

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar.**

Factibilidad de aplicar secuenciación de alto rendimiento para el descubrimiento de bacterias probióticas para larvas *Penaeus vannamei*.

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previa a la obtención del Título de:

**Ingeniero Acuícola**

Presentado por:

Keysi Dayana Aguilera Mero

Bryan Patricio García Calderón

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

Año: 2021

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**College of Maritime Engineering and Sea Science**

Feasibility of applying high throughput sequencing for the discovery of  
probiotic bacteria for *Penaeus vannamei* larvae.

**CAPSTONE COURSE**

A project submitted in partial fulfillment of the requirements for the  
degree of:

**Aquaculture Engineer**

By:  
Keysi Dayana Aguilera Mero  
Bryan Patricio García Calderón

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

Year: 2021

## **DEDICATORIA**

De manera especial a Dios, por darme sabiduría para enfrentar cada reto en la vida y siempre darme su mano para seguir adelante a pesar de las adversidades. A mis padres Ana y Nelson por ser el soporte en cada etapa que me ha tocado recorrer, enfrentando conmigo los días brillantes y oscuros, por la educación brindada con esfuerzo y sacrificio, y sobre todo por inculcarme valores y principios. A mis abuelos, de manera profunda a mi abuelita que cariñosamente le decía mami, que ahora me guía desde el cielo y celebra conmigo cada meta. Este logro se los dedico a ellos, por el apoyo y confianza brindada desde siempre.

Keysi Aguilera

## **DEDICATORIA**

Todo este proyecto de la materia integradora va dedicado en primer lugar a Dios seguido de mis padres por haberme apoyado cada día de mi vida, a mis abuelos que seguramente están viendo este logro desde el cielo, también agradezco a los docentes de mi alma mater la ESPOC quienes compartieron sus conocimientos durante toda mi vida universitaria, por último, pero no menos importante a todos quienes siempre están pendientes de mi progreso tanto personal como profesionalmente. Sin ustedes nada de esto fuera posible, ¡Gracias! Desde lo más profundo de mi corazón.

Patricio García

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación está enmarcada en el proyecto de investigación CEPRA XV-2021-05 BIOMARCADORES *Descubrimiento de biomarcadores de potenciales probióticos para la industria camaronera ecuatoriana* financiado por la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia (CEDIA) a través de su programa CEPRA XV.

Expresamos nuestro más sincero y profundo agradecimiento a la tutora del proyecto integrador a Bonny Bayot, *Ph.D*, por el tiempo, dedicación y apoyo que nos ha brindado en el transcurso del trabajo.

Al departamento de Microbiología en las instalaciones de CENAIM por permitirnos realizar la fase experimental, en especial a la Blg. Mrna. Martha Borbor, Tnlgo. Ac Juan Muñoz y al M.Sc. Ramiro Solórzano por guiarnos con sus valiosas enseñanzas en todo momento.

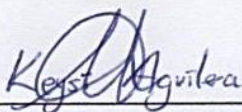
A los técnicos de la Industria Acuícola involucrados en el desarrollo, industrialización y comercialización de probióticos para camarón de cultivo.

A nuestras familias, por darnos su confianza, apoyo y ser la base fundamental a lo largo de esta etapa universitaria.

Y, por último, a nuestra alma máter ESPOL, por depositar excelencia académica en todos los aspectos.

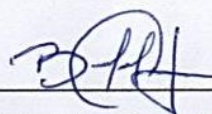
## DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Keysi Dayana Aguilera Mero* y *Bryan Patricio García Calderón* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



