SB, no se obtuvieron resultados claros con la metodología de Balcázar *et al*. (2007), en los aislados crecidos durante 24 h en caldo de cultivo. Esto fue resuelto mediante la siembra de las cepas directamente para la formación de una macrocolonia y utilizando el inóculo del concentrado celular (Tabla XIV).

Tabla XIII.- Resultados de la tinción Gram y las pruebas de catalasa y hemólisis de cepas seleccionadas provenientes de Bahía Magdalena (MAt), y cepas provenientes de Bahía Navachiste, Guasave, Sinaloa (GAt).

Cepa	Medio	Gram	Catalasa	pH inicial	pH final	Hemólisis
MAt29	TSA	+		6.01	7.03	γ
MAt32	2216	+		5.99	6.86	γ
MAt35	LB	+		6.24	6.8	γ
MAt42	LB	+		6.74	6.8	γ
MAt43	LB	+		6.26	6.8	γ
MAt100	2216	+		5.59	6.92	γ
GAtB1	TSA 2.5%	+		5.29	6.74	γ
GAtB2	TSA 2.5%	+		5.38	6.87	γ
GAtB4	TSA 2.5%	+		5.4	6.83	γ
GAtB7	TSA 2.5%	-		5.89	6.94	γ
GAtB9	TSA 2.5%	+		5.76	7.08	γ
GAtB11	TSA 2.5%	+		6.47	6.88	γ
GAtB13	TSA 2.5%	-		5.78	6.93	γ
GAtB16	TSA 2.5%	+		6.07	6.8	γ
GAtB26	TSA 2.5%	+		6.25	7.05	γ
GAtBAL7	MRS 2.5%	+	-	6.09	6.99	γ
GAtBAL9	MRS 2.5%	-	+	5.88	6.83	A

Tabla XIV.- Resúmen de resultados de las pruebas realizadas a algunas de las cepas aisladas a partir del TD de *A. tuberculosa* para catalasa (Ct), rojo congo (Rc), antagonismo con *Vibrio*, degradación en Skim Milk para proteasas (SM) y en Blue Spirit para lipasas (BS).

Clave	Medio	Ct	Rc	Vibrio/Cél	SM /cél	BS /cél
MAt18	LB	+	3	+	-	
MAt21	TSA	+	3	++	-	+
MAt22	TSA	+	3	+	+	-
MAt23	LB	+	3	++	-	++
MAt24	LB	+	3	++	-	++
MAt25	LB	+	3	++	-	++
MAt29	TSA	-	-			-
MAt33	2216	+	4	++	-	+
MAt35	LB	+	3	++	+	++
MAt37	TSA	+	4	++	-	-
MAt38	TSA	+	2	++	-	+
MAt44	LB	+	3		++	-
MAt60	MRS				+	-
MAt68	2216	+	4		++	-
MAt75	LB	+	-		-	-
MAt82	MRS	+	3		++	+

Con base en la caracterización de los aislados se seleccionaron tres cepas de alta hidrofobicidad (Tabla XV y Tabla XVI), tres de media hidrofobicidad y una bacteria ácidolactica (BAL), con hidrofobicidad media (Figura 9), todas ellas γ-hemolíticas y con alta tolerancia al nitrógeno amoniacal (Figura 10).

Tabla XV.- Total de aislados bacterianos provenientes del TD de *A. tuberculosa* tanto en B.C.S. (Bahía Magdalena o BM) y Sinaloa (Bahía Navachiste o BN) y número de cepas seleccionadas en base a sus características hemolíticas, tinción Gram e hidrofobicidad.

	BM	**BN**	
		Bacilos	**BAL**
Total	101	27	23
Hemólisis-γ	26	9	1
Gram +	23	8	1
Alta hidrofobicidad	**3**	0	0
Mediana hidrofobicidad	**2**	**1**	**1**

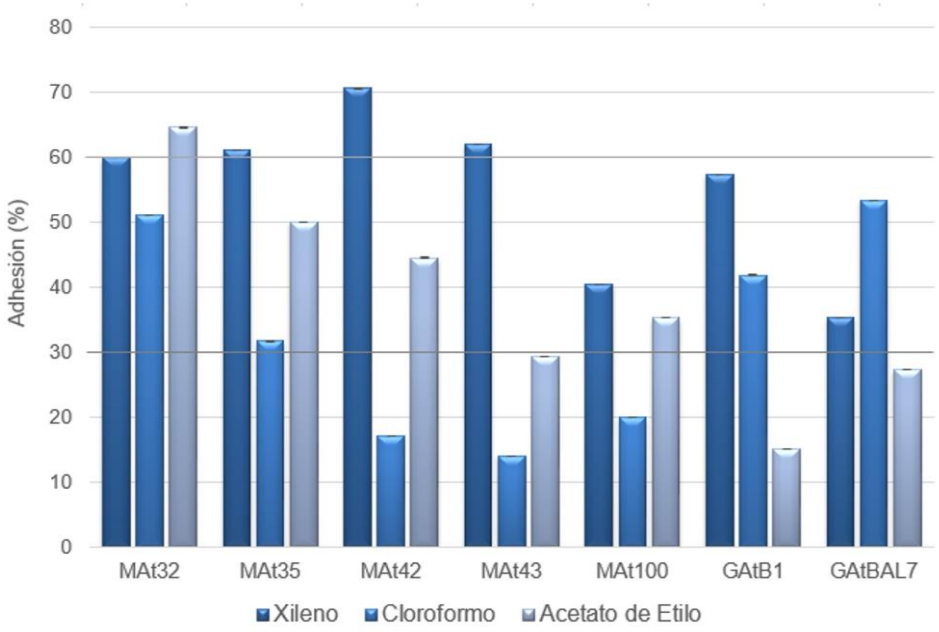


Figura 9.- Hidrofobicidad y características de la superficie bacteriana de las cepas seleccionadas obtenidos por su capacidad de adhesión a solventes orgánicos: <30 %= baja, >30-<60 %= media, >60 %= alta. Las líneas sobre las barras respresentan EE.

Tabla XVI.- Porcentaje de adhesión a tres solventes orgánicos de cada cepa seleccionada.

Cepa	% p-Xileno	**Hidrofobicidad**	% Cloroformo	**Superficie Donadora**	%Acetato de Etilo	**Superficie Aceptora**
MAt42	70.59	Alta	17.11	Baja	44.56	Media
MAt43	62.07	Alta	14.00	Baja	29.34	Baja
MAt35	61.05	Alta	31.71	Media	50.07	Media
MAt32	59.98	Media	51.08	Media	64.59	Alta
MAt100	40.48	Media	20.04	Baja	35.29	Media
GAtB1	57.43	Media	41.87	Media	15.11	Baja
GAtBAL7	35.42	Media	53.36	Media	27.35	Baja

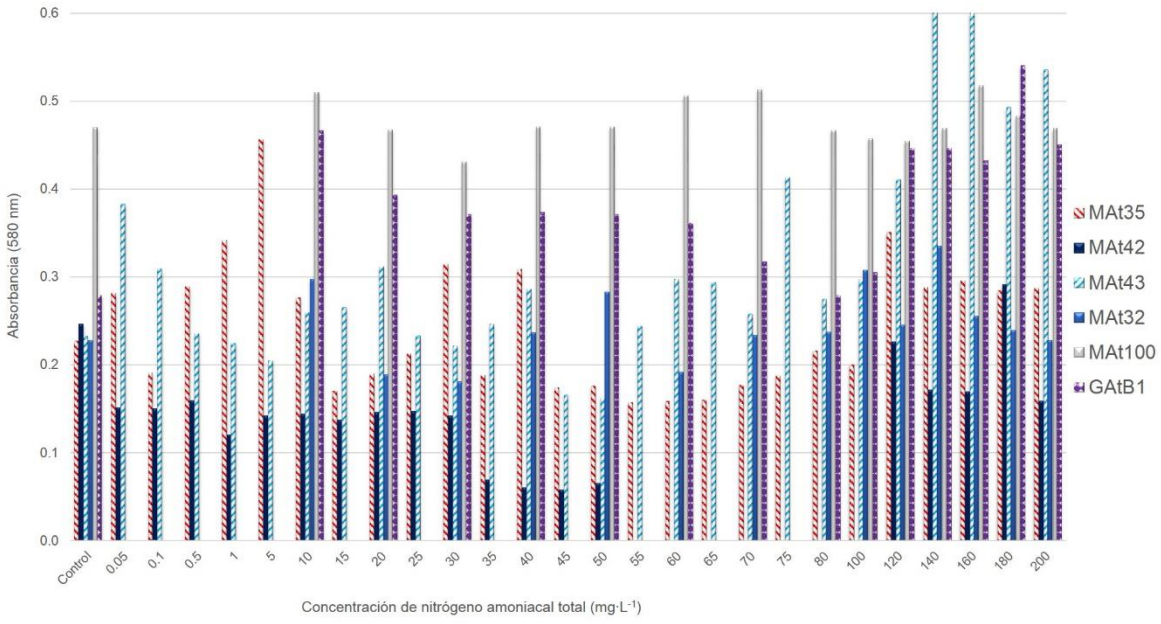


Figura 10.- Tolerancia al nitrógeno amoniacal total (TAN) de cada uno de los aislados. Se muestra el promedio de tres réplicas.

Para evaluar la capacidad de crecimiento y determinar el tiempo en que cada cepa logra alcanzar su etapa estacionaria se realizó una curva de crecimiento en caldo TSB o MRS encontrando que la mayoría de éstas se encuentran en su etapa estacionaria a las 48 h de iniciado el cultivo a excepción, de la única BAL que presenta un lento crecimiento (Figura 11).

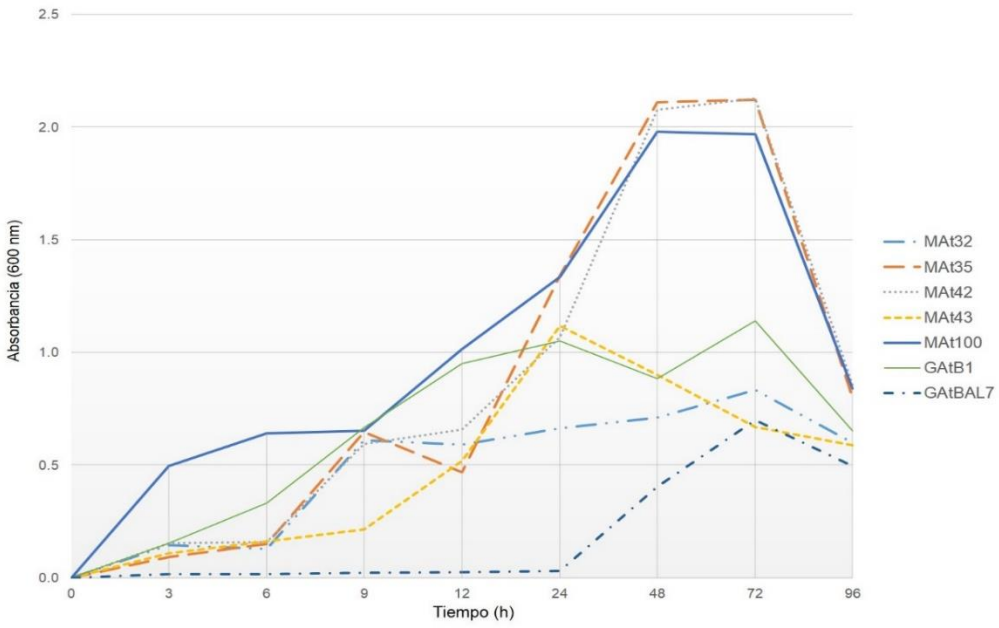


Figura 11.- Curva de crecimiento de las cepas seleccionadas, obtenida por absorbancia a 600nm hasta por 96 h.

A excepción de las BAL, se probó la capacidad de los aislados para crecer a diferentes concentraciones de salinidad, inoculandolos en medio TSB con diferentes concentraciones de NaCl (0.5 - 12%). El medio TSB contiene 0.5% de esta sal. Se consideró como tratamiento control, el inóculo en medio TSB 2.5%NaCl, porque en esas condiciones se incuban rutinariamente los aislados bacterianos y con ese contenido de sal se determinó la curva de crecimiento estándar.

Tal como era de esperarse, considerando que los aislados provienen de una especie marina del manglar, en términos generales se observó una buena tolerancia a altas concentraciones de salinidad (hasta 7-8% de NaCl en el medio de cultivo). Se determinó un límite manejable con 10% de NaCl y un crecimiento mínimo a 11-12% (Figura 12).

En cuanto a la resistencia de las cepas a diferentes niveles de pH, en general se observó una tendencia de las cepas seleccionadas, a crecer mejor en niveles de pH neutro a ligeramente básico (Figura 13).

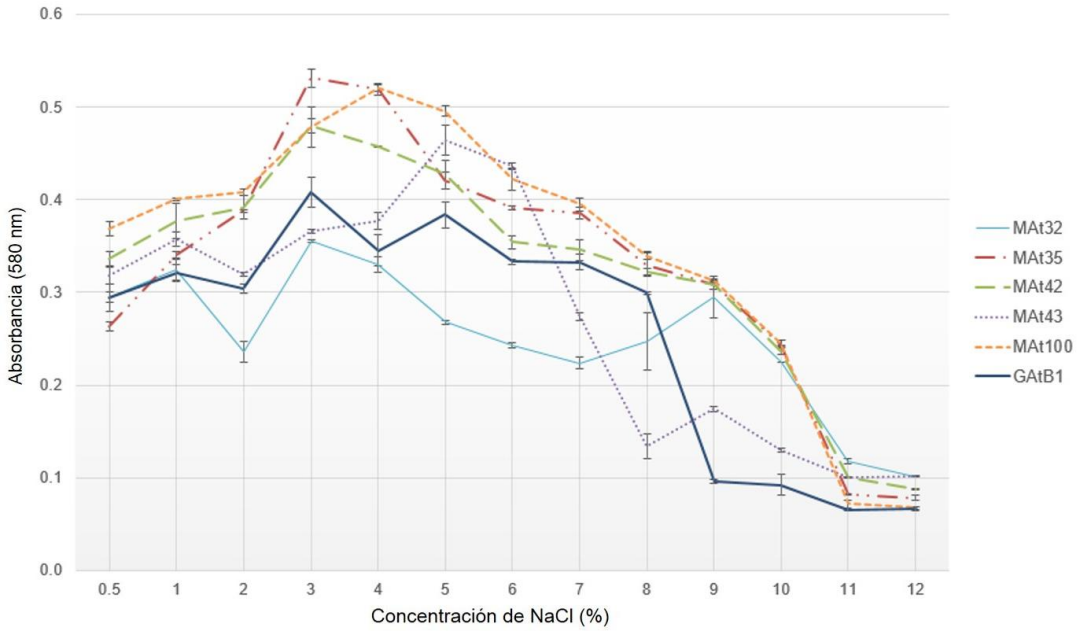


Figura 12.- Crecimiento de las cepas seleccionadas tras 24 h de incubación a 37 °C en medio TSB a diferentes concentraciones de NaCl. Las líneas sobre las barras respresentan el EE.

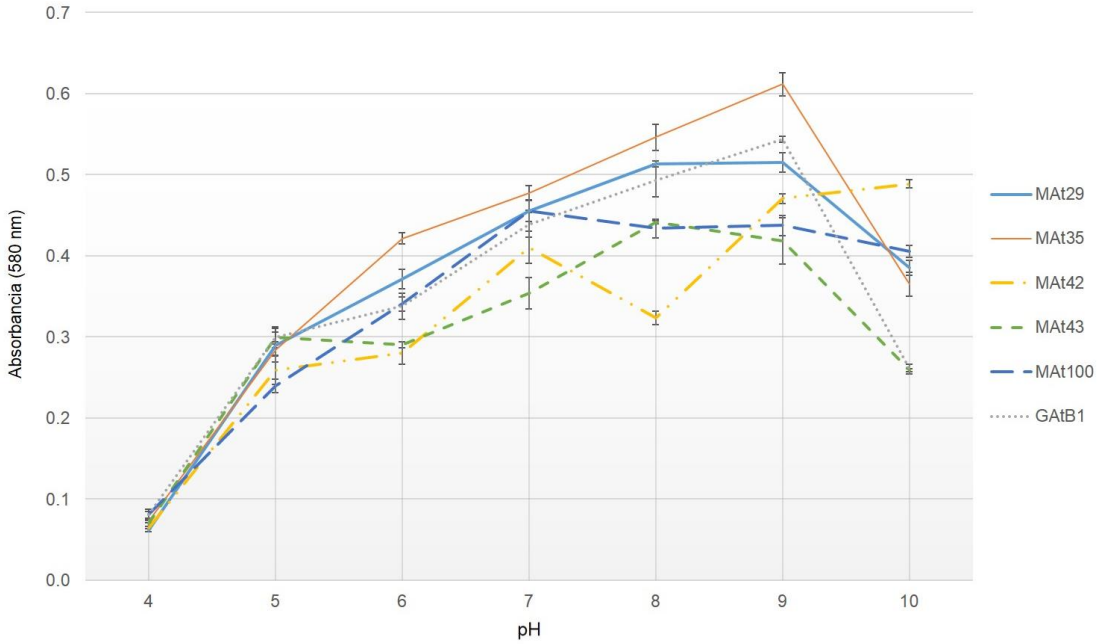


Figura 13.- Crecimiento de las cepas seleccionadas tras 24 h de incubación a 37°C en medio TSB a diferentes valores de pH. Las líneas sobre las barras respresentan el EE.

En general, se observó un alto porcentaje de autoagregación, con el valor menor en la cepa MAt29, la cuál es de baja hidrofobicidad Tabla XVII.

Tabla XVII.- Habilidad de autoagregación y coagregación de cada cepa con *Vibrio sp.* después de 5 h de incubación a temperatura ambiente en PBS (pH 7.2).

Cepa	**Coagregación con *Vibrio sp.* (%)**	**Autoagregación (%)**			
		1 h	2 h	3 h	4 h
MAt29	83.3	76.3	97.6	99.3	98.9
MAt32	17.9	99.9	100.0	97.6	97.2
MAt35	80.1	86.3	99.8	97.4	97.6
MAt42	8.2	99.4	96.6	96.1	97.4
MAt43	17.4	99.8	98.3	97.1	99.9
MAt100	75.0	99.4	96.9	97.4	99.0
GAtB1	69.2	99.7	97.7	97.2	99.7
GAtBAL7	24.1	97.3	98.4	97.3	99.0

En la tabla XVIII se muestra el resumen de resultados de la caracterización e identificación molecular correspondiente a las ocho cepas que se seleccionaron con base en los resultados de las pruebas *in vitro*. La cepa MAt29 se eligió por su baja hidrofobicidad (<30%) en comparación con las cepas de hidrofobicidad alta (>60%) y media (>30<60%). La cepa GAtBAL7, se eligió por ser una bacteria ácido láctica (BAL), catalasa negativa y con hidrofobicidad media.

Tabla XVIII.- Resumen de resultados de la caracterización y pruebas *in vitro* para determinar el potencial probiótico de ocho cepas seleccionadas. También se muestra la identificación molecular de las cepas.