---

**Keysi Dayana Aguilera Mero**



---

**Bryan Patricio García Calderón**

# EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:  
**WILFRIDO ERNESTO  
ARGUELLO GUEVARA**



Firmado electrónicamente por:  
**BONNY NARCISA  
BAYOT ARROYO**

---

**Wilfrido Ernesto  
Arguello Guevara, *Ph.D.***

PROFESOR DE LA MATERIA

---

**Bonny Narcisa  
Bayot Arroyo, *Ph.D.***

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

Los probióticos, son una alternativa eficiente a los antibióticos para el control de enfermedades bacterianas de camarón de cultivo. El descubrimiento de probióticos para camarón se realiza principalmente mediante un cribado con pruebas *in vitro* de la capacidad de las cepas bacterianas candidatas a probióticos para excluir el crecimiento de bacterias patógenas. Este método presenta la desventaja de que el descubrimiento se limita a cepas antagónicas contra bacterias patógenas. La búsqueda de probióticos mediante la comparación del microbioma del tracto gastrointestinal de animales saludables contra enfermos utiliza tecnología de secuenciación de alto rendimiento (HTS), combinada con técnicas de culturómica, puede ser un método alternativo a la selección de probióticos para camarón, ya que permite la selección de cepas probióticas por cualquier modo de acción. En el presente estudio se realizó un análisis de la factibilidad técnica y económica para la aplicación de HTS en el descubrimiento de potenciales probióticos para larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Se realizó una experimentación de prueba de concepto de cultivo de bacterias potencialmente probióticas usando macerados de larvas de camarón *P. vannamei* de una larvicultura comercial colectadas en un proyecto de investigación de descubrimiento de probióticos. Un total de 18 cepas bacterianas se perfilaron como potencialmente probióticas por exclusión competitiva de la bacteria patógena, señalando evidencias a favor de factibilidad de que la técnica sirve para encontrar cepas probióticas para larvas de camarón. Posteriores estudios serán necesarios para determinar la presencia de otras cepas probióticas por otros modos de acción en las muestras analizadas.

**Palabras claves:** Descubrimiento de probióticos, probióticos, secuenciación de alto rendimiento, larvas *Penaeus vannamei*.



## **ABSTRACT**

*Probiotics are an efficient alternative to antibiotics for the control of bacterial diseases in farmed shrimp. Probiotic discovery for shrimp is mainly carried out by screening the ability of candidate probiotic bacterial strains to exclude the growth of pathogenic bacteria through in vitro tests. This method has the disadvantage that discovery is limited to strains antagonistic against pathogenic bacteria. Probiotic screening by comparing the microbiome of the gastrointestinal tract of healthy and diseased animals using high-throughput sequencing (HTS) technology, combined with culturomics techniques, may be an alternative method to in vitro probiotic screening for shrimp, as it allows to identify probiotic strains with different modes of action. In the present study, an analysis of the technical and economic feasibility for the application of HTS in the discovery of potential probiotics for *Penaeus vannamei* shrimp larvae was performed. A proof-of-concept experimentation of culturing potentially probiotic bacteria was conducted using macerates of *P. vannamei* shrimp larvae from a commercial larviculture collected in a probiotic discovery research project. A total of 18 bacterial strains were profiled as potentially probiotic by competitive exclusion of pathogenic bacteria, pointing to evidence in favor of the feasibility of the technique for probiotic strains discovery for shrimp larvae. Further studies will be necessary to determine the presence of other probiotic strains by other modes of action in the analyzed samples.*

**Key words:** *Probiotic discovery, probiotics, high-throughput sequencing, *Penaeus vannamei* larvae.*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE GENERAL.....	X
ABREVIATURAS .....	XII
SIMBOLOGÍA.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIV
ÍNDICE DE TABLAS .....	XV
CAPÍTULO 1 .....	16
1. INTRODUCCIÓN .....	16
1.1. Descripción del problema .....	17
1.2. Justificación del problema .....	19
1.3. Objetivos .....	20
1.3.1 Objetivo General .....	20
1.3.2 Objetivos Específicos.....	20
1.4. Marco teórico .....	20
1.4.1 Probióticos .....	20
1.4.2 Mecanismo de acción de los probióticos.....	21
1.4.3 Secuenciación de alto rendimiento .....	22
CAPÍTULO 2 .....	25
2. METODOLOGÍA.....	25
2.1 Análisis bibliográfico sobre metodologías de descubrimiento de probióticos utilizando datos de secuenciación de alto rendimiento.....	25
2.2 Encuestas y entrevistas a técnicos de la industria acuícola.....	29
2.3 Experimentación de pruebas de concepto.....	29
2.3.1 Preparación de medios .....	30

2.3.2 Reactivación de las bacterias .....	30
2.3.3 Evaluación y selección de los medios de cultivo .....	31
2.3.4 Preservación de muestras .....	31
2.3.5 Caracterización bacteriana (Bacterias aeróbicas) .....	32
2.3.6 Siembra de aislados bacterianos en agar TCBS y TSA .....	32
2.3.7 Observación de las muestras .....	32
2.3.8 Activación de la cepa bacteriana patógena .....	33
2.3.9 Pruebas de antagonismo (exclusión competitiva) de bacteria patógena .....	34
2.4 Análisis de factibilidad de descubrimiento de bacterias usando secuenciación de alto rendimiento .....	34
CAPÍTULO 3 .....	36
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	36
3.1 Entrevistas y encuestas a expertos de la industria acuícola sobre desarrollo industrialización, aplicación de probióticos .....	36
3.2 Experimentación de prueba de concepto .....	40
3.3 Análisis de factibilidad de descubrimiento de bacterias usando secuenciación de alto rendimiento .....	41
CAPÍTULO 4 .....	48
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	48
4.1 Conclusiones .....	48
4.2 Recomendaciones .....	50
BIBLIOGRAFÍA .....	51

## ABREVIATURAS

CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
HTS	High throughput sequencing
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
NGP	Next Generation Probiotics
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CLpB	Caseinolítica peptidasa B
LB	LB Broth Miller Luria-Bertani
YE	Yeast Extract (Extract of Autolysed Yeast Cells)
MB	Marine Broth 2216
TSB	Tryptic Soy Broth
BHI	Brain Heart Infusion
NB	Nutrient Broth
MRS	De Man, Rogosa y Sharpe
NaCl	Cloruro de sodio
TSA	Tryptic Soy Agar
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose
AM	Agar Marine
MH	Muller-Hinton

## SIMBOLOGÍA

°C	Grados centígrados
μl	microlitros
ml	mililitros
UFC/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
%	Porcentaje
H	horas

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Principales enfoques metodológicos (evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> y evaluación de modos de acción utilizados), modificado por García Referencia: [9].....	<b>22</b>
<b>Figura 1.2</b> Pasos realizados en un análisis de metagenómica [30]......	<b>23</b>
<b>Figura 2.1</b> Estrategia metodológica “top-down” para el descubrimiento de probióticos para humanos [33]. .....	<b>27</b>
<b>Figura 2.2</b> Cámara de seguridad utilizada en el cultivo de bacterias. ....	<b>31</b>
<b>Figura 2.3</b> Cajas Petri conteniendo las colonias cultivadas en agar TCBS. ....	<b>32</b>
<b>Figura 2.4</b> Distintas fases de la activación de cepas potencialmente probióticas y patógena.....	<b>33</b>
<b>Figura 3.1</b> Resultados de las pruebas de antagonismo/exclusión competitiva por los métodos de cúmulos (derecha) y de difusión del tapón de agar (izquierdo), mostrando la sensibilidad de una cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> frente a las bacterias potencialmente probióticas, estimada a través de halos de inhibición. ....	<b>41</b>
<b>Figura 3.2</b> Flujograma de los procesos y análisis involucrados en los métodos de descubrimiento de probióticos .....	<b>43</b>
<b>Figura 4.1</b> Metodología para probióticos de precisión [47].....	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1</b> Resultados de las encuestas realizadas a 25 productores de camarón. ....	37
<b>Tabla 3.2</b> Resultados de las entrevistas realizadas a 5 expertos en desarrollo y comercialización de probióticos.....	38
<b>Tabla 3.3</b> Resultados de las pruebas de antagonismo (exclusión competitiva) por el método de cúmulos (método más efectivo), mostrando sensibilidad de una cepa patógena <i>Vibrio parahaemolyticus</i> frente a las bacterias potencialmente probióticas...	40
<b>Tabla 3.4</b> Ventajas y desventajas de los métodos de descubrimiento de probióticos...	44
<b>Tabla 3.5</b> Matriz de factibilidad para el descubrimiento de probióticos para camarón <i>Penaeus vannamei</i> utilizando los enfoques in vitro, in vivo y secuenciación de alto rendimiento. ....	47