		MAt32	MAt35	MAt42	MAt43	MAt100	GAtB1	MAt29	GAtBAL7
Medio		2216	LB	LB	LB	2216	TSA 2.5%	TSA	MRS 2.5%
Tinción Gram		+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
Hemólisis		Γ	Γ	Γ	γ	Γ	Γ	γ	γ
Hidrofobicidad	**% de unión al p-Xileno**	60±0.1	61±0.1	70±0.6	62±0.1	40±0.5	57±0.4	8±0.7	35±0.4
	% de unión al Cloroformo	51±0.1	31±0.7	17±0.1	14±0.1	20±0.2	41±0.9	NA	53±0.4
	% de unión al Acetato de Etilo	64±0.6	50±0.1	44±0.6	29±0.3	35±0.3	15±0.1	NA	27±0.3
UFCmL^{-1} Abs 580		$7.50x10^{7}$	$4.23x10^{10}$	$5.50x10^{7}$	NA	$1.31x10^{10}$	$1.98x10^{11}$	$2.75\ x10^{9}$	$7.50x10^{7}$
TAN mgL^{-1}	**<**	ND	ND	35,40,45 y 50	ND	ND	ND	-	-
	>	ND	ND	180	140 y 160	ND	120,140,160, 180 y 200	-	-
Tolerancia Salinidad %	**<**	11.0-12.0	11.0-12.0	11.0-12.0	8.0-12.0	11.0-12.0	9.0-12.0	-	-
	>	3.0-4.0	2.0-4.0	2.5-4.0	1.0-6.0	2.5-5.0	2.5-5.0	**-**	**-**
Tolerancia pH	**<**	**-**	5-6, 10	4, 5	4-6, 10	4, 5	4-6, 10	4-6, 10	-
	ND	**-**	8, 9	6-8	7.0	6, 10	7.0	7-9	-
	>	-	-	9, 10	8, 9	7-9	8, 9	-	-
% Autoagregación		99.9	86.3	99.4	99.8	99.4	99.7	76.3	97.3
% Coagregación con *Vibrio*		17.9	80.1	8.2	17.4	75.0	69.2	83.3	24.1
Capacidad enzimática	**Caseína (SM) mm**	27±0.1	30±0.1	-	14.5±3.5	17.5±0.5	27±0.1	21.5±0.5	-
	Gelatina mm	34±2.0	35±1.0	18.5±0.5	33±3.0	23.5±1.5	29.5±2.5	24.5±0.5	-
	Tween 80 mm	-	-	-	-	-	-	-	19.5±5.5
Vibrio/Cél mm		-	20±1.0	-	-	-	-	-	-
Vibrio/Sobr mm		-	-	-	-	-	-	-	-
Antibiograma	**Penicilina mm**	-	-	2±1.0	-	-	-	-	37.5±0.5
	Amoxicilina mm	2±1.0	20±0.0	8.5±0.5	-	-	-	8±0.0	34±3.0
	Gentamicina mm	10.5±0.5	10±0.0	11±0.0	11.5±0.5	13.5±0.5	11±0.0	8±0.1	10±0.1
	Bacitracina mm	-	-	-	-	-	-	-	35.5±0.5
Especie		*Bacillus licheniformis*	*Citrobacter koseri*	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus subtilis*	*Vibrio* sp.	*Bacillus subtilis subsp. subtilis*	*Enterococcus casseliflavus*	*Staphylococcus sp.*
% de homología		99	97	98	100	95	100	99	100
Muestra secuenciada		Clona	Producto PCR	Producto PCR	Producto PCR	Producto PCR	Clona	Clona	Producto PCR

*ND.- No hay diferencia significativa respecto al control, NA.- Datos no disponibles.

7.3 EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LAS CEPAS SELECCIONADAS POR SU POTENCIAL PROBIÓTICO

7.3.1 Primer bioensayo con *L. vannamei*

Los aislados seleccionados previamente durante los ensayos *in vitro* (MAt35, GAtB1, MAt29 y GAtBAL7) fueron utilizados para los ensayos in vivo, cuyos resultados se presentan a continuación. En resumen, MAt35 presentó alta hidrofobicidad, alta actividad enzimática y alto porcentaje de autoagregación; GAtB1 presentó hidrofobicidad media, alta actividad enzimática y altos porcentajes de autoagregación y coagregación; MAt29 presentó baja hidrofobicidad pero un alto porcentaje de coagregación, y GAtBAL7 resultó ser catalasa negativa y tener el porcentaje más alto de coagregación.

7.3.1.1 Análisis de WSSV

Para este bioensayo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la prevalencia viral entre tratamientos ($p>0.05$).

7.3.1.2 Supervivencia y Tasa de Crecimiento Específico

En el bioensayo in vivo se obtuvo un 100% de supervivencia para todos los tratamientos. Aunque no se encontró diferencia significativa para peso total entre el tratamiento control y los grupos que recibieron bacterias obtenidas del TD de *A. tuberculosa,* se observó una tasa de crecimiento específica más alta en el tratamiento T5 correspondiente a la mezcla de bacterias (aunque tambien el

menor peso promedio), seguido por el tratamiento T3 correspondiente a GAtB1 (Figura 14).

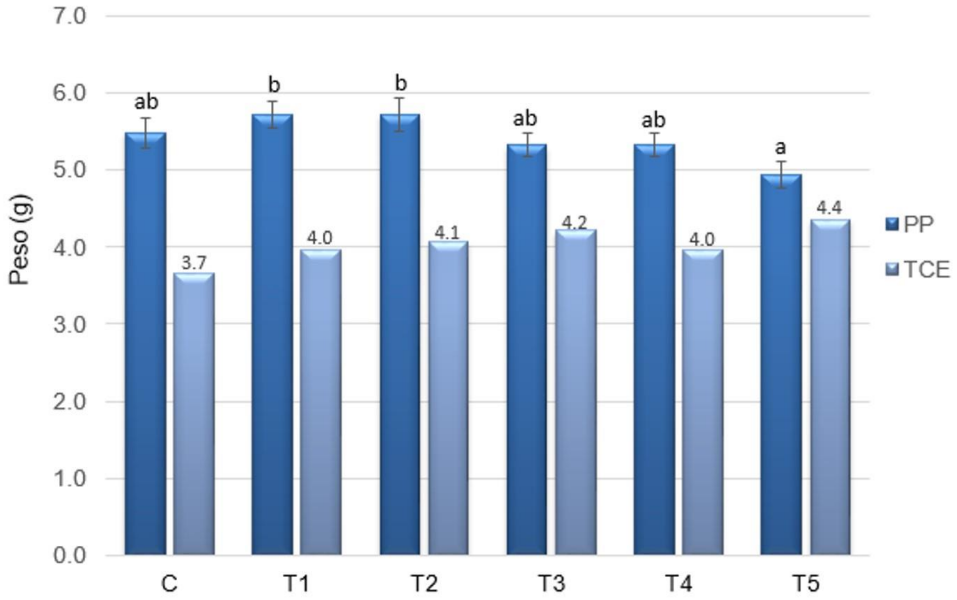


Figura 14.- Peso promedio (PP) y tasa de crecimiento específico (TCE) para los camarones tratados con bacterias potencialmente probióticas durante 28 días. C: Control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mix 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 30 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.3.1.3 Respuesta Inmune

A continuación se describen los resultados obtenidos para los parámetros con los que se evaluó la respuesta inmune: conteo de hemocitos, concentración de anión superóxido, profenoloxidasa y fenoloxidasa.

7.3.1.4 Conteo de hemocitos

Se encontró una diferencia significativa en el conteo total de hemocitos (CTH) para el tratamiento T3 (p=0.013), en relación con los valores registrados en el grupo control C y en grupo T5 que recibió la mezcla de bacterias (Figura 15).

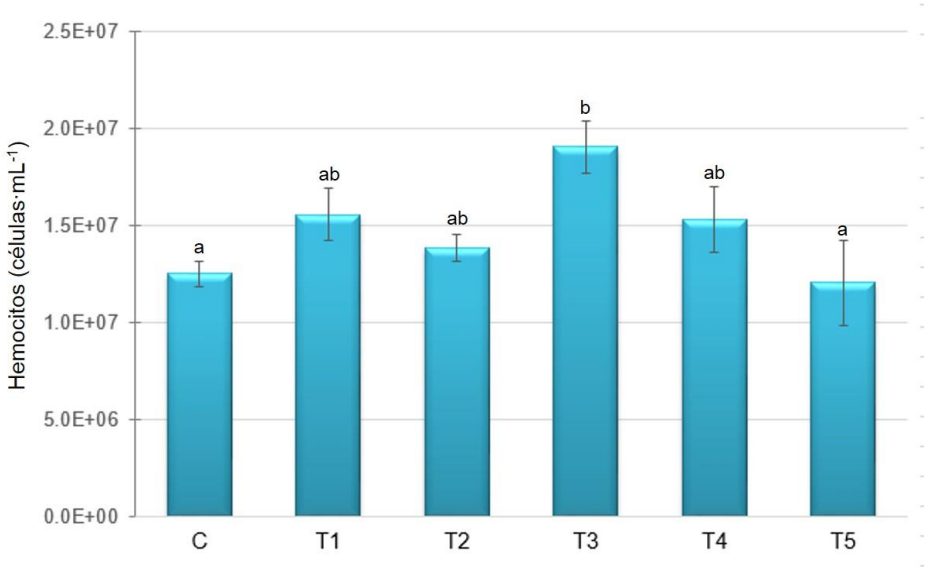


Figura 15.- Conteo total de hemocitos CTH en camarón tras 28 días de tratamiento con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 9 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.3.1.5 Anión Superóxido Intracelular

La concentración de anión súper óxido en muestras de hemolinfa mostró diferencias significativas unicamente entre los tratamientos C y T1 ($p = 0.03$). La mayor concentración correspondió al grupo control C, seguido por T2, T3, T4 y T5, y finalmente T1 con la menor contentración (Figura 16). Los tratamientros T2 a T5

mostraron en general una tendencia a la disminución en la concentración del anión.

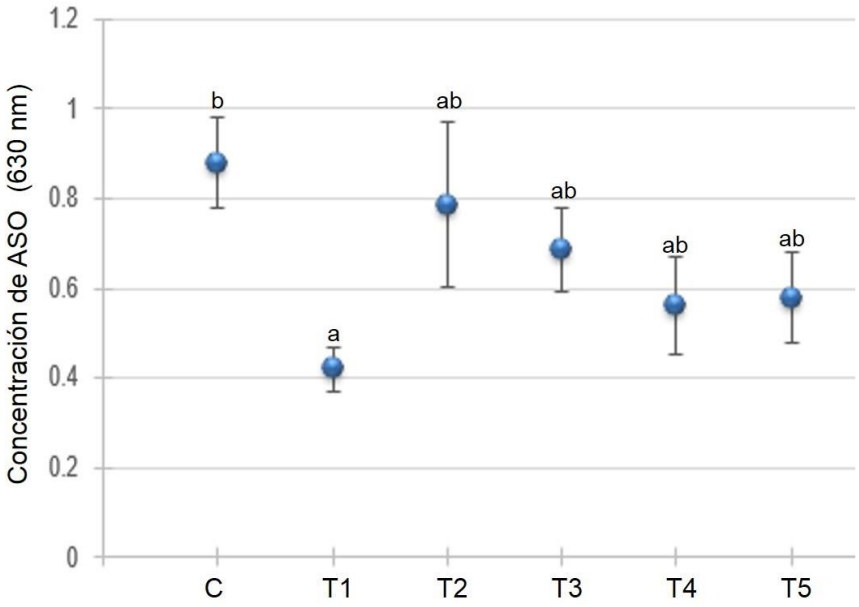


Figura 16.- Concentración de anión superóxido en muestras de hemolinfa de camarón blanco tratado con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 9 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.3.1.6 Actividad fenoloxidasa FO y proFO

Después de los análisis bioquímicas realizados, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la actividad FO en hemolinfa, al aplicar los tratamientos bacterianos (prueba de Kruskal-Wallis, $p= 0.52$). En cambio, para la concentración de proFO se encontró una mayor actividad y las diferencias fueron significativas para los tratamientos T4 ($p= 0.04$) y T5 ($p= 0.012$), con respecto al grupo control C, tal como se muestra en las figuras 17 y 18 respectivamente.

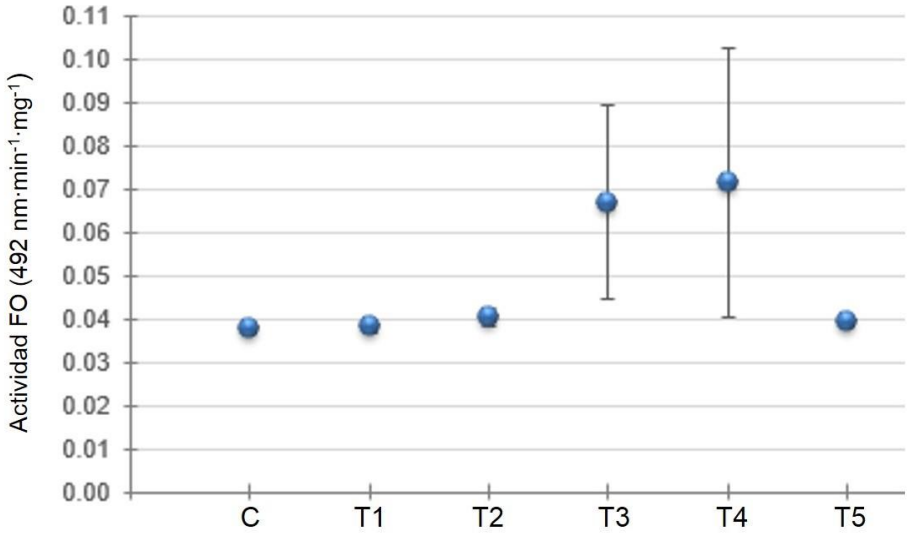


Figura 17.- Concentración de fenoloxidasa (FO) en muestras de hemolinfa de camarón blanco tratado con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 27.

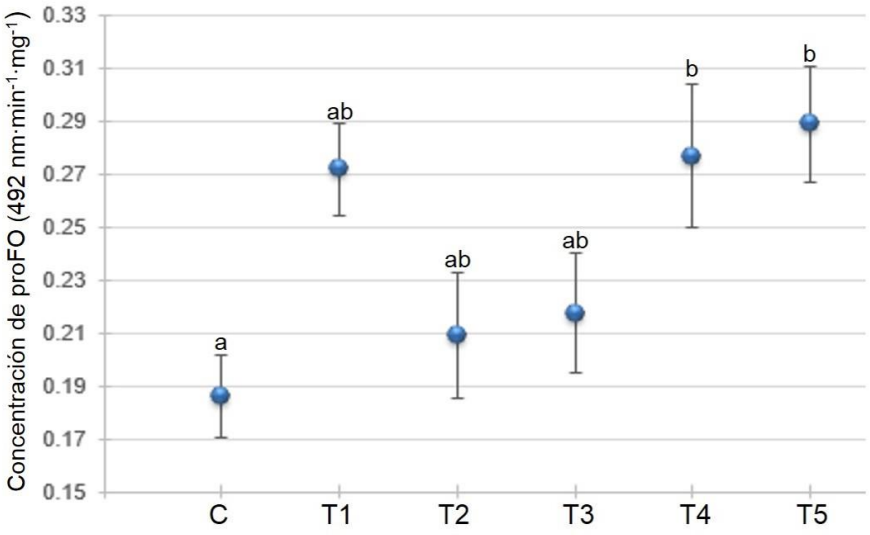


Figura 18.- Concentración de profenoloxidasa (proFO) en muestras de hemolinfa de camarón blanco tratado con bacterias potencialmente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 27. Las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.3.1.7 Proteínas totales

Se encontró una mayor concentración de proteínas totales en lisado de hemocitos en las muestras correspondientes al tratamiento T1 (p= 0.004), al cual se le agregó la cepa MAt29, y al tratamiento T5 (p= 0.03), adicionado con la mezcla de bacterias probióticas (Figura 19).

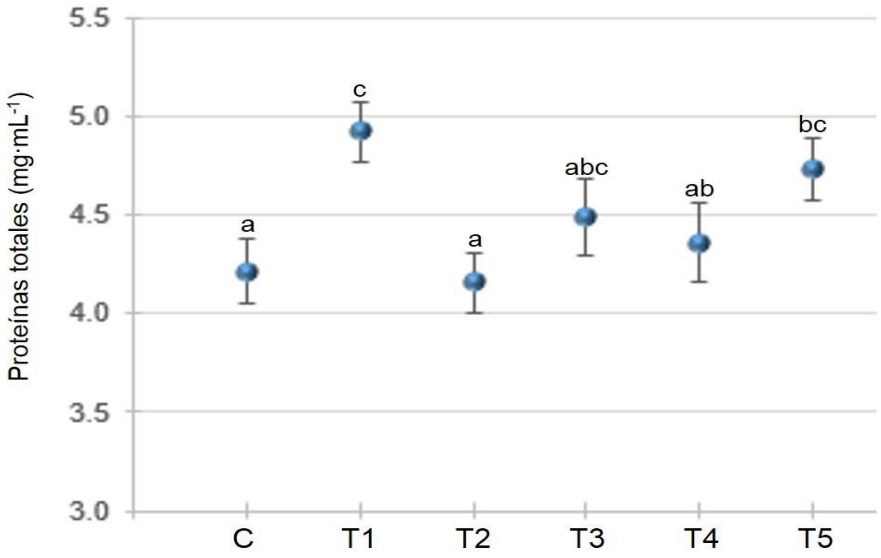


Figura 19.- Concentración de proteinas totales en sobrenadante de lisado de hemocitos de camarón blanco tratado con bacterias potenciamente probióticas. C: control, T1: MAt29, T2: MAt35, T3: GAtB1, T4: GAtBAL7, T5: mezcla 1:1:1:1. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 27. Las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

En resumen, en el primer bioensayo con juveniles de *L.* vannamei, el grupo T5 mostró una mayor TCE, y se observó un mayor crecimiento promedio final en T1 y T2. El mayor CTH se encontró en T3. La menor concentración de anión súperóxido se encontró en T1, con una tendencia a disminuir en todos los tratamientos adicionados con bacteria, respecto al control. Aunque no fue significativa, se encontró una mayor actividad FO en T3 y T4. Se observó una tendencia al incremento de la actividad proFO en todos los tratamientos que recibieron bacterias, a diferencia del tratamiento control, con los mejores resultados en T4 y T5. Se observó una mayor concentración de proteínas en SLH en T1 y T5. A partir de los resultados obtenidos se consideró una mejor opción el emplear una mezcla de bacterias, incluyendo la cepa GAtB1 por su efecto inmunoestimulante.

7.3.2 Segundo bioensayo con *L. vannamei*

7.3.2.1 Supervivencia y TCE

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de *L. vannamei* bajo diferentes concentraciones de la mezcla de bacterias. Además, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento final (Pf) ni en el crecimiento absoluto (CA), a excepción del tratamiento T3 (4×10^6 UFC·g^{-1}) donde el CA fue significativamente menor que en el grupo de control C ($p = 0.031$) (Tabla XIX). En la figura 20 se muestra la tendencia promedio en el crecimiento a lo largo del bioensayo. Aunque el tratamiento T1 no muestra diferencias en Pf o CA con respecto al grupo control C, se encontró una diferencia significativa respecto a la tasa de crecimiento específico (TCE) para este grupo ($p=0.029$). No hubo diferencia significativa en la TCE entre el resto de los grupos (Figura 21).

Tabla XIX.- Resumen de los parámetros de supervivencia y crecimiento para los camarones tratados con la mezcla potencialmente probiótica a diferentes concentraciones. Pi= peso inicial, Pf= peso final, CA= crecimiento absoluto, TCE= tasa de crecimiento específico. Los superíndices indican diferencias significativas.

Tratamiento	Supervivencia (%)	Pi (g)	Pf (g)	CA (g)	TCE (%·d^{-1})
C	98.9 ± 0.00	0.98 ± 0.01	4.02 ± 0.06	3.04 ± 0.02^{b}	5.03 ± 0.02^{ab}
T1	98.9 ± 1.92	0.98 ± 0.01	4.25 ± 0.07	3.27 ± 0.14^{b}	5.25 ± 0.11^{c}
T2	100 ± 0.00	0.96 ± 0.01	4.07 ± 0.07	3.10 ± 0.02^{b}	5.14 ± 0.05^{bc}
T3	98.9 ± 1.92	0.96 ± 0.01	3.75 ± 0.07	2.79 ± 0.04^{a}	4.85 ± 0.04^{a}
T4	98.9 ± 1.92	0.97 ± 0.01	4.08 ± 0.06	3.11 ± 0.05^{b}	5.12 ± 0.05^{bc}

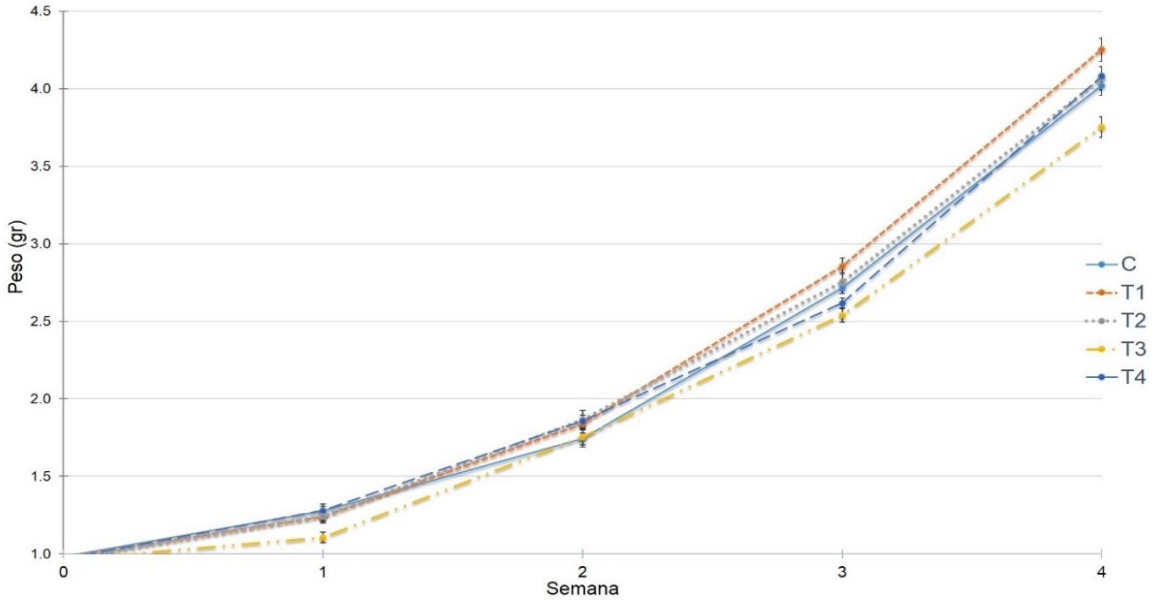


Figura 20.- Crecimiento en peso promedio semanal para los camarones tratados con mezcla de bacterias potencialmente probióticas. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 30.

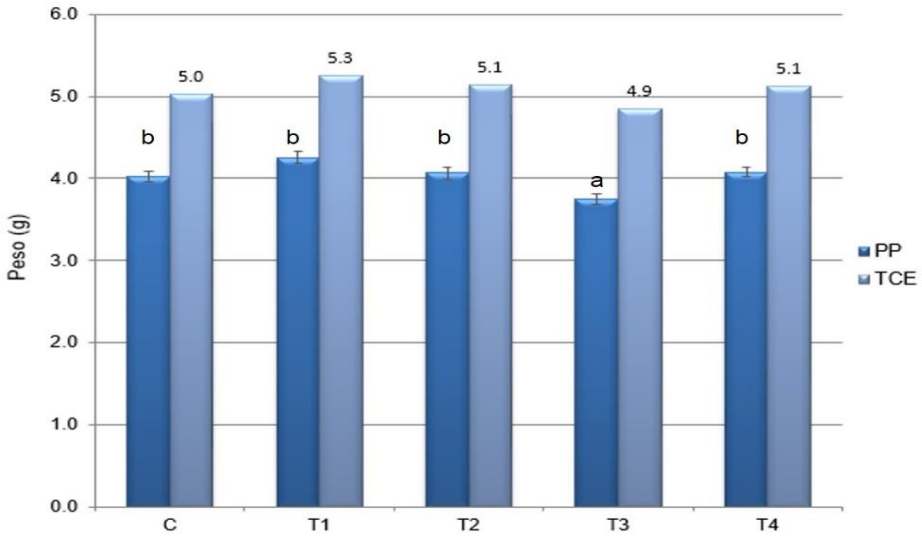


Figura 21.- Peso promedio (PP) y tasa de crecimiento específico (TCE) para los camarones tratados con mezcla de bacterias potencialmente probióticas durante 32 días. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE, n = 30 y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.3.2.2 Prevalencia Viral

Se observó una pérdida natural de las partículas virales en el camarón en el grupo control C, donde la incidencia de WSSV disminuyó un 8% y de IHHNV un 25%, disminuyendo el porcentaje de coinfección (presencia de ambos virus en la misma muestra) 17%. Sin embargo, la prevalencia viral más baja para WSSV correspondió al tratamiento T1 y de IHHNV en el tratamiento T3. La incidencia de coinfección más baja al final del experimento se observó en el grupo T3, mostrando diferencia significativa con el control C ($p<0.05$) (Tabla XX).

Tabla XX.- Porcentaje de camarones infectados con WSSV y/o IHHNV al principio y al final del bioensayo con camarones tratados con diferentes concentraciones de mezcla bacteriana.

	Prevalencia Viral (%)				
Tratamiento	**$WSSV_i$**	**$WSSV_f$**	**$IHHNV_i$**	**$IHHNV_f$**	**WSSV + IHHNV**
C	50	42^{bc}	100	75^{b}	33
T1	50	25^{a}	100	75^{b}	25
T2	50	67^{c}	100	67^{b}	50
T3	50	67^{c}	100	33^{a}	17
T4	50	42^{bc}	100	75^{b}	33

7.3.2.3 Análisis de la expresión génica relativa en hemocitos

Según el análisis de estabilidad realizado empleando el programa Genorm, se descartó el gen EF-α para ser empleado como referencia ya que mostró menor estabilidad (1.252) que los genes β- actina, 40S-S24 (0.412) y L21 (0.528). El análisis de expresión génica relativa para ADNc sintetizado a partir de ARN de hemocitos obtenidos de cada tratamiento, mostró diferencias significativas para

genes de acción antioxidante (SOD) y los relacionados con la actividad inmune (proFO, LvToll y TG) (Figura 22).

En los tratamientos T1 y T2 la expresión relativa de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se encontró por debajo del grupo control C. Solamente en el caso de los camarones expuestos a la mayor concentración de la mezcla bacteriana T4 (6×10^6 CFU·g^{-1}) se observó una sobreexpresión estadísticamente significativa ($p=0.03$) para esta enzima.

El gen que codifica para la enzima profenoloxidasa (proFO) mostró su máxima expresión en el tratamiento T3 con una diferencia significativa de $p=0.0098$ con respecto al grupo contro C. Aunque estadísticamente no se observó diferencia significativa en el resto de los tratamientos, se observa una sobreexpresión para proFO en los tratamientos T2 y T4 por encima del grupo control C, mientras que el grupo T1 muestra una expresión por debajo de C.

La expresión del gen LvToll en hemocitos de camarón en el tratamiento T1 se observó por debajo del grupo control C. A medida que incrementa la concentración de la mezcla bacteriana, se observa una mayor expresión relativa del gen de este receptor, por encima del grupo control C, con diferencias significativas para los grupos T3 ($p=0.011$) y T4 ($p=0.004$).

No se encontraron diferencias significativas para la expresión relativa de la enzima transglutaminasa (TG) ($p=0.1285$).

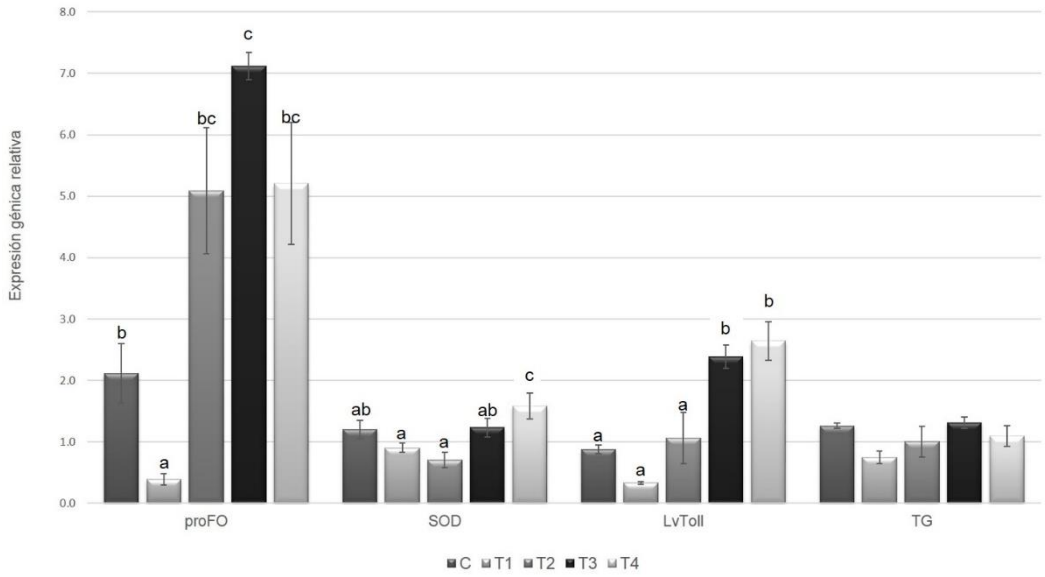


Figura 22.- Expresión relativa de los genes superóxido dismutasa (SOD), profenoloxidasa (proFO), receptor LvToll (LvToll) y transglutaminasa (TG) en hemocitos. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

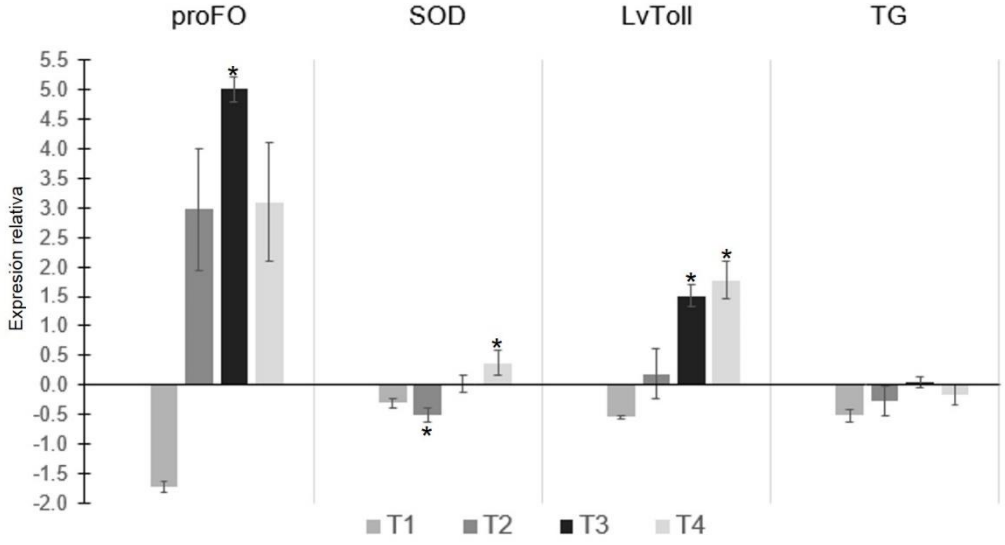


Figura 23.- Expresión génica relativa de la enzima superóxido dismutasa (SOD), profenoloxidasa (proFO), receptor LvToll (LvToll) y transglutaminasa (TG) en hemocitos, respecto al grupo control C. T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}.Las líneas sobre las barras respresentan el EE y los asteriscos señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.3.2.4 Análisis de la expresión génica relativa en hepatopáncreas

Al igual que con el análisis en hemocitos, el gen EF-α mostró baja estabilidad (0.711), por lo que sólo se emplearon los genes 40S-S24, L21 (0.262 para ambos) y β-actina (0.410) como referencia. El análisis de la expresión relativa en hepatopáncreas se llevó a cabo para dos genes digestivos: tripsina (Trip) y catepsina B (Cat-B) y para un gen relacionado con la respuesta a condiciones de estrés, la proteína de choque térmico 70 (HSP70).

No hubo diferencia significativa entre los tratamientos para la expresión de genes digestivos (Figura 24).

Se observó una subexpresión del gen HSP70 significativamente diferente al grupo control C en T1 ($p=0.036$), T3 ($p=0.004$) y T4 ($p=0.003$). Unicamente el control T2 no mostró diferencia significativa respecto al control C.

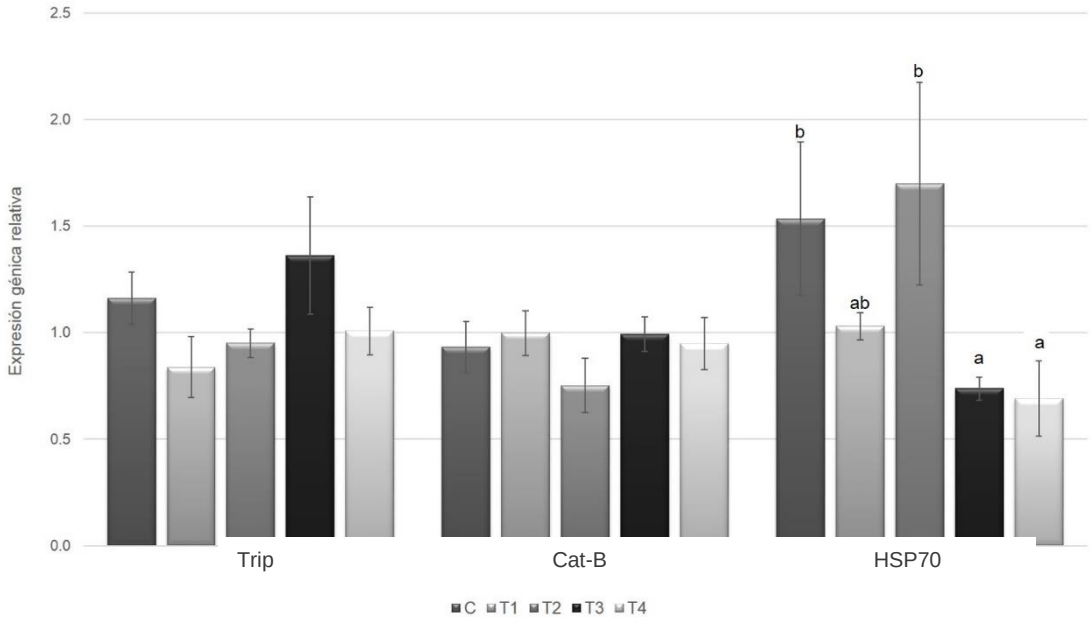


Figura 24.- Expresión génica relativa para tripsina (Trip), catepsina B (Cat-B) y proteína de estrés al calor (HSP70) en hepatopáncreas. C= Control, T1= 10^6 UFC·g^{-1}, T2= 2 ×10^6 UFC·g^{-1}, T3= 4×10^6 UFC·g^{-1}, T4= 6×10^6 UFC·g^{-1}. Las líneas sobre las barras respresentan el EE y las letras señalan señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

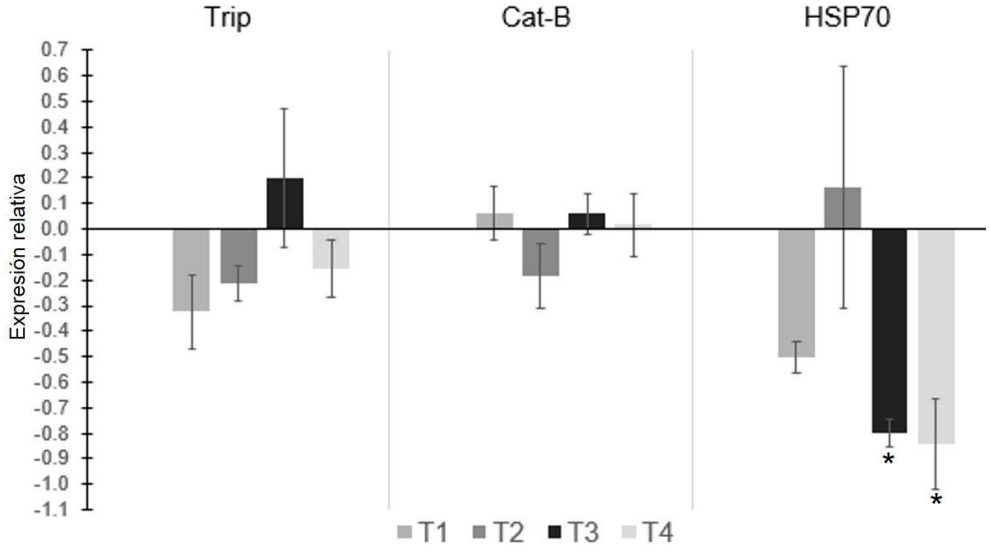


Figura 25.- Expresión génica relativa para tripsina (Trip), catepsina B (Cat-B) y proteína de estrés al calor (HSP70) en hepatopáncreas, respecto al grupo control C. T1= 10^6UFC/g, T2= 2×10^6 UFC/g, T3= 4×10^6 UFC/g, T4= 6×10^6 UFC/g. Las líneas sobre las barras respresentan el EE y los asteriscos señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

En resumen, en cuanto a crecimiento se obtuvo la mejor TCE con el tratamiento T1 (10^6 UFC·g^{-1}). En cuanto a la prevalencia de patógenos virales, se obtuvo la menor incidencia de WSSV en el tratamiento T1, y la menor incidencia de IHHNV con el tratamiento T3 (4×10^6 UFC·g^{-1}). En el tratamiento T3 también se observó la menor incidencia de coinfección. En cuanto a expresión génica relativa, se observó una respuesta significativa en los genes SOD, proFO, LvToll y HSP70. Los tratamientos que mostraron la mayor respuesta en cuanto a expresión de los genes evaluados fueron T3 y T4 (6×10^6 UFC·g^{-1}), con las mayores concentraciones de la mezcla bacteriana.