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una de las industrias de producción de alimento de mayor relevancia mundial. Concomitantemente con el crecimiento de la industria acuícola la producción se ha intensificado, lo que incrementa el riesgo de ocurrencia de enfermedades infecciosas, incluidas las de etiología bacterianas, impactando significativamente al sector. Los antibióticos han constituido el tratamiento tradicional para tratar a las enfermedades bacterianas de camarón de cultivo [1]. Sin embargo, su uso conlleva importantes desventajas, principalmente la acumulación de trazas de antibióticos en el ecosistema acuático y la generación de resistencia bacteriana a antibióticos [2][3][4].

Los probióticos, prebióticos y simbióticos son aditivos empleados para controlar a las enfermedades bacterianas en camarón [5]. Entre ellos destacan los probióticos, por ser una alternativa eficiente a los antibióticos [6]. Los probióticos son organismos vivos que generan beneficios en la salud del individuo [3][6]. La administración se realiza por vía oral a través del alimento [7], administrado de manera directa al agua de cultivo [8], utilizando un medio fermentado [9]. Los probióticos tienen varios mecanismos de acción, como antagonismo directo contra patógenos debido a la producción de sustancias inhibitorias, exclusión competitiva de bacterias patógenas por los sitios de adhesión en el tracto gastrointestinal del huésped, competencia con las bacterias patógenas por nutrientes y estimulación del sistema inmune del huésped [9][10]. Los beneficios de los probióticos también incluyen la mejora de la digestibilidad de los alimentos por la acción de enzimas digestivas [5]. Estos beneficios promueven directamente la resistencia del camarón a enfermedades bacterianas, e indirectamente su crecimiento y el mejoramiento de la calidad del agua de cultivo [2][10].

La multiplicidad de efectos benéficos de los probióticos como consecuencia de los distintos modos de acción ha derivado en el incremento de nuevas alternativas metodológicas para el descubrimiento de nuevas cepas. Una de estas alternativas es la



búsqueda de probióticos utilizando datos obtenidos con secuenciación de alto rendimiento (High-throughput sequencing - HTS), que permite la identificación de secuencias de ADN de bacterias enriquecidas en muestras de individuos saludables. En el presente estudio se analiza la factibilidad técnica y económica de usar información generada con tecnología de HTS para el descubrimiento de bacterias potencialmente probióticas para larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Se describe los resultados de una prueba de concepto, utilizando datos de amplicones de 16S rRNA para detectar mediante cultivo microbiano cepas potencialmente probióticas que hayan sido identificadas en el análisis *in silico*. Además, se analiza la factibilidad de aplicar la metodología para la selección de probióticos para larvas de camarón *P. vannamei* utilizando criterios técnicos y económicos.

### **1.1. Descripción del problema**

Las enfermedades que afectan a la industria del cultivo de camarón ocasionan grandes pérdidas económicas. Específicamente, las enfermedades bacterianas causadas por el género *Vibrio* han provocado altas mortalidades en la etapa larval y de engorde en Asia y Latinoamérica [11]. Por ejemplo, la enfermedad de etiología bacteriana de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) ha ocasionado pérdidas económicas en Asia [12]. Los probióticos es una de las alternativas naturales a los antibióticos más eficientes para tratar enfermedades causadas por patógenos bacterianos [13]. Sin embargo, hay un limitado número de géneros de bacterias probióticas comercializadas. Por ejemplo, en Ecuador se comercializa probióticos de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Paracoccus* [14].