7.4 EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS BACTERIAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS EN OSTIÓN *C. sikamea*

7.4.1 Evaluación del crecimiento del alimento vivo, microalgas, con bacterias potencialmente probióticas

Durante la evaluación de la interacción de las bacterias probióticas con el alimento vivo se registró una disminución en el crecimiento de las microalgas (*Ig* y *Ch*) que no fue significativa (Figura 26). Igualmente, se pudo observar que el medio de cultivo f/2 empleado para la producción de microalgas, no favorece el crecimiento de las bacterias (C3-C5). Por otro lado, tambien se observó que en presencia de microalgas se incrementa la concentración bacteriana inicial (UFC·mL^{-1}) (Figura 27).

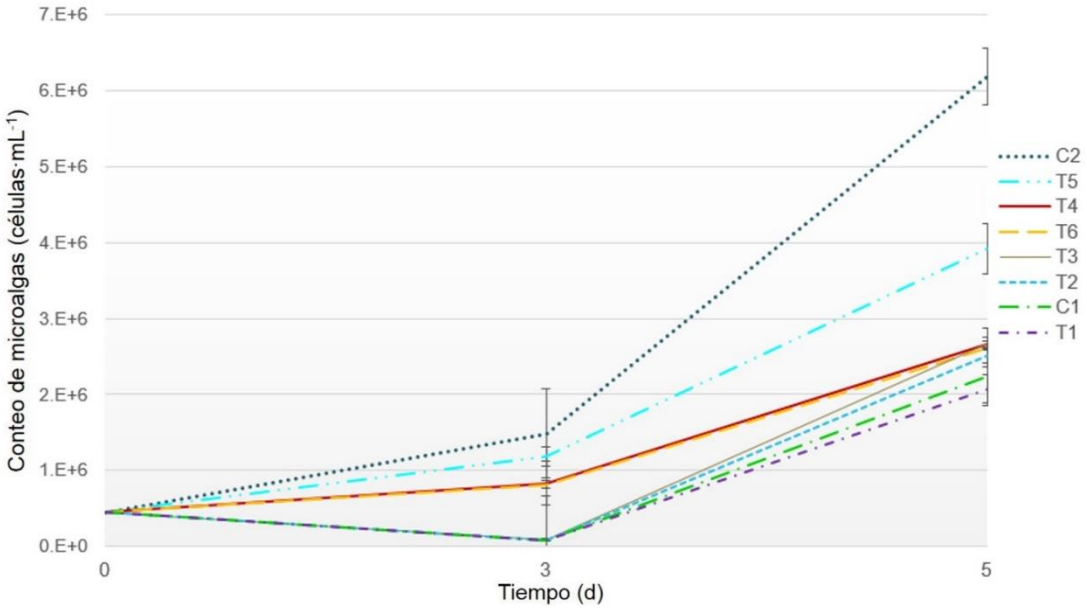


Figura 26.- Crecimiento celular de las microalgas empleadas en el cultivo de moluscos bivalvos en interacción con bacterias potencialmente probióticas. C1= *Isochrysis galbana*, C2= *Chaetoceros calcitrans*, T1= Is+MAt32, T2= Is+MAt43, T3= Is+GAtB1, T4= Ch+MAt32, T5= Ch+MAt43, T6= Ch+GAtB1. Las barras sobre las líneas indican EE.

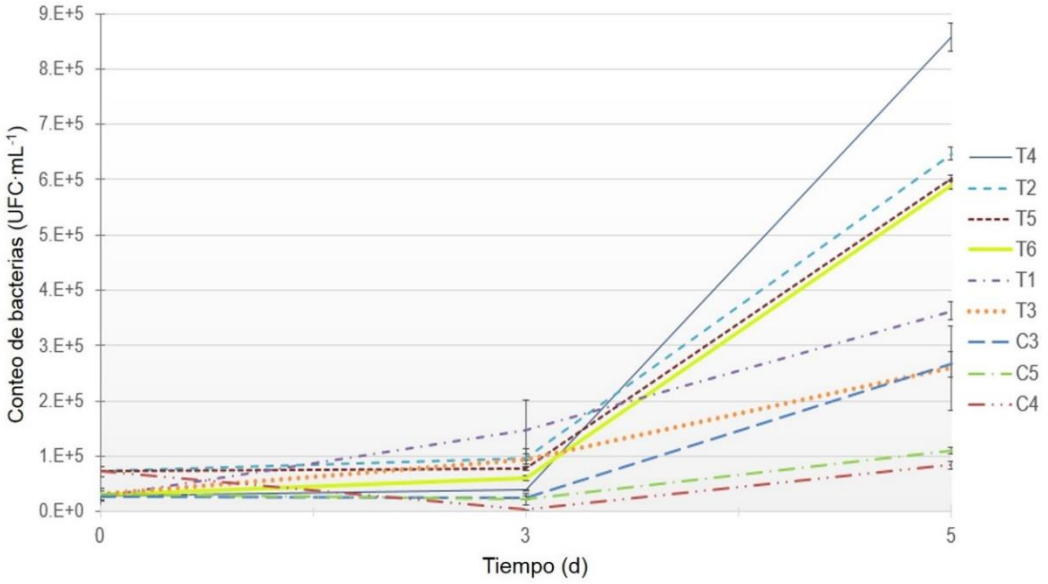


Figura 27.- Crecimiento celular de las bacterias potencialmente probióticas en co-cultivo con microalgas usadas en el cutivo de moluscos bivalvos. C3=MAt32, C4= MAt43, C5= GAtB1, T1= Is+MAt32, T2= Is+MAt43, T3= Is+GAtB1, T4= Ch+MAt32, T5= Ch+MAt43, T6= Ch+GAtB1. Las barras sobre las líneas indican EE.

7.4.2 Evaluación *in vivo* de las bacterias potencialmente probióticas en ostión *C. sikamea*

7.4.2.1 Crecimiento y supervivencia

En la evaluación del crecimiento de las semillas de *C. sikamea* tratadas con bacterias aisladas de TD de *A. tuberculosa,* los análisis estadísticos mostraron tres grupos, el primero, de menor longitud promedio final, conformado por los grupos control C2 y C3, en segundo lugar el control positivo C1 y, finalmente, el tercer grupo integrado por los tratamientos adicionados con bacterias potencialmente probióticas, mostrando el mayor crecimiento promedio (Figura 28). No se presenta diferencia significativa entre los grupos tratados con bacterias, por lo que no se encontró alguna cepa sobresaliente a las demás. No se observó diferencia

significativa en la supervivencia de las semillas de *C. sikamea* tratadas con las bacterias potencialmente probióticas, respecto a los grupos control.

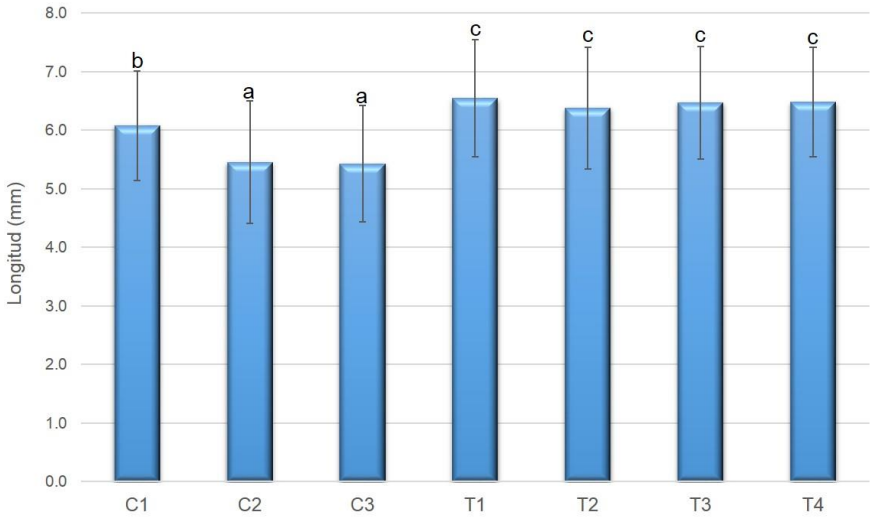


Figura 28.- Crecimiento promedio de las semillas de *C. sikamea* con y sin administración de bacterias potencialmente probióticas antes del reto con *Vibrio*. Las barras de error indican el proemedio ± EE, y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

Al final del bioensayo, posterior al reto con *Vibrio,* se observó una disminución en la talla de los grupos control, debido a la mortalidad de los organismos de mayor talla después de la infección con el agente patógeno (Figura 29). La longitud promedio final conserva la tendencia observada antes del reto, donde los controles C2 y C3 forman el grupo de menor talla, seguidos por el grupo control C1, y los tratamientos tratados con bacterias potencialmente probióticas conforman el grupo de mayor talla, sin diferencia estadística entre éstos (Tabla XXI).

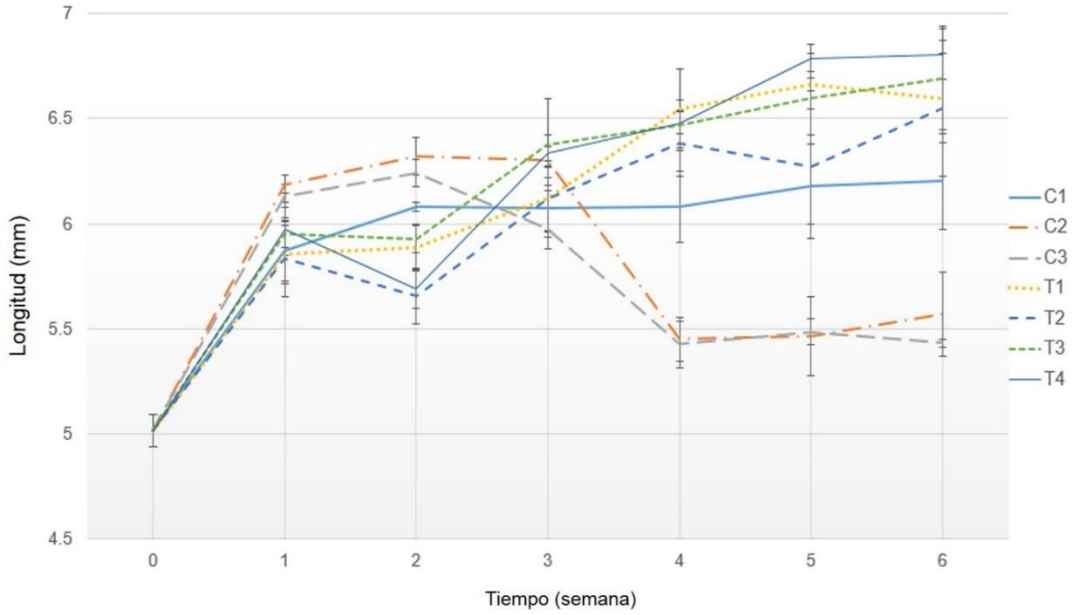


Figura 29.- Crecimiento promedio de las semillas de *C. sikamea* con y sin administración de bacterias con potencial como probióticos durante el tratamiento previo y posterior a la infección con *Vibrio*. Las barras sobre las líneas indican el promedio ± EE.

Tabla XXI.- Resultados del crecimiento final promedio de las semillas de *C. sikamea* tratadas (T1-T4) y sin tratar (C1-C3) con bacterias potencialmente probióticas, posterior al reto con *VIbrio*. A= ancho en mm, L= longitud en mm, EE= error estándar, CA= Crecimiento absoluto, CV = coeficiente de variación. Los superíndices en los valores de longitud indican diferencias significativas $p<0.05$.

	A (mm)	L (mm)	Máx.	Mín.	EE	CA	CV	Modelo de mejor ajuste	R^2
C1	4.40	5.11^{b}	8.00	5.30	0.05	1.19	6.64	$y = -0.0764x2 + 0.6846x + 4.5832$	0.75
C2	4.33	4.96^{a}	7.07	5.05	0.10	0.56	17.61	$y = -0.1411x^2 + 1.002x + 4.4953$	0.69
C3	4.18	4.82^{a}	7.48	5.12	0.08	0.42	15.51	$y = -0.1007x^2 + 0.6939x + 4.7416$	0.71
T1	6.02	6.60^{c}	9.90	5.32	0.13	1.58	17.25	$y = 0.8278\ln(x) + 5.0847$	0.94
T2	5.92	6.55^{c}	10.84	5.95	0.21	1.53	28.33	$y = 0.7289\ln(x) + 5.0867$	0.91
T3	6.35	6.69^{c}	9.83	5.47	0.12	1.68	14.95	$y = 0.8274\ln(x) + 5.1393$	0.95
T4	6.21	6.81^{c}	10.40	5.62	0.11	1.79	15.50	$y = 0.9002\ln(x) + 5.0594$	0.91

La mayor supervivencia se obtuvo en el control blanco C1, al no ser infectado con el patógeno. No se observa diferencia en la mortalidad entre el control negativo C2 y el control con antibiótico C3. En todos los grupos tratados con cepas probióticas se observa una mayor supervivencia que en los controles retados, aunque significativamente menor que en el control no retado C1. Entre los tratamientos con bacteria T1-T4 no se observa diferencia estadísticamente significativa, pero sí se presenta una mayor supervivencia en el tratamiento T3 (Figura 30).

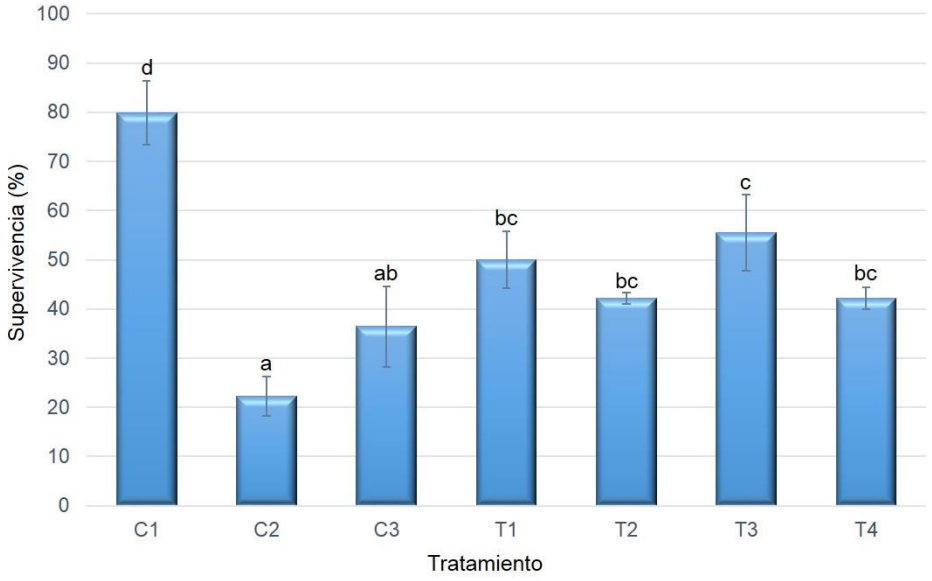


Figura 30.- Supervivencia en semillas de *C. sikamea* sin bacterias (C1-C3) y tratadas con bacterias potencialmente probióticas (T1-T4), posterior a la infección con *Vibrio*. Las barras sobre las líneas indican EE y las letras señalan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.4.2.2 Modulación de microbiota en el agua de cultivo

La microbiota presente en el agua de cultivo presentó variaciones durante el desarrollo del trabajo experimental. Se observó una mayor cantidad de *Vibrio* sp

en los grupos T1 a T4 que en los controles, y una diminución de este grupo en la microbiota interna de los ostiones (TD), en los tratamientos adicionados con bacterias, lo cual sugiere que dichas cepas realmente tienen potencial probiótico.

En el conteo de *Vibrio* sp. se observó un mayor número de UFC en el agua de cultivo de los tratamientos a los que se adicionó bacteria, mientras que, en la microbiota intestinal, al final del bioensayo, el número de UFC fue menor.

7.5 EVALUACIÓN DE ADHESIÓN DE PROBIÓTICOS EN SEMILLAS DE *C. sikamea*

Despues de haber realizado cortes histológicos del TD de semillas de *C. sikamea* con 24 h de inanición que recibieron cultivos bacterianos, se comprobó su ingestión al observar la fluorescencia emitida por dichas bacterias marcadas con DTAF. Las bacterias fueron detectadas en el TD de las semillas de ostión, a tan solo una hora de haberlas agregado al agua de cultivo. Se observaron en baja proporción respecto a la cantidad de microalga aún presente en el TD, a pesar de tener varias h sin administración de alimento, ya que quedó alimento disponible (Figura 31). En los cuadros a, c y e de la figura 31, se observa la fluorescencia roja correspondiente a las microalgas presentes en el TD de *C. sikamea*, sin presencia de bacteria, correspondiente a cada cepa. En otra porción del TD de los mismos organismos, se logra identificar la presencia en baja porporción de las bacterias marcadas con DTAF (Figura 31, cuadros b, d, f). Aún después de 24 h de administración de las cepas bacterianas, éstas fueron detectadas en el TD de *C. sikamea* (Figura 32), cubriendo un mayor área. Aún se observan reminiscencias de fluorescencia roja correspondiente a microalgas para las cepas GAtB1 y MAt42 (Fiura 32 cuadros a, b, c y g, h, i respectivamente), mientras que para la cepa MAt32 se encontraron áreas libres de microalgas donde se presenta una amplia cobertura de bacteria (Figura 32 cuadros d, e, f).

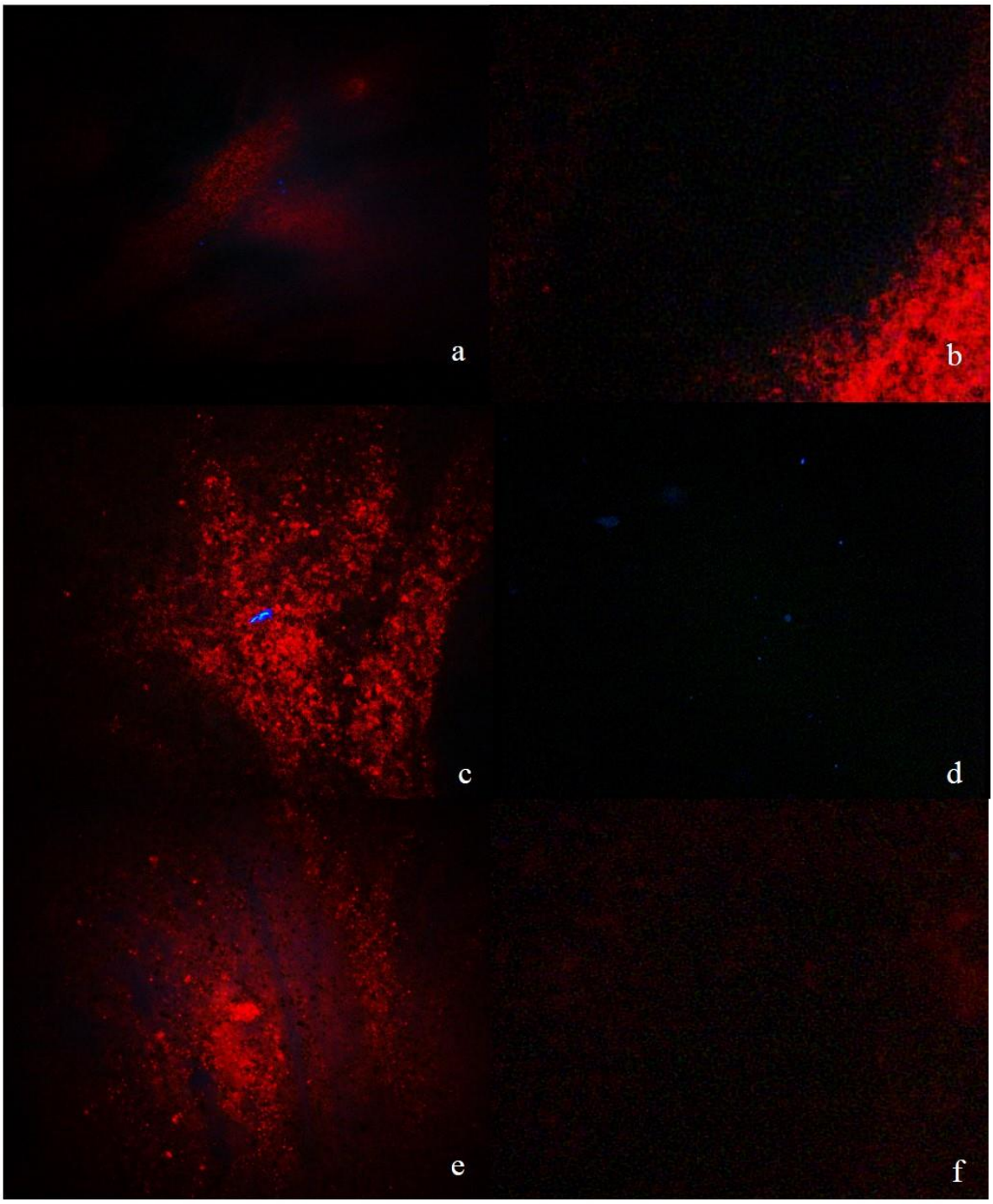


Figura 31.- Prueba de adhesion de bacterias potencialmente probióticas en TD de semillas de *C. sikamea* una hora después de la administración de las cepas GAtB1 (a y b), MAt32 (c y d) y MAt42 (e y f) al agua de cultivo. La fluorescencia verde corresponde a las bacterias y la roja a las microalgas aún en tránsito.

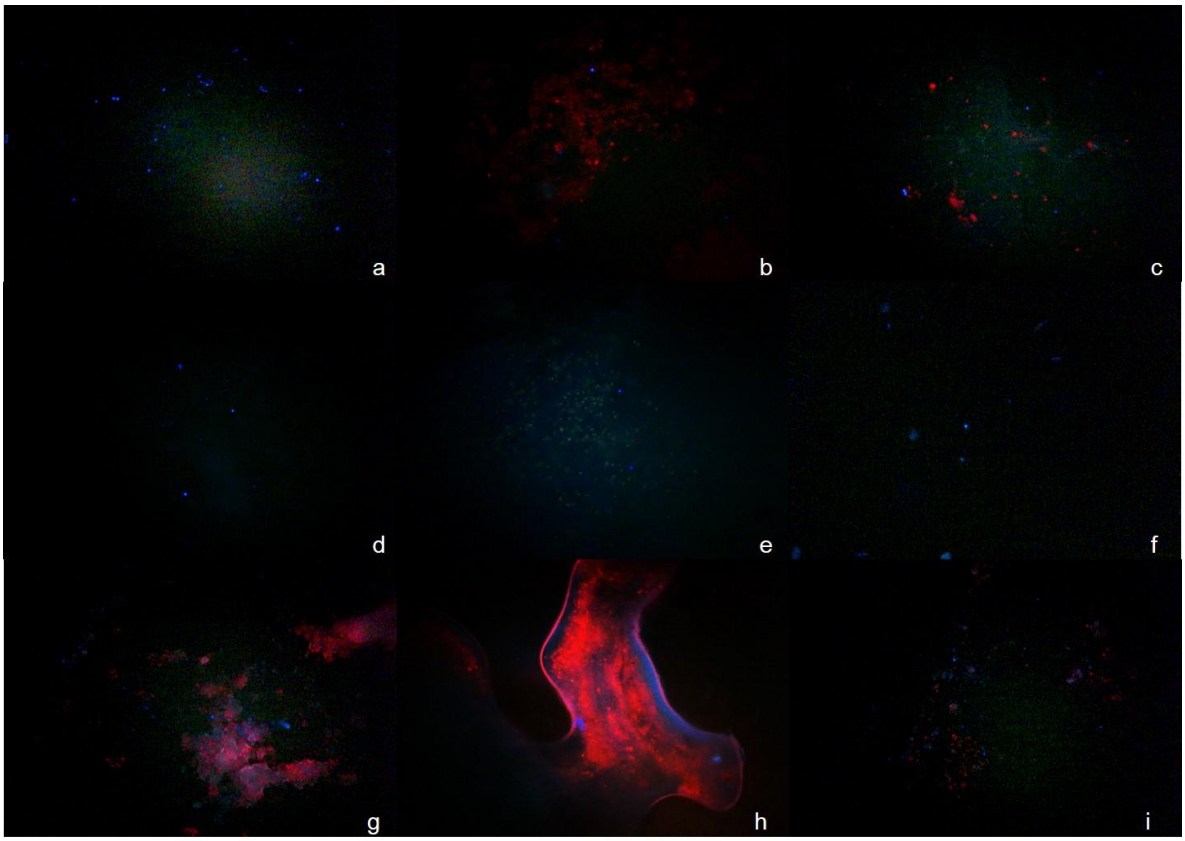


Figura 32.- Prueba de adhesion de bacterias potencialmente probióticas en TD de semillas de *C. sikamea* 24 h después de la administración de las cepas GAtB1 (a, b y c), MAt32 (d, e y f) y MAt42 (g, h e i) al agua de cultivo. La fluorescencia verde corresponde a las bacterias y la roja a las microalgas aún en tránsito.

8 DISCUSIÓN

8.1 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN *in vitro* E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO

La gran capacidad filtradora de los moluscos los convierten en interesantes acumuladores de la microbiota del ambiente (Romanenko *et al.,* 2008), por lo que el estudio de la microbiota asociada a estos organismos también puede ofrecer importante información sobre la comunidad bacteriana presente en su entorno. Esto es particularmente importante en un ambiente donde la acumulación de material orgánico presenta una alta carga bacteriana con amplia distribución.

Los estudios de la comunidad microbiana asociada a moluscos bivalvos marinos son escasos a pesar de la importancia que algunas especies tienen como recurso económico y de consumo regional. Un factor limitante en los estudios de comunidades bacterianas es que se enfocan fundamentalmente al estudio de microorganismos cultivo dependiente (Yap *et al*., 2008).

En muchos de estos estudios se utilizan medios de cultivo generales o selectivos con los nutrientes básicos necesarios para el crecimiento bacteriano en general. Sin embargo, aún hay un gran número de grupos bacterianos no estudiados porque no es posible cultivarlos, debido a que se desconocen sus requerimientos específicos de manejo en laboratorio (Li *et al*., 2003).

Ante esta limitante, se han aplicado nuevas metodologías que emplean técnicas moleculares cuya sensibilidad permite obtener un mayor rango de información basada en material genético derivado de estudios del TD de moluscos bivalvos, basados en el gen 16S rDNA (Muyzer y Smalla, 1998; Beaz-Hidalgo *et al*., 2010; Trabal-Fernández *et al.*, 2012).

8.2 CARACTERIZACIÓN *in vitro* DE LAS CEPAS AISLADAS

Como era de esperarse, en los medios generales (TSA, LB y Medio Marino 2216), se obtuvo una mayor diversidad de morfologías coloniales debido a que no son selectivos y, por tanto, se aislaron un mayor número de cepas del TD de *A. tuberculosa*. En cuanto a los medios selectivos, en TCBS solo se logró aislar una cepa ya que es específico para el género *Vibrio* por su elevada salinidad que impide el crecimiento de otros grupos bacterianos. El medio MRS es selectivo para bacterias ácido lácticas por lo que se esperaba aislar bacterias del género *Lactobacillus*, sin embargo, en este medio también se pudieron encontrar bacterias del género *Bacillus* ya que el medio permite el crecimiento de bacterias gram (+).

La selección de bacterias con acción probiótica se basa en las características deseables para proporcionar un beneficio específico para el huésped, por lo que no son restrictivas (Harris, 1993). Sin embargo, ciertas propiedades se han convertido en prioridad con el fin de seleccionar probióticos seguros y eficaces para la acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000). En este sentido los probióticos deben (1) ser seguros e inocuos para el hospedero y particularmente para el ser humano como consumidor final; (2) no presentar genes de resistencia a virulencia o genes de resistencia a antibióticos; (3) tener potencial de colonización y de replicación en el hospedero; (4) llegar al lugar donde se requiere que permanezca y produzca el efecto desdeado; y algo por demás importante, (5) que proporcione beneficios *in vivo* a un hospedero, confirmando previos resultados *in vitro* (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Una de las principales características a considerar en una especie bacteriana para evaluar su potencial probiótico *in vivo*, es su inocuidad, tanto para el hospedero objetivo como para el ser humano que es el consumidor final de la especie de cultivo. La prueba de hemólisis es una de las aplicables en este sentido, ya que se basa en la capacidad de las bacterias de lisar las células

sanguíneas del hospedero. En la presente investigación se seleccionaron solamente aquellas bacterias con hemólisis γ, es decir, aquellas que no mostraron halo de degradación y por lo tanto no fueron capaces de lisar eritrocitos.

Otro procedimiento importante para evaluar la inocuidad en cepas bacterianas es la prueba de la catalasa. Uno de los mecanismos de defensa que algunos organismos utilizan para combatir una infección bacteriana es la producción de peróxido de hidrógeno, ante lo cual algunos grupos bacterianos han desarrollado la capacidad de producir catalasa. La catalasa es una enzima que cataboliza la descomposición del peróxido en agua y oxígeno por lo que la concentración de esta enzima en la bacteria se ha correlacionado con su patogenicidad. La formación de burbujas o la efervescencia observada al cubrir una muestra de un aislado bacteriano con una gota de peróxido de hidrógeno, demuestra que existe liberación de gas oxígeno y evidencia la presencia de catalasa producida por la bacteria. Dado que un número muy bajo de las cepas fueron negativas a catalasa, esta prueba fue considerada excluyente sólo para las cepas aisladas en medio MRS plus azul de anilina con el fin de eliminar posibles cepas de *Staphylococcus* (Cowan y Steel, 1993).

La presencia en el TD de la pata de mula de los distintos grupos bacterianos presentes en el ambiente depende de las interacciones que se presentan entre las bacterias y el hospedero y una de ellas es la capacidad de adherencia de las bacterias al epitelio gastrointestinal del hospedero. Esta capacidad es uno de los criterios aplicados para la selección de un potencial probiótico (Ouwehand *et al.*, 2000).

La capacidad de adherencia de los aislados obtenidos del TD de *A. tuberculosa* se determinó *in vitro,* en base a la hidrofobocidad de la cepa mostrada por su capacidad de unión al colorante rojo congo y al solvente xileno (Rosenberg et al., 1980). Dichas técnicas resultaron útiles para evaluar de manera no específica el grado de hidrofobicidad de las cepas aisladas y permitieron hacerse una idea de la capacidad de adhesión que podrán presentar los microrganismos

dentro del hospedero. Como estas pruebas no son determinantes, es necesario llevar a cabo un estudio con mucus del bivalvo que podrá proveer mayor información sobre el comportamiento de las bacterias en este sentido.

La capacidad de adhesión de las bacterias a diferentes sustratos se ha asociado a las propiedades de la superficie bacteriana. La relevancia de esta capacidad está dada por la necesidad que tienen las bacterias de adherirse a los tejidos para poder colonizarlo. La adhesión es también importante como un medio para evitar ser eliminadas por los movimientos peristálticos intestinales. La adhesión de bacterias benéficas en un epitelio previene el acceso de bacterias patógenas, al bloquear el espacio que tendrían para interactuar con receptores celulares específicos o anclarse por interacciones estéricas. La adhesión de la bacteria se basa en interacciones físicas no específicas, inicialmente entre la superficie bacteriana y cualquier otra superficie de contacto. Una vez establecido el contacto entre la superficie bacteriana y un tejido particular (en este caso el tejido del TD) se pueden establecer interacciones específicas entre moléculas especializadas o adhesinas de las bacterias y receptores complementarios en las células epiteliales del hospedero, además de las proteínas de la capa-S (Kos *et al.,* 2003; Otero *et al.*, 2004).

Una de las principales características a estudiar en la superficie bacteriana es la hidrofobicidad, ya que puede afectar la capacidad de auto-agregación y adhesión de las bacterias a diferentes superficies (Kos *et al.*, 2003). La adhesión a hidrocarbonos es una técnica rápida y sencilla para medir la hidrofobicidad de la superficie bacteriana de manera no específica (Rosenberg *et al.,* 1980).

En este sentido, se han dividido los ensayos de hidrofobicidad en dos tipos: medidas del ángulo de contacto (CAM por sus siglas en inglés) y adhesión microbiana a hidrocarbonos (MATH por sus siglas en inglés). En éstos últimos se mide la hidrofobicidad en términos de adhesión, es decir, una bacteria hidrofóbica en el sistema *in vitro* se considera como altamente capaz de adherirse al tejido (Otero *et al.*, 2004).

Durante la presente investigación se encontraron tres aislados que mostraron alta hidrofobicidad y cuatro con hidrofobicidad media, incluído el aislado encontrado en medio MRS con anilina, que mostró además, ser catalasa negativo. Las cepas MAt32, MAt35, MAt42, MAt43, MAt100 (provenientes de Bahía Magdalena), GAtB1 y GAtBAL7 (provenientes de Bahía Navachiste) presentaron alta y media hidrofobicidad y por ello fue que se seleccionaron para caracterizar su superficie bacteriana respecto a su capacidad de adhesión a solventes polares.

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana puede estar relacionada con el crecimiento de las bacterias en sustratos hidrófobos, la formación de biofilms, la adhesión a células del hospedero, y la agregación y floculación de las células. Sin embargo, en ocasiones se puede llegar a considerar equivocadamente a una bacteria hidrofílica como hidrofóbica cuando presenta una porción altamente hidrofóbica a pesar de su bajo ángulo de contacto (Rosenberg, 2006).

El xileno es un solvente apolar, mientras que el cloroformo es un solvente monopolar acídico y por tanto aceptor de electrones, por lo que refleja la naturaleza donadora de electrones (básica) de la superficie bacteriana. En cambio, el acetato de etilo es un solvente monopolar básico y por tanto donador de electrones, por lo que refleja la naturaleza aceptora de electrones (ácida) de la superficie bacteriana (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Respecto a la prueba de TAN (tolerancia al nitrógeno amoniacal total) se encontró una alta tolerancia (200 mg/L) a diferencia de Devaraja *et al.* (2013) quienes reportan la inhibición del crecimiento de sus cepas a 25 mg/L. Se ha probado la capacidad de cepas pertenecientes al género *Bacillus* de producir nitrito o nitrato al inocularlas en 10 mL de medio líquido con sulfato de amonio 0.5 g/L, así como de emplear la glucosa y cloruro de amonio como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente.

Después de tres días de incubación, las cepas obtenidas del TD de *A. tuberculosa* que fueron inoculadas en medio con altas concentraciones de amonio

mostraron una biomasa constante o decreciente. La remoción del nitrógeno amoniacal fue atribuida a la nitrificación más que a la formación de biomasa. Sin embargo, no se observaron productos acumulados por lo que se infieren una función desnitrificadora de *Bacillus* sp. bajo condiciones aeróbicas (Yan et al., 2006).

Dependiendo de la fuente de nitrógeno, las bacterias pueden emplear vías distintas para la asimilación del nitrógeno amoniacal, las cuales difieren entre las bacterias gram positivas y las Gram negativas. Son dos las vías principales para la asimilación del nitrógeno amoniacal cuya principal repercusión es la energía requerida para fijar el N_2: (1) la vía de la glutamato deshidrogenasa (GDH) de menor requerimiento energético y (2) la vía de la glutamina sintetasa-glutamato sintetasa (GS-GOGAT) reportada como la vía tradicional para los procariotes fijadores de N_2 (Kanamori *et al.*, 1987). La tolerancia a las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal que se encontró en las bacterias seleccionadas puede proporcionarles un beneficio potencial como fijadores de desecho nitrogenados en el cultivo intensivo de camarón. Sin embargo, para confirmar su potencial efecto biorremediador e identificar la vía de asimilación de nitrógeno que usan, se deben evaluar las bacterias seleccionadas con el fin de determinar la nitrificación, la degradación amoniacal de piensos y la contribución mundial a tasas de regeneración en sistemas intensivos de camarón de acuicultura.

Los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de NaCl (0.5 a 12%), las bacterias seleccionadas, a excepción de la cepa GAtBAL7, presentaron buen crecimiento a concentraciones de hasta 8-9% de NaCl, crecimiento mínimo a 10% y casi nulo a 11 y 12%. Esto concuerda con lo publicado por Powedchagun *et al.* (2011) quienes encontraron en una cepa presumiblemente identificada como *B. subtilis*, la capacidad de crecer en concentraciones de NaCl de hasta 8%. De alguna manera, esto concuerda también con el ambiente marino del cual provienen los moluscos de cuyo TD se obtuvieron los aislados. La tolerancia a la salinidad es una propiedad muy

importante y deseable para potenciales probióticos debido a la amplia gama de salinidades que pueden encontrar en su tránsito por el anfitrión y el medio ambiente acuático, cuando se tiene el propósito de utilizarlos en especies marinas como ostión y camarón.

Las bacterias altamente hidrofóbicas muestran una alta capacidad de auto-agregarse por lo que su habilidad de agregación se relaciona con las propiedades de adhesión de la célula (Kos *et al.*, 2003). La presencia de diferentes concentraciones de sulfato de amonio puede incrementar dicha capacidad hasta cierto grado aún en bacterias de mediana o baja hidrofobicidad (Otero *et al*., 2004).

Las proteínas de la superficie bacteriana están relacionadas con la auto-agregación y adhesión de las bacterias, por lo que probablemente son los primeros mediadores en el proceso de adhesión (Otero *et al*., 2004). La presencia de material protéico (glicoproteínas) en la superficie celular resulta en una mayor hidrofobicidad, mientras que las superficies hidrofílicas se asocian con la presencia de polisacáridos. Por esta razón, las moléculas de superficie sensibles a la pronasa y a la pepsina son responsables de la hidrofobicidad en la bacteria. Sin embargo, tanto proteínas como carbohidratos están involucrados en el proceso de adhesión, siendo las glicoproteínas de la capa S las que se unen a las lectinas de las células epiteliales intestinales (Kos *et al*., 2003).

Kos *et al.* (2003) encontraron que la capacidad de auto-agregación de las bacterias puede variar ligeramente por factores tales como las diferencias en el crecimiento de las bacterias en medio líquido y sólido, y pH muy bajo (2.8), mientras que el tratamiento con enzimas proteolíticas como pepsina o pronasa puede eliminar tanto la capacidad de auto-agregación como la hidrofobicidad de la bacteria, al remover las proteínas de la capa S que están involucradas en la protección y reconocimiento de la célula, por lo que probablemente son los primeros mediadores en el proceso de adhesión. Los autores también encontraron que las proteínas son las moléculas mediadoras del proceso de auto-agregación.