El principal enfoque metodológico para la búsqueda de probióticos para acuicultura consiste principalmente en el cribado de las bacterias potencialmente probióticas utilizando pruebas *in vitro* de la capacidad del potencial probiótico para excluir el crecimiento de bacterias patógenas. Generalmente, las cepas potencialmente probióticas que provocan una inhibición del crecimiento de la bacteria patógena, en presencia de un medio de cultivo, son utilizadas posteriormente en pruebas *in vivo* de toxicidad del potencial probiótico al huésped y de desafío con el patógeno bacteriano. Este proceso de selección tiene principalmente dos problemas. En primer lugar, al

enfocarse solamente en el modo de acción de antagonismo directo, se descarta otras cepas potencialmente probióticas por algún otro modo de acción. De tal forma que, con esta metodología se estaría dejando a un lado bacterias que podrían ser efectivos probióticos por algún otro modo de acción distinto al de antagonismo contra bacterias patógenas. En segundo lugar, podría suceder que no hay consistencia entre los resultados *in vitro* e *in vivo*, ya sea porque la bacteria antagonica en una prueba *in vitro* termina no siendo exitosa en la prueba *in vivo* [15], o por bacterias que no mostraron antagonismo en la prueba *in vitro* pueden ser antagonicas *in vivo* [16]. Independientemente que, el enfoque *in vitro* ha revelado probióticos muy efectivos para la salud del camarón, se estaría dejando a un lado a un arsenal de cepas potencialmente probióticas que podrían beneficiar sustancialmente a la industria.

Por tal razón, se ha utilizado, aunque en menor medida el enfoque de iniciar el proceso de cribado con pruebas *in vivo*. Este segundo enfoque metodológico tiene la ventaja de permitir la actuación de todos los modos de acción de los potenciales probióticos, pero presenta la desventaja que demanda muchos recursos, principalmente, espacio, animales de experimentación, réplicas, entre otros, lo cual se traduce en altos costos. Precisamente en términos de costos, el enfoque de búsqueda de probióticos mediante pruebas *in vitro* se ha utilizado mayoritariamente, ya que los costos son muy inferiores comparados con el enfoque *in vivo*.

Otro método de selección de probióticos consiste en probar la eficacia de géneros de bacterias, como los *Lactobacillus*, cuya efectividad como probióticos para humanos y agricultura ya ha sido verificada. Sin embargo, este otro método de selección podría estar utilizando bacterias que no son parte de la microbiota natural del camarón.

En este contexto, es importante contar con otra alternativa metodológica para la búsqueda de probióticos efectivos para camarón de cultivo que aborde los problemas anteriormente descritos. Los probióticos en humanos está atravesando una nueva era denominada probióticos de nueva generación (next-generation probiotics – NGP) donde se identifica probióticos de precisión utilizando datos de HTS como la de amplicones del 16S rRNA, comparando la microbiota intestinal de individuos sanos e individuos afectados, y la detección posterior de las bacterias utilizando un amplio

rango de condiciones de cultivo (culturómica). En el presente trabajo se plantea estudiar la factibilidad utilizar HTS para el descubrimiento de bacterias potencialmente probióticas para larvas de camarón *P. vannamei*.

## 1.2. Justificación del problema

El camarón de cultivo es el primer producto no petrolero de exportación en Ecuador. Pese a las dificultades a causa de la pandemia por la COVID-19 en el 2020, las exportaciones de camarón se incrementaron un 25,5% en comparación al año 2019 generando 3 mil millones de dólares [17]. En el 2020, Ecuador se convirtió en el primer exportador mundial. Sin embargo, las enfermedades bacterianas emergentes han desencadenado pérdidas económicas a nivel mundial, de manera que es importante desarrollar alternativas que contribuyan de manera natural al control eficaz de las enfermedades bacterianas en el cultivo de larvas de camarón.

La búsqueda de probióticos mediante la comparación del microbioma de animales saludables con enfermos obtenidos con la tecnología de HTS, combinada con técnicas de culturómica puede ser un método alternativo a la selección de probióticos para camarón por los siguientes motivos: 1) la utilización de animales colectados de instalaciones comerciales es una metodología que inicia con el enfoque *in vivo* y permitiría la identificación de probióticos que tengan cualquier modo de acción, 2) permitiría identificar probióticos para patógenos locales, 3) se determinarían taxones de bacterias significativamente enriquecidas en el grupo de animales saludables, por lo que, tal significancia estadística incrementaría las posibilidades de encontrar un verdadero probiótico, 4) permitiría la identificación de la microbiota natural de camarón por lo que los probióticos identificados tendrían