La capacidad de co-agregación puede constituir un importante mecanismo de defensa para el hospedero en contra de infecciones en el TD (Reid *et al*., 1988).

Los procesos y mecanismos de interacción entre las bacterias y su anfitrión todavía siguen siendo desconocidos (Tuan *et al*., 2013). Se ha planteado la hipótesis de que una de las funciones que pueden desempeñar dentro del huésped es la producción de enzimas extracelulares capaces de hidrolizar los sustratos presentes en el alimento disponible en el TD, y así facilitar su absorción en beneficio del hospedero (Ziaei-Nejad *et al.,* 2006; Wang, 2007). En este estudio, se demostró la capacidad de los aislamientos para degradar los diferentes sustratos de la proteasa.

Se sabe que algunas bacterias son capaces de producir metabolitos que funcionan como antimicrobianos (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005), inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas. También pueden limitar el crecimiento de bacterias patógenas por competencia por el espacio o zona de adhesión o por competencia por los nutrientes. En este trabajo se probó la capacidad de las cepas aisladas de competir contra una cepa de *V. alginolyticus* e inhibir su crecimiento y crecer a pesar de la presencia del patógeno, limitando así su crecimiento por competencia. Sin embargo, no se encontró un halo de inhibición de crecimiento del patógeno, y no fue posible detectado en alguna de las cepas evaluadas por su potencial efectop probiótico, la capacidad de producir algún metabolito que inhiba el crecimiento de *Vibrio*.

8.3 EVALUACIÓN *in vivo* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE LAS CEPAS BACTERIANAS

8.3.1 Evaluación *in vivo* de las bacterias seleccionadas en cultivos experimentales de *L. vannamei*

8.3.1.1 Primer bioensayo con *L. vannamei*

Los beneficios generales que el uso de los probióticos pueden conferir a su hospedero son: mejora en el crecimiento y eficiencia alimenticia, estimular la respuesta del sistema inmunológico, el aumento de la resistencia a enfermedades, e incluso mejorar la calidad del agua. Sin embargo, aún son necesarios más estudios para comprender a fondo los mecanismos desencadenados por los probióticos para llevar a cabo su efecto benéfico. Las investigaciones recientes parecen mostrar que los probióticos son más eficaces cuando se usan en las primeras etapas del desarrollo del hospedero (Tuan *et al.*, 2013).

El ensayo *in vivo* con juveniles de camarón blanco, fue un primer intento para evaluar el potencial probiótico de las bacterias seleccionadas del TD de *A. tuberculosa*, en especies de gran interés acuícola y alto valor comercial. Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos para camarón tigre *P. monodon* por Rengpipat *et al.* (2000), quienes no encontraron diferencias significativas en el peso promedio, pero sí en el recuento de hemocitos. El aumento del CTH en el camarón blanco cuando se administró GAtB1, presumiblemente *B. subtilis subtilis*, sugiere que esta cepa tiene potencial probiótico y es un buen candidato para uso en acuicultura, pero aun se requieren más estudios.

Se recomienda probar las cepas de *Bacillus* sp. (MAt32, MAt42, MAt43, GAtB1) en cultivos de larvas de camarón blanco *L. vannamei* ya que el potencial de *Bacillus* sp. para mejorar la supervivencia larvaria en esta especie ya se ha

demostrado (Luis-Villaseñor *et al.,* 2011). Particularmente, *B. subtilis* (MAt43, GAtB1) y *B. licheniformis* (MAt32, MAt42) son potenciales probióticos para el cultivo de camarón como se ha publicado anteriormente (Zhang *et al.*, 2011).

El uso de mezclas probióticas puede ser más conveniente que emplear las cepas aisladas, como se observó en el tratamiento T6, ya que los probióticos multi cepas o multi especies pueden actuar en sinergia al incluir bacterias con modos de acción diferentes y complementarios, lo cual incrementa el efecto probiótico protector de la mezla (Timmerman *et al.*, 2004).

8.3.1.2 Segundo bioensayo con *L. vannamei*

Se ha documentado la capacidad estimulante de la microbiota en la respuesta temprana, activando el sistema inmune del huésped, mejorando el crecimiento, la eficiencia de la alimentación y la resistencia a enfermedades (Sanz *et al.*, 2004; Vrieze *et al.*, 2010).

En este trabajo se evaluaron las diferencias en el nivel de la abundancia de transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune, la actividad enzimática y la respuesta al estrés en el camarón. Los resultados obtenidos fueron asociados al suministro de una dieta comercial enriquecida con bacterias potencialmente probióticas. Se asume que estos tratamientos propiciaron una respuesta a una infección viral ante WSSV e IHHNV, ya que se ha encontrado expresión diferencial para otras especies (de Lorgeril *et al.*, 2005; Wang y Gu, 2010).

Entre las enfermedades que afectan a los camarones peneidos, las más extendidas y frecuentes son aquellas aasociadas a infecciones virales con el síndrome de la mancha blanca (WSSV) y el virus de la necrosis hipodérmica hematopoyética infecciosa (IHHNV) (Lightner y Redman, 1998). Aunque no se observen signos clínicos, una infección dual a menudo puede estar presente, ya

que altos porcentajes de co-infección con WSSV y IHHNV han sido reportados en *L. vannamei* de alrededor del 60% (Otta *et al*., 2014) y 75% (Yeh *et al*., 2009).

En este estudio el porcentaje inicial de infección con ambas partículas virales del stock de camarones fue del 50%, de la cual se observó una pérdida natural, según se observó el el grupo control, en el que el porcentaje de co-infección disminuyó a 33%. Wang *et al.* (2002) encontraron que los hemocitos hialinos son más resistentes a la infección por WSSV en *Penaeus merguiensis*, por lo tanto, el uso de aditivos inmunoestimulantes como los probióticos que estimulan el aumento en el número de hemocitos circulantes, pueden aumentar la resistencia y supervivencia en camarones infectados. En este sentido, la cepa GAtB1, incluida en la mezcla bacteriana aplicada a los cultivos de camarones, previamente mostró su capacidad para estimular el incremento de hemocitos circulantes en camarón blanco. Esto podría explicar la disminución en la carga viral encontrada en los tratamientos T2 y T4 (WSSV e IHHNV, respectivamente), aunque no para ambos virus en el mismo tratamiento. En el tratamiento T3 se encontró una importante reducción en el porcentaje de infección dual (17%). Leyva-Madrigal *et al*. (2011) encontraron una disminución en la prevalencia de WSSV en *L. vannamei* al adicionar bacterias ácido lácticas en el alimento, pero no encontraron disminución de IHHNV. Probablemente, las bacterias adicionadas al alimento de los camarones, tienen un efecto protector contra WSSV e IHHNV por la activación de las defensas del sistema inmune, así como por exclusión competitiva como describe Rengpipat *et al.* (2000) en *P. monodon* alimentado con *Bacillus* S11. Los componentes de la pared celular de las bacterias (peptidoglicanos y lipopolisacáridos) son responsables de su efecto inmunoestimulador (Rengpipat *et al.,* 2000).

Con el fin de analizar el nivel de expresión de los genes de interés por qPCR es necesario seleccionar genes constitutivos, que presenten un nivel de expresión constante en diferentes condiciones. Estos son considerados como genes de referencia. Uno de estos genes es EF-α, que ha demostrado ser una

buena referencia en *Solea senegalensis* e *Hippoglossus hippoglossus* (Infante *et al.*, 2008), así como en el sistema reproductivo del camarón tigre (Leelatanawit *et al.*, 2012) y en camarón azul (Dhar *et al.*, 2009). Sin embargo, en este trabajo, EF-α fue el gen menos estable para las muestras tanto de hemocitos como de hepatopáncreas, por lo que no fue considerado dentro de los genes de referencia.

Este resultado no es tan inesperado ya que se ha demostrado que un buen gen de referencia en una especie puede no ser tan bueno para otra, aunque sean filogenéticamente cercanas (Teng *et al*., 2012). Es por eso que la validación es un importante primer paso en el análisis qPCR.

La fagocitosis es una respuesta del sistema inmune que tiene lugar durante una invasión microbiana, durante la que se producen especies reactivas del oxígeno (ROS) y productos intermedios (ROI). Uno de los primeros productos en liberarse durante el estallido respiratorio o explosión oxidativa, es el anión súper óxido (O_2^-). Para evitar el daño celular por O_2^- se desssencadena una respuesta antioxidante donde la enzima superóxido dismutasa (SOD) juega un papel importante (Holmblad y Söderhäll, 1999). Por esta razón, la SOD se ha utilizado como un parámetro de referencia para evaluar la respuesta del camarón blanco *L. vannamei* a los inmunoestimulantes (Campa-Córdova *et al.,* 2002; Ji *et al.,* 2009).

A pesar de que en este estudio no se evaluó la actividad enzimática de SOD, ni la concentración de O_2^- directamente, la expresión del gen que codifica para SOD se puede relacionar con la respuesta antioxidante de los camarones ante aditivos inmunoestimulantes de acuerdo a lo encontrado por Ji y *et al*. (2009). Ji y su equipo de trabajo encontraron un incremento en la producción de O_2^- en camarones (*L. vannamei*) inyectados con diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), correspondiente a una sobre expresión del gen SOD. Campa-Córdova *et al*. (2002) encontraron una mayor respuesta en la actividad SOD en camarones expuestos por el período más largo (seis días) a inmunoestimulantes, seguido por un decremento en la respuesta por debajo del grupo control. Esto se puede relacionar con una sobre

expresión significativa en SOD ante una estimulación bacteriana en los tratamientos T3 y T4, donde se adicionó la mayor concentración bacteriana, mientras que a la menor concentración (T2= 10^6 UFC·g^{-1}) se observó un decremento en la expresión por debajo del grupo control. Estos resultados demuestran que la adición de una mezcla de bacterias potencialmente benéficas, puede modular la enzima SOD a un nivel de expresión génica en camarón blanco. Ya que todos los tratamientos presentan infección por WSSV e IHHNV, los resultados sugieren que la diferencia en la explosión respiratoria entre tratamientos, especialmente a las mayores concentraciones de aditivo, fue consecuenci de la adición de la mezcla bacteriana al alimento.

El sistema profenoloxidasa (proFO) es una vía importante en la respuesta inmune en los camarones ya que no presentan respuesta adaptativa. El sistema proFO implica varios factores que actúan en una cascada enzimática (Sritunyalucksana y Soderhall, 2000). Los PAMPs en la pared celular de los microorganismos pueden incrementar la actividad fenoloxidasa (FO) (Perazzolo y Barracco, 1997). La transcripción de la proFO en hemocitos encontrada en informes recientes (Ji *et al.,* 2009) sugiere que la regulación de la proFO en la transcripción y el nivel de traducción pueden variar. La respuesta inmune del sistema proFO a diferentes tipos de PAMP se basa principalmente en el cambio de una serina proteinasa de una forma inactiva a una forma activa y no en el aumento en los niveles de expresión génica de proFO (Sritunyalucksana *et al.*, 1999).

En otros trabajos se reporta que el sistema proFO no responde a un nivel de expresión génica (Okumura, 2007; Wang *et al.*, 2008). En este trabajo, la adición de la mezcla de bacteras incrementó la expresión génica de proFO en los grupos T2, T3, y T4. Una sobre-expresión similar fue encontrada en *L. vannamei* alimentado con inmunoestimulantes microbianos (Luna-González *et al.*, 2013). La inhibición de la proFO en hemocitos en *L. vannamei*, sugiere que el sistema FO no es una respuesta inmediata ante la infección por WSSV (Ai *et al.*, 2008). Con base

en lo anterior, se infiere que el incremento significativo encontrado en el grupo T3 puede no haber sido desencadenado por la infección viral dual sino ser una respuesta del efecto estimulante debido a la adición de la mezcla bacteriana, así como en los grupos T2 y T4. La adición de una mezcla de bacterias potencialmente benéficas tuvo un efecto en el nivel de expresión génica de la enzima proFO.

La señalización de los receptores Toll es esencial en la mediación del efecto anti inflamatorio de los probióticos (Rachmilewitz *et al*., 2004). Los patrones de expresión de Toll son claramente modulados después de la estimulación bacteriana o viral (Li y Xiang, 2013). Cuando una infección bacteriana ocurre, el receptor LvToll 1 es sobreexpresado, mientras que los receptores LvToll2 y LvToll3 demuestran ser sobreexpresados después de una infección con WSSV (Wang *et al.,* 2012).

El incremento en la expresión del gen LvToll en los tratamientos con la mayor concentración de mezcla bacteriana añadida, sugiere que el receptor LvToll 1 es el principal responsable para tal resultado. Sería interesante distinguir la expresión diferencial entre los tipos de receptores de tipo Toll en *L. vannamei* con los tratamientos aplicados, ya que la toma de muestra se llevó a cabo al final del cultivo, por lo que podría ser un factor de variación en la expresión de las variantes del receptor LvToll.

La transglutaminasa tiene un papel importante en la coagulación, pero también se ha asociado con el sistema de defensa contra la infección por patógenos del tipo bacteriano y fúngico, debido a que participa en la regulación de ciertos genes tales como la lisozima y crustina en el camarón (Fagutao *et al.*, 2012). Se ha encontrado que la subexpresión de TG después de una infección viral o bacteriana, puede ser resultado de los efectos patogénicos en el sistema inmune de los camarones infectados (Yeh *et al.*, 2009).

Luna-González *et al.* (2013) observaron un incremento significativo en la expresión de TG al incorporar 8.5 $mg \cdot kg^{-1}$ de alimento de una mezcla de inmunoestimulantes microbianos (BAL y levadura) en *L. vannamei*. Sin embargo, dicha diferencia fue observada solo en el tratamiento donde se aplicó la mezcla microbiana diariamente, mientra que, en este trabajo, la preparación bacteriana fue administrada cada 48 h, la cuál puede ser causante de que no se encontrara diferencia significativa en la expresión de TG.

Lin *et al.* (2004) encontraron que la adición de *Bacillus* a una tasa de inclusión al alimento del 3% en dietas experimentales, puede aumentar la digestibilidad aparente de los nutrientes en *L. vannamei*. Los resultados presentados contrastan con Zokaeifar et al. (2012) quienes reportan un aumento en la actividad de la proteasa medido en los camarones alimentados con dietas suplementadas con dos cepas de *B. subtilis* a dos diferentes dosis: 10^5 y 10^8 $UFC \cdot g^{-1}$. Cabe mencionar que ellos presentan la actividad de proteasa total medida por métodos bioquímicos después de ocho semanas de cultivo, encontrando la más alta actividad enzimática a la mayor concentración de bacterias. Además, aunque no se encontraron diferencias estadísticas, el grupo T3 muestra un mayor nivel de expresión de tripsina al comparar con el grupo control C. Las concentraciones evaluadas de la mezcla de bacterias potencialmente probióticas no fueron suficientes para provocar un efecto a nivel de expresión génica en el caso de las enzimas digestivas tripsina y catepsina B.

La proteína de estrés térmico (HSP70) pertenece a una familia de proteínas que son inducidas por una variedad de contaminantes ambientales, por lo que han sido empleadas como biomarcadores de estrés ambiental (Werner y Hinton, 1999; Clark y Peck, 2009). Se ha identificado que HSP70 también responde ante una infección bacterial (Eisenhut, 2008) y viral (Espigares *et al.*, 2006). Además, se han identificado polimorfismos en el gen que transcribe para HSP70 entre algunas poblaciones de *L. vannamei* resistentes a las infecciones virales (Zeng *et al.*, 2008).

Werner y Hinton (1999) encontraron que tanto el incremento como el decremento en la regulación de las proteínas HSP70 puede ser indicador de estrés en *P. amurensis*. Se ha sugerido también que, además de su papel como chaperona (Caplan *et al.*, 1993), la HSP70 puede jugar un papel en la respuesta inmune en el camarón (Zhou *et al.*, 2010) en la inducción de la secreción de citocinas proinflamatorias (Dieterle y Wollenhaupt, 1996).

La sub expresión del gen HSP70 encontrado en los tratamientos T1, T3 y T4 sugiere un menor nivel de estrés, pero también una respuesta derivada del efecto inmunoestimulador de la mezcla bacteriana. De acuerdo a Dieterle y Wollenhaupt (1996) y Rachmilewitz *et al*. (2004), la subexpresión de HSP70, de efecto proinflamatorio, concuerda con la sobreexpresión del receptor LvToll de efecto antiinflamatorio en T1, T3 y T4.

En *L. vannamei* se han observado dos tipos de patrones de expresión diferencial que podrían estar asociados con algunas de las respuestas inmunológicas observadas tras el reconocimiento de los componentes microbianos. Estos patrones se han relacionado con la predisposición de los camarones a un estado de alta capacidad de respuesta inmune. Los dos patrones observados difieren en el tiempo de respuesta y la duración de la misma; en el primer modelo, el tiempo para alcanzar un nivel significativamente diferente es corto pero no dura mucho, en el segundo, la respuesta es gradual pero prolongada (Wang *et al*., 2008). En este trabajo se observaron ambos patrones, donde las diferentes concentraciones de mezcla bacteriana añadida confieren respuestas distintas. Se distingue la respuesta del tratamiento T1, donde, a la concentración más baja de bacterias, se observa una expresión de los genes proFO, SOD y LvToll por debajo del grupo control, mientras que, a mayores concentraciones de la mezcla bacteriana, se encuentra una sobre expresión de proFO, LvToll (T3 y T4) y SOD (T4), por encima del grupo control C.

8.3.2 Evaluación *in vivo* de probióticos en semillas de *C. sikamea*

La interacción entre bacterias y microalgas puede tener resultados benéficos o adversos dependiendo de la especie y condiciones particulares de cada caso. En la Figura 33 se observa un esquema generalizado del tipo de interacciones que pueden tener lugar entre una bacteria y una microalga. La capacidad de crecimiento de una microalga ante la presencia de una bacteria puede depender de la fase de crecimiento de la primera. Por ejemplo, en *Thalassiosira rotula* la densidad celular es mayor cuando es expuesta a bacterias marinas durante su fase de crecimiento exponencial mientra que, en su fase estacionaria, la densidad celular del alga disminuye (Grossart *et al.*, 2006). Esta respuesta depende de la especie de bacteria y de la concentración de nutrientes y vitaminas en el medio (Gurung *et al.,* 1999; Grossart y Simon, 2007). Probablemente, una mejor estrategia para evaluar la viabilidad del cocultivo de bacterias potencialmente probióticas con microalgas utilizadas como alimento de bivalvos, sería administrarlas después de su fase de adaptación, es decir, durante el crecimiento exponencial de la microalga.

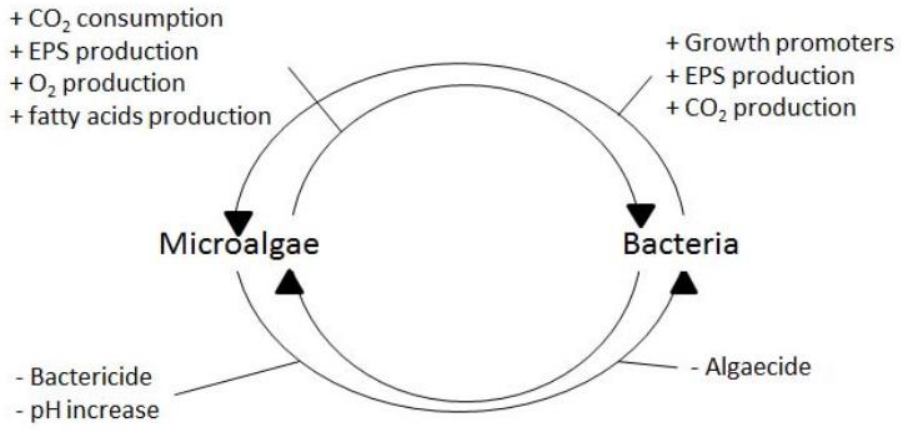


Figura 33.- Interacción bacteria-microalga. Fuente: Riquelme y Avendaño-Herrera (2003).

La supervivencia, crecimiento y composición bioquímica en moluscos bivalvos marinos, son buenos indicadores del efecto de la administración de probióticos en pruebas *in vivo* (Abasolo-Pacheco *et al.*, 2015).

En juveniles de 2-2.5 mm de ostra perlera *Pinctada mazatlanica*, se ha encontrado mayor crecimiento y un incremento de hasta el 65% en la supervivencia al administrar levaduras marinas y una mezcla de *Bacillus*, e incluso mayor (hasta 72%) al administrar *Lactobacillus* (Aguilar-Macías *et al.*, 2010). En concordancia con la presente investigación en semillas de ostión Kumamoto *C. sikamea*, la aplicación de antibióticos en *P. mazatlanica* no logró incrementar la supervivencia ni el crecimiento en semillas.

Particularmente en juveniles de *Crassostrea sikamea*, al igual que en este trabajo, se ha obtenido un mayor crecimiento en menor tiempo al ser tratados con una mezcla probiótica (Abasolo-Pacheco *et al.,* 2015), resultados similares se observan con *Crassostrea corteziensis* (Campa-Córdova *et al*., 2009). El incremento en el crecimiento puede estar dado gracias al mejoramiento del estado nutricional y de digestibilidad del alimento en el hospedero, asociados a a adición de bacterias probióticas. Esto se ha observado en juveniles de abulón *Haliotis midae* cuando se les proporcionó una cepa probiótica de *Pseudoalteromonas* (Doeschate y Coyne, 2008).

Dependiendo de su virulencia, *Vibrio* es capaz de neutralizar los hemocitos de bivalvos marinos por medio de eficientes citotoxinas, disminuyendo su capacidad fagocítica y, por tanto, la respuesta inmune del hospedero (Lambert y Nicolas, 1998).

Silva-Aciares *et al.* (2013) observaron un efecto protector de organismos probióticos en *Haliotis fulgens* infectado con *V. parahaemolyticus*. En el estudio mencionado, Silva-Aciares y sus colaboradores observaron un incremento en la supervivencia y crecimiento de *H. fulgens*, además de una expresión diferencial en genes involucrados en diversos procesos biológicos como: formación de

citoesqueleto, comunicación celular, diferenciación y desarrollo, inmunidad, metabolismo general, proteínas de estrés, y respiración celular, al aplicar probióticos. La diferencia en crecimiento y supervivencia en *H. fulgens* ante un reto con *V. parahaemolyticus* fue relacionada con un incremento en la proporción de hemocitos fagocíticos en organismos tratados con probióticos, además del decremento en la capacidad fagocítica en los organismos no tratados e infectados con el patógeno.

En el estudio anterior se encontró una mayor concentración de células de *Vibrio* en los organismos no tratados con probiótico, al igual que sucedió en un estudio en *Crassostrea gigas* (Xi *et al.*, 2014), donde encontraron que la adición de 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus plantarum* logró reducir el número de *V. parahaemolyticus* en el cultivo de los ostiones.

En otra especie de abulón, *Haliotis discus*, se encontró una mortalidad de hasta 80% en juveniles retados con *V. harveyi*, mientras que la implementación de dos especies de *Shewanella* disminuyeron la mortalidad en un 30-50% aproximadamente debido a un incremento en la respuesta inmune celular y humoral, al incremento de hemocitos circulantes, actividad lisozima en suero, y mayores niveles de proteína (Jiang *et al.*, 2013).

En este estudio, el control negativo mostró una mortalidad del 80% mientras que en los grupos tratados con bacterias potencialmente probióticas, la mortalidad fue del 60 al 50%. En base al efecto inmunoestimulante y protector que ofrecen los organismos de potencial probiótico en otros moluscos, reportado en los trabajos mencionados arriba, y dado el efecto antioxidante e inmunoestimulante y una mayor concentración de genes del sistema inmune observado en camarón al aplicar las cepas aisladas del TD de *A. tuberculosa*, se infiere que la supervivencia de las semillas de *C. sikamea* tratadas con bacterias potencialmente probióticas ante un reto con *V. parahaemolyticus,* puede ser debido a un efecto inmunoestimulante de las cepas empleadas en el cultivo de semillas de *C. sikamea.*

Los organismos que mejoran su condición inmunológica por la adición de probióticos se encontrarán menos estresados, por lo que reducirán su consumo de energía, teniendo más energía disponible para el crecimiento. Los organismos tratados con probióticos son menos susceptibles, manteniendo una mayor homeostasis metabólica, por lo que disminuye su mortalidad aún ante la invasión de un patógeno (Silva-Aciares *et al*., 2013). Al observar una disminución en el porcentaje de mortalidad de las semillas de *C. sikamea* tratadas con bacterias potencialmente probióticas, se infiere que los organismos tratados tuvieron una mejor condición inmunológica que los grupos no tratados expuestos al patógeno.

8.4 Evaluación de adhesión de probióticos en semillas de *C. sikamea*

Hong *et al*. (2005) mencionan que no hay evidencia de colonización permanente en el TGI del hospedero por parte de bacterias no patogénicas, formadoras de esporas, pero que dicho proceso puede estar determinado por la interacción de la especie bacteriana con el hospedero y probablemente por factores fisiológicos y por las características de la dieta. En intestino de aves, se ha documentado la persistencia de *B. subtilis* hasta 36 días después de la administración de una alta dosis de esporas (2.5×10^8) (La Ragione *et al.*, 2001; La Ragione y Woodward, 2003). En cambio, durante un estudio de cepas probióticas de *Bacillus* en ratón, el su tiempo de tránsito intestinal mostró cuentas viables en heces apenas significativas después de quince días de su administración (Duc *et al*., 2004).

La adhesión de la célula vegetativa al epitelio de la mucosa, como se había discutido con anterioridad, puede estar ligada a la participación de las proteínas de la capa-S (Kos *et al*., 2003; Otero *et al.,* 2004) la cual se encuentra presente en varias especies de *Bacilus* (Sidhu y Olsen, 1997). Hong *et al.* (2005) mencionan que, debido a la cantidad y tamaño de los poros presentes en la capa S, necesarios para permitir el tránsito enzimático, no podría ser posible la adhesión de bacterias formadoras de esporas. La presencia de un exosporium en algunas especies de *Bacillus*, exceptuando a *B. subtilis*, también puede limitar la capacidad de adhesión de las bacterias que lo presenten (Sousa *et al.*, 1976). Se puede inferir que la adhesión de las bacterias seleccionadas al epitelio del TD de *C. sikamea,* pudo ser más viable en su forma vegetal, a menos que presenten alguna otra estructura de adhesión, lo cual requeriría un estudio particular para identificar dicha estructura.

La capacidad de las bacterias de formar biofilms o coagregarse, como se observó *in vitro*, puede favorecer la adhesión al epitelio de la mucosa o a las

partículas de alimento (Mendelson, 1999; Probert y Gibson, 2002; Palestrant *et al*., 2004).

La capacidad de adhesión de las bacterias probióticas al epitelio del TGI influye en la acción benéfica del probionte en su hospedero, sobretodo en su interacción y efecto con un agente patógeno (Liu *et al.*, 2013).

Además de la permanencia de las bacterias, se observó un incremento en la proporción del área de adhesión a las 24 h después de administrar las bacterias, lo cuál no indica colonización ya que no se pueden observar siguientes generaciones, pero sí una mayor adherencia de las bacterias presentes en el agua. Tampoco se pudo evaluar la prevalencia de las bacterias adheridas o el tiempo de tránsito por el TD de las semillas de ostión. Aun así, se considera que se corroboró la capacidad de adhesión de las cepas, evaluadas *in vitro* previamente mediante las pruebas de hidrofobicidad.

9 CONCLUSIONES

Este estudio es el primero realizado sobre el aislamiento y potencial probiótico de bacterias que constituyen la microbiota cultivable de *A. tuberculosa* de dos ambientes de manglar en Baja California Sur y Sinaloa.

De un total de 151 aislados bacterianos obtenidos del TD de *A. tuberculosa*, se encontraron siete cepas con acividad probiótica potencial, de acuerdo a las pruebas *in vitro* realizadas.

La adición de las bacterias seleccionadas en el cultivo de camarón blanco, brindó un efecto inmunoestimulante, al incrementar el valor del conteo total de hemocitos (CTH) y profenol oxidasa (proFO) y disminuir la concentración de anión súperoxido (ASO). Se encontró un mejor resultado al añadir las cepas aisladas del TD de *A. tuberculosa* en forma de mezcla, ya que mejora el rendimiento en el crecimiento de los camarones, mostrando una mayor tasa de crecimiento específico (TCE).

Las cepas que mostraron mayor potencial probiótico corresponden a las especies *B. subtilis* y *B. licheiniformis*, las cuales mostraron un efecto inmunoestimulante en cultivos experimentales de *L. vannamei* a nivel celular, y enzimático.

La expresión génica de proFO, SOD, LvToll y HSP70 fueron buenos indicadores para medir el efecto de los tratamientos con las bacterias con potencial probiótico para el cultivo de camarón.

Las concentraciones de bacterias empleadas no fueron suficientes para producir una diferencia significativa en la expresión relativa de genes de enzimas digestivas en camarón.

El empleo de la mezcla de las cepas MAt32 (*B. licheniformis*), MAt43 (*B. subtilis*) y GAtB1 (subsp *B. subtilis* subesp*. subtilis*) indujo una respuesta

inmunoestimulante, sobre todo, a altas concentraciones (4-6 $\times 10^6$ UFC/g de alimento), e incrementaron la resistencia de los camarones ante enfermedades virales (T2 para WSSV y T4 para IHHNV), por lo que puede considerarse que se comprobó su efecto probiótico en cultivos experimentales de *L. vannamei*.

La adición de las cepas seleccionadas en los cultivos de microalgas de uso como alimento de bivalvos, no afectó de manera significativa el crecimiento de las microalgas, en cambio, la presencia de la microalga benefició el crecimiento de las bacterias añadidas. Por lo que las cepas seleccionadas fueron viables para la evaluación en ostión.

La adición de las bacterias seleccionadas en el cultivo de semillas de ostión *C. sikamea*, mejoró la condición inmunológica de las semillas, incrementando su resistencia ante una infección por *Vibrio*, aumentando su supervivencia, y mejorando su estado nutricional, permitiendo así una mayor energía disponible para el crecimiento. Por lo que se puede considerar que las cepas MAt32, MAt43, y GAtB1 tuvieron un efecto probiótico en el cutivo de semillas de *C. sikamea.*

Se comprobó, en concordancia con los resultados de adhesión a solventes orgánicos, que las cepas evaluadas pueden adherirse al epitelio gastrointestinal de moluscos bivalvos como *C. sikamea*; sin embargo, criterios como colonización, tiempo de residencia, parámetros exógenos o endógenos que cambien el tiempo de residencia en el TD, y recuperación de UFC tras un período determinado de administración, deberán ser abordados en estudios posteriores.

10 LITERATURA CITADA

Abasolo-Pacheco, F., P.E. Saucedo, J.M. Mazón-Suástegui, D. Tovar-Ramírez, R. Araya, J.M. Ramírez-Orozco, y Á.I. Campa-Córdova. 2015. Isolation and use of beneficial microbiota from the digestive tract of lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* and winged pearl oyster *Pteria sterna* in oyster aquaculture. Aquaculture Research. 1-10.

Aguilar-Macías, O.L., J.J. Ojeda-Ramírez, A.I. Campa-Córdova, y P.E. Saucedo. 2010. Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. Journal of the World Aquaculture Society. 41(3):447-454.

Ai, H.S., Y.C. Huang, S.D. Li, S.P. Weng, X.Q. Yu, y J.G. He. 2008. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology. 25:28-39.

Andersen, C.L., J.L. Jensen, y T.F. Ørntoft. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data : A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets normalization of Real-Time Quantitative Reverse. Cancer Research. 64:5245-5250.

Avendaño-Herrera, R., M. Lody, y C.E. Riquelme. 2005. Producción de substancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 40(2):117-125.

Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier, y B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunological Reviews. 198:149-168.

Bachère, E., E. Mialhe, D. Noël, V. Boulo, A. Morvan, y J. Rodriguez. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquaculture. 132:17-32.

Balcázar, J.L., T. Rojas-Luna, y D.P. Cunningham. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology. 96:147-150.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, y M. Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. The American Journal of Clinical Pathology. 45(4):493-496.

Beaz-Hidalgo, R., S. Balboa, J.L. Romalde, y M.J. Figueras. 2010. Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. Environmental Microbiology Reports. 2(1):34-43.

Bellon-Fontaine, M.-N., J. Rault, y C.J. van Ossb. 1996. Microbial adhesion to solvents : a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. Colloids and Surfaces. 7:47-53.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254.

Breidt, F. y H.P. Fleming. 1996. Identification of lactic acid bacteria by ribotyping. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology. 4:219-233.

Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO. Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. p.

Campa-Córdova, A.I., H. González-Ocampo, A. Luna-González, J.M. Mazón-Suástegui, y F. Ascencio. 2009. Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. Hidrobiológica. 19(2):151-157.

Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis, y F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β-glucan and sulphated polysaccharide. Fish & Shellfish Immunology. 12:353-366.

Campa-Córdova, A.I., A. Luna-González, J.M. Mazón-Suástegui, G. Aguirre-Guzmán, F. Ascencio, y H.A. González-Ocampo. 2011. Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). Revista de Biología Tropical. 59(1):183-191.

Caplan, A.J., D.M. Cyr, y M.G. Douglas. 1993. Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with HSP70 stress proteins. Molecular Biology of the Cell. 4:555-563.

Clark, M.S. y L.S. Peck. 2009. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms : A mini-review. Marine Genomics. 2(1):11-18.

CONAPESCA, C.N. de A. y P. 2013. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. .

Cowan, S.T. y L.J. Steel. 1993. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete, y P. Bossier. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. Trends in Biotechnology. 25:472-479.

Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodriguez, y E. Bachère. 1997. Penaeidins : a new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). Journal of Biological Chemistry. 272(45):28398-28406.

Devaraja, T., S. Banerjee, F. Yusoff, M. Shariff, y H. Khatoon. 2013. A holistic approach for selection of *Bacillus* spp. as a bioremediator for shrimp postlarvae culture. Turkish Journal of Biology. 37:92-100.

Dhar, A.K., R.M. Bowers, K.S. Licon, G. Veazey, y B. Read. 2009. Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. Molecular Immunology. 46:1688-1695.

Dieterle, S. y J. Wollenhaupt. 1996. Humoral immune response to the chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 in *Chlamydia*-associated chronic salpingitis with tubal occlusion. Human Reproduction. 11(6):1352-1356.

Doeschate, K.I. y V.E. Coyne. 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. Aquaculture. 284:174-179.

Dopazo, C. P., M. L. Lemos, C. Lodeiros, J. L. Bolinches, J. L. Barja. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology. 65:97-101.

Duc, L.H., H.A. Hong, N.Q. Uyen, y S.M. Cutting. 2004. Intracellular fate and immunogenicity of B. subtilis spores. Vaccine. 22:1873-1885.

Eisenhut, M.M. 2008. Mediators of cellular stress response in bacterial meningitis. Critical Care Medicine. 36(1):365-366.

Ellis, R.P., H. Parry, J.I. Spicer, T.H. Hutchinson, R.K. Pipe, y S. Widdicombe. 2011. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. Fish and Shellfish Immunology. 30:1209-1222.

Espigares, E., A. Bueno, J. Hernández, F. García, J.D. Luna, M. Espigares, y R. Gálvez. 2006. Levels of HSP60 in HIV+ patients in different viroimmunological states. Journal of Medical Virology. 78:318-323.

Fagutao, F.F., M. Beth, B. Maningas, H. Kondo, T. Aoki, y I. Hirono. 2012. Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp. Fish and Shellfish Immunology. 32(5):711-715.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Nutrition Paper. 85:1-50.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2007. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación, Montt, Puerto.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 231p.

FAO/OMS. 2010. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias.

Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 20:1-10.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. The Journal of Applied Bacteriology. 66:365-378.

Ganguly, N.K., S.K. Bhattacharya, B. Sesikeran, G.B. Nair, B.S. Ramakrishna, H.P.S. Sachdev, V.K. Batish, a. S. Kanagasabapathy, V. Muthuswamy, S.C. Kathuria, V.M. Katoch, K. Satyanarayana, G.S. Toteja, M. Rahi, S. Rao, M.K. Bhan, R. Kapur, y R. Hemalatha. 2011. ICMR-DBT Guidelines for evaluation of probiotics in food. Indian Journal of Medical Research. 134(1):22-25.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180:147-165.

Gibson, L.F., J. Woodworth, y A.M. George. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii.* Aquaculture. 169(1-2):111-120.

Gismondo, M.R., L. Drago, y A. Lombardi. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobial Agents. 12:287-292.

Goh, E.-B., G. Yim, W. Tsui, J. McClure, M.G. Surette, y J. Davies. 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99(26):17025-17030.

Gómez-Doñate, M., E. Ballesté, M. Muniesa, y A.R. Blanch. 2012. New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific Bifidobacteriaceae suitable for microbial source tracking. Applied and Environmental Microbiology. 78(16):5788-5795.

Gomez-Gil, B., A. Roque, y J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture. 191(1-3):259-270.

Grossart, H.-P., G. Czub, y M. Simon. 2006. Algae–bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. Enviromental Microbiology. 8(6):1074-1084.

Grossart, H.-P. y M. Simon. 2007. Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. Aquatic Microbial Ecology. 47:163-176.

Gurung, T.B., J. Urabe, y M. Nakanishi. 1999. Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. Aquatic Microbial Ecology. 17:27-35.

Harris, J.M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. Microbial Ecology. 25:195-231.

Hernández-López, J., T. Gollas-Galván, y F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology. 113(1):61-66.

Holmblad, T. y K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture. 172:111-123.

Holmström, K., S. Gräslund, A. Wahlströom, S. Poungshompoo, B.-E. Bengtsson, y N. Kautsky. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. International Journal of Food Science and Technology. 38:255-266.

Hong, H.A., L.H. Duc, y S.M. Cutting. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews. 29:813-835.

Infante, C., M.P. Matsuoka, E. Asensio, J.P. Cañavate, M. Reith, y M. Manchado. 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. BMC Molecular Biology. 9:28.

Inglis, V. 2000. Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action. In: J.R. Arthur, C.R. Lavilla-Pitogo, & R.P. Subasinghe (Eds.). Use of Chemicals in Aquaculture in Asia : Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines (pp. 7-22). Tigbauan, Iloilo, Philippines. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries.

Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama, y M. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathology. 29:149-158.

Ji, P., C. Yao, y Z. Wang. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some

pathogen-associated molecular patterns. Fish and Shellfish Immunology. 27(4):563-570.

Jiang, H., X. Liu, Y. Chang, M. Liu, y G. Wang. 2013. Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64, *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Fish and Shellfish Immunology. 35:86-91.

Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee, y K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology. 211:213-236.

Jory, D.E. y H.M. Dixon. 1999. Shrimp white spot syndrome virus in the western hemisphere. Aquaculture Magazine. 25:83–91.

Kanamori, K., R.L. Weiss, y J.D. Roberts. 1987. Role of glutamate dehydrogenase in ammonia assimilation in nitrogen-fixing *Bacillus* macerans. Journal of Bacteriology. 169(10):4692-4695.

Karunasagar, I., S.K. Otta, y I. Karunasagar. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. Aquaculture. 140:241-245.

Karunasagar, I., M.M. Shivu, S.K. Girisha, G. Krohne, y I. Karunasagar. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. Aquaculture. 268:288-292.

Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, y L. Gibson. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture. 274:1-14.

Kesarcodi-watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, y L. Gibson. 2009. Screening for probiotics of Greenshell TM mussel larvae, *Perna canaliculus*, using a larval challenge bioassay. Aquaculture. 296:159-164.

Kesarcodi-watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, y L. Gibson. 2010. Alteromonas macleodii 0444 and Neptunomonas sp. 0536, two novel probiotics for hatchery-reared Greenshell TM mussel larvae, *Perna canaliculus*. Aquaculture. 309:49-55.

Kesarcodi-watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, y L. Gibson. 2012a. Performance of single and multi-strain probiotics during hatchery production of Greenshell TM mussel larvae, *Perna canaliculus*. Aquaculture. 354-355:56-63.

Kesarcodi-watson, A., P. Miner, J. Nicolas, y R. Robert. 2012b. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). Aquaculture. 344-349:29-34.

Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka, y K. Inouye. 1996. Detection of Penaid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by PCR. Fish Pathology. 31(2):93-98.

Kingcha, Y., A. Tosukhowong, T. Zendo, S. Roytrakul, P. Luxananil, K. Chareonpornsook, R. Valyasevi, K. Sonomoto, y W. Visessanguan. 2012. Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. Food Control. 25:190-196.

Kos, B., J. Susković, S. Vuković, M. Simpraga, J. Frece, y S. Matosić. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal of Applied Microbiology. 94:981-987.

Kumar, R., S.C. Mukherjee, K.P. Prasad, y A.K. Pal. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquaculture Research. 37:1215-1221.

Kumar, S.R., V.P.I. Ahamed, M. Sarathi, A.N. Basha, y A.S.S. Hameed. 2008. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). Fish and Shellfish Immunology. 24:467-478.

Lakshmi, B., B. Viswanath, y D.V.R.S. Gopal. 2013. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. Journal of Pathogens. 2013:13.

Lambert, C. y J.L. Nicolas. 1998. Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic *Vibrios* in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology. 71:53-63.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt E., Goodfellow M. (ed), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, New York, NY. 115–175.

LCDC. 1996. Laboratory Biosafety Guidelines. Health protection branch, Health Canada.

Lee, K.W., S.K. Lee, y B.D. Lee. 2006. *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry-A review. International Journal of Poultry Science. 5(1):01-03.

Leelatanawit, R., A. Klanchui, U. Uawisetwathana, y N. Karoonuthaisiri. 2012. Validation of reference genes for Real-Time PCR of reproductive system in the black tiger shrimp. PLoS ONE. 7(12):1-10.

Leyva-Madrigal, K.Y., A. Luna-González, C.M. Escobedo-Bonilla, J.A. Fierro-Coronado, y I.E. Maldonado-Mendoza. 2011. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. Aquaculture. 322-323:16-22.

Li, F. y J. Xiang. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. Developmental and Comparative Immunology. 39(1-2):11-26.

Li, J., B. Tan, y K. Mai. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. 291(1-2):35-40.

Li, M., J. Gong, M. Cottrill, H. Yu, C. de Lange, J. Burton, y E. Topp. 2003. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. Journal of Microbiological Methods. 54:13-20.

Li, P., G.S. Burr, D.M.G. Iii, M.E. Hume, S. Patnaik, F.L. Castille, y A.L. Lawrence. 2007. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. The Journal of Nutrition. 137:2763-2768.

Lightner, D. V y R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164:201-220.

Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 305 pp.

Lin, H.Z., Z. Guo, Y. Yang, W. Zheng, y Z.J. Li. 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. Aquaculture Research. 35(15):1441-1447.

Liu, W., P. Ren, S. He, L. Xu, Y. Yang, y Z. Gu. 2013. Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different *Lactobacillus* strains. Fish & Shellfish Immunology. 35:54-62.

Lo, C., C. Ho, S.-E. Peng, C. Chen, H.-C. Hsu, Y.-L. Chiu, C.-F. Chang, K.-F. Liu, M.-S. Su, C.-H. Wang, y G.-H. Kou. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Diseases of Aquatic Organisms. 27:215-225.

De Lorgeril, J., D. Saulnier, M.G. Janech, Y. Gueguen, y E. Bachère. 2005. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. Physiological Genomics. 21:174-183.

Luis-Villaseñor, I.E., M.E. Macías-Rodríguez, B. Gómez-Gil, F. Ascencio-Valle, y Á.I. Campa-Córdova. 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 321(1-2):136-144.

Luna-González, A., J.T. Moreno-Herrera, Á.I. Campa-Córdova, H.A. González-Ocampo, J.A. Fierro-Coronado, P. Álvarez-Ruiz, y M.A. Bueno-Ibarra. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. Latin American Journal of Aquatic Research. 41(5):898-907.

Maeda, M., K. Nogami, S. Kanematsu, y Y. Kotani. 1997. Manipulation of microbial communities for improving the aquaculture environment. UJNR Technical Report. 24:125-130.

Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO: 91–100.

Martínez-Guzmán, G. 2008. Control de la reproducción y producción de semillas de bivalvos en sistemas controlados. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO: 267-275.

Mendelson, N.H. 1999. *Bacillus subtilis* macrofibres, colonies and bioconvection patterns use different strategies to achieve multicellular organization. Environmental Microbiology. 1:471–477.

Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture. 151:333-349.

Muyzer, G. y K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek. 73:127-141.

Namikoshi, A., L.J. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T. Nishioka, M. Arimoto, y K. Muroga. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture. 229:25-35.

Navarrete, P. y M. Caruffo. 2015. Antibiotics in aquaculture: impacts and alternatives. The APUA Newsletter. 33(2):4-7.

Newaj-Fyzul, A., A.H. Al-Harbi, y B. Austin. 2014. Review : Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture. 431:1-11.

Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai, y V. Vuthiphandchai. 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.

Nwachi, O.F. 2013. An overview of the importance of probiotics in aquaculture. Journal of Fisheries and Aquatic Science. 8(1):30-32.

Ochoa-Solano, J.L. y J. Olmos-Soto. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. Food Microbiology. 23:519-525.

OIE. 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Organización Mundial de Sanidad Animal, Paris, Francia.

Okumura, T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 22:68-76.

OMS. 2005. Clasificación de microorganismos según Grupos de Riesgo. Manual de Bioseguridad en Laboratorios,

Otero, M.C., V.S. Ocaña, y M.E. Nader-Macías. 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. Methods in Molecular Biology. 268:435-440.

Otta, S.K., R. Arulraj, P. Ezhil Praveena, R. Manivel, A. Panigrahi, T. Bhuvaneswari, P. Ravichandran, K.P. Jithendran, y A. G. Ponniah. 2014. Association of dual viral infection with mortality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in culture ponds in India. Indian Journal of Virology. 25(1):63-68.

Ouwehand, A.C., S. Tölkkö, J. Kulmala, S. Salminen, y E. Salminen. 2000. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. Letters in Applied Microbiology. 31:82-86.

Palestrant, D., Z.E. Holzknecht, B.H. Collins, W. Parker, S.E. Miller, y R.R. Bollinger. 2004. Microbial biofilms in the gut: visulalization by electron microscopy and by acridine orangenstaining. Ultrastructural Pathology. 28:23-27.

Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. Animal Nutrition and Health. 29:4-8.

Pascual, M., M. Hugas, J.I. Badiola, M. Monfort, M. Garriga, N. Pascual, M. Hugas, J.I. Badiola, y J.M. Monfort. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. Applied and Environmental Microbiology. 65(11):4981-4986.

Perazzolo, L.M. y M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Developmental and Comparative Immunology. 21(5):385-395.

Powedchagun, P., H. Suzuki, y S. Rengpipat. 2011. Characterization of a probiotic *Bacillus* S11 bacterium of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 33(1):1-8.

Prado, S., J. Montes, J.L. Romalde, y J.L. Barja. 2009. Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. International Microbiology. 12:107-114.

Prado, S., J.L. Romalde, y J.L. Barja. 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. Veterinary Microbiology. 145(3-4):187-97.

Prado, S., J.L. Romalde, J. Montes, y J.L. Barja. 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. Diseases of Aquatic Organisms. 67(3):209-15.

Probert, H.M. y G.R. Gibson. 2002. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. Current Issues Intestinal Microbiology. 3:23-27.

Pujalte, M.J., M. Ortigosa, M.C. Macián, y E. Garay. 1999. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. International Microbiology. 2:259-266.

Rachmilewitz, D., K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinus, B. Rudensky, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi, y E. Raz. 2004. Toll-Like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. Gastroenterology. 126:520-528.

La Ragione, R.M., G. Casula, S.M. Cutting, y M.J. Woodward. 2001. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78 : K80 in poultry. Veterinary Microbiology. 79:133-142.

La Ragione, R.M. y M.J. Woodward. 2003. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. Veterinary Microbiology. 94:245-256.

Reid, G. y J. Burton. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes and Infection. 4:319-324.

Reid, G., J. a McGroarty, R. Angotti, y R.L. Cook. 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. Canadian Journal of Microbiology. 34(3):344-51.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, y P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture. 191:271-288.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, y P. Menasveta. 1998. Probiotics in Aquaculture: A Case Study of Probiotics for Larvae of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). En: Flegel T.W. (eds.) Advances in Shrimp Biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok: 1-5.

Riquelme, C.E. y R.E. Avendaño-Herrera. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. Revista Chilena de Historia Natural. 76:725-736.

Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture. 172:125-145.

Romalde, J.L. y J.L. Barja. 2010. Bacteria in molluscs : good and bad guys. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 136-147.

Romanenko, L. a., M. Uchino, N.I. Kalinovskaya, y V. V. Mikhailov. 2008. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. Microbiological Research. 163:633-644.

Rosenberg, M. 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. FEMS microbiology letters. 262(2):129-34.

Rosenberg, M., D. Gutnick, y E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters. 9:29–33.

Rout, N., S. Kumar, S. Jaganmohan, y V. Murugan. 2007. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. Vaccine. 25:2778-2786.

Sánchez Ortiz, I., L. Martín Martín, Y. García Varela, Z. Abad Márquez, R. Franco Rodríguez, Y. Ramírez Núñez, J. Zamora Sánchez, R. Basulto Morales, A. Moreira Rubio, y A. Arenal Cruz. 2013. Efecto de *Lactobacillus* sp. aislado de col fermentada , sobre el peso y los marcadores inmunológicos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Revista de Salud Animal. 35(2):94-102.

Sánchez-Ortiz, A. 2009. Atenuación de coccidiosis en pollos mediante el uso de *Bacillus subtilis* como probiótico. TE de Maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada,

Sanz, Y., M.C. Collado, M. Haros, y J. Dalmau. 2004. Funciones metabolico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta : probióticos y prebióticos. Acta Pediátrica Española. 62(11):520-526.

Sherr, B.F., E.B. Sherr, y R.D. Fallon. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. Applied and Environmental Microbiology. 53(5):958-965.

Sidhu, M.S. y I. Olsen. 1997. S-layers of *Bacillus* species. Microbiology. 143:1039-1052.

Silva-Aciares, F., D. Moraga, M. Auffret, A. Tanguy, y C. Riquelme. 2013. Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Haliotis rufescens* fed with or without probiotic diet. Journal of Invertebrate Pathology. 113(2):163-176.

Silva-Benavides, A.M. y R. Bonilla-Carrión. 2001. Abundancia y morfometría de *A tuberculosa* y *A similis* (Mollusca: Bivalvia) en el Manglar de Purruja, Golfo Dulce, Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 49(2):315-320.

Song, Y.L. y Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. Developmental Comparative Immunology. 18:201-209.

Sousa, J.C.F., M.T. Silva, y G. Balassa. 1976. An exosporium-like outer layer in *Bacillus subtilis* spores. Nature. 263:53-54.

Sritunyalucksana, K., P. Sithisarn, B. Withayachumnarnkul, y T.W. Flegel. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. Fish & Shellfish Immunology. 9:21-30.

Sritunyalucksana, K. y K. Soderhall. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 191:53-69.

Stephens, A., L. Rojo, S. Araujo-Bernal, F. Garcia-Carreño, y A. Muhlia-Almazan. 2012. Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 161:32-40.

Suzer, C., D. Çoban, H.O. Kamaci, Ş. Saka, K. Firat, Ö. Otgucuoğlu, y H. Küçüksari. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture. 280:140-145.

Tang, K.F.J., S. V Durand, B.L. White, R.M. Redman, C.R. Pantoja, y D. V Lightner. 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. Aquaculture. 190:203-210.

Tannock, G.W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E. Eds., Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thompson Publishing, New York. 434-465.

Teng, X., Z. Zhang, G. He, L. Yang, y F. Li. 2012. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time rt-PCR in four lepidopteran insects. Journal of Insect Science. 12:60 available online: insectscience.org/12.60.

Teplitski, M., A.C. Wright, y G. Lorca. 2009. Biological approaches for controlling shellfish-associated pathogens. Current Opinion in Biotechnology. 20:185-190.

Timmerman, H.M., C.J.M. Koning, L. Mulder, F.M. Rombouts, y A.C. Beynen. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics- a comparison of functionality and efficacy. International Journal of Food Microbiology. 96:219-233.

Trabal-Fernández, N., J.M. Mazón-Suástegui, R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio-valle, E. Morales-Bojórquez, y J. Romero. 2012. Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. Microbial Ecology. 64:555-569.

Trabal-Fernández, N., J.M. Mazón-Suástegui, R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio-valle, y J. Romero. 2014. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis, Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. FEMS Microbiology Ecology. 88:69-83.

Tuan, T.N., P.M. Duc, y K. Hatai. 2013. Overview of the use of probiotics in aquaculture. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture. 3(3):89-97.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, y F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology. 3(7):1-12.

Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán-Murillo, y J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 106:299-303.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, y W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64(4):655-671.

Vrieze, A., F. Holleman, E.G. Zoetendal, W.M. De Vos, J.B.L. Hoekstra, y M. Nieuwdorp. 2010. The environment within : how gut microbiota may influence metabolism and body composition. Diabetología. 53(4):606-613.

Wang, K.C.H.-C., C.-W. Tseng, H.-Y. Lin, I.-T. Chen, Y.-H. Chen, Y.-M. Chen, T.-Y. Chen, y H.-L. Yang. 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. Developmental and Comparative Immunology. 34:49-58.

Wang, P.H., J.P. Liang, Z.H. Gu, D.H. Wan, S.P. Weng, X.Q. Yu, y J.G. He. 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. Developmental and Comparative Immunology. 36(2):359-371.

Wang, Y. y Q. Gu. 2010. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. Marine Biology Research. 6:327-332.

Wang, Y. B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 269(1-4):259-264.

Wang, Y.C., P.S. Chang, y H.Y. Chen. 2008. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β-1,3-glucan. Fish and Shellfish Immunology. 24:113-121.

Wang, Y.G., M.D. Hassan, M. Shariff, S.M. Zamri, y X. Chen. 1999. Histopathology and cytopathology of White Spot Syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. Diseases of Aquatic Organisms. 22:1-11.

Wang, Y.T., W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, y J. Kwang. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguiensis*. Diseases of Aquatic Organisms. 52:249-259.

Werner, I. y D.E. Hinton. 1999. Field validation of HSP70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): is downregulation an indicator of stress? Biomarkers. 4(6):473-484.

Wongsasak, U., S. Chaijamrus, S. Kumkhong, y S. Boonanuntanasarn. 2015. Effects of dietary supplementation with β-glucan and synbiotics on immune

gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. Aquaculture. 436:179-187.

Xi, D., C. Liu, y Y.-C. Su. 2014. Impacts of *Lactobacillus plantarum* in depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). Journal of Aquatic Food Product Technology. 23:165-174.

Xu, H., H.S. Jeong, H.Y. Lee, y J. Anh. 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. Applied Microbiology. 49:434-442.

Yan, L., Y. He, H. Kong, S. Tanaka, y Y. Lin. 2006. Isolation of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain. Journal of Environmental Biology. 27(2):323-326.

Yap, I.K.S., J. V Li, J. Saric, F. Martin, H. Davies, Y. Wang, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, J.R. Marchesi, y E. Holmes. 2008. Metabonomic and microbiological analysis of the dynamic effect of vancomycin-induced gut microbiota modification in the mouse. Journal of Proteome Research. 7:3718-3728.

Yeh, S.-P., Y.-N. Chen, S.-L. Hsieh, W. Cheng, y C.-H. Liu. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. Fish & Shellfish Immunology. 26(4):582-588.

Yousefian, M. y M.S. Amiri. 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. African Journal of Biotechnology. 8(25):7313-7318.

Zeng, D., X. Chen, Y. Li, M. Peng, N. Ma, W. Jiang, C. Yang, y M. Li. 2008. Analysis of HSP70 in *Litopenaeus vannamei* and detection of SNPS. Journal of Crustacean Biology. 28(4):727-730.

Zhang, Q., B. Tan, K. Mai, W. Zhang, H. Ma, Q. Ai, X. Wang, y Z. Liufu. 2011. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquaculture Research. 42:943-952.

Zhou, J., W.N. Wang, W.Y. He, Y. Zheng, L. Wang, Y. Xin, Y. Liu, y A.L. Wang 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. Journal of Invertebrate Pathology. 103(3):170-178.

Zhou, Q., K. Li, X. Jun, y L. Bo. 2009. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. Bioresource Technology. 100(16):3780-3786.

Ziaei-Nejad, S., M.H. Rezaei, G.A. Takami, D.L. Lovett, A.-R. Mirvaghefi, y M. Shakouri. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture. 252(2-4):516-524.

Zokaeifar, H., J.L. Balcázar, C.R. Saad, M.S. Kamarudin, K. Sijam, A. Arshad, y N. Nejat. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 33(4):683-689.

11 ANEXOS

Sánchez-Ortiz, A.C., A. Luna-González, Á. I. Campa-Córdova, R. Escamilla-Montes, Ma. del C. Flores-Miranda & J. M. Mazón-Suástegui. 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(1): 123-136. DOI: 10.3856/vol43-issue1-fulltext-11

Sánchez-Ortiz, A.C., A. Luna-González, P. Álvarez-Ruiz, J. M. Mazón-Suástegui, L. R. Martínez-Córdova & Á. I. Campa-Córdova. 2015. Effect of *Bacillus* spp. on the expression of immune-related genes in white shrimp *Litopenaeus vannamei.* Sometido a Aquaculture 18 Nov 2015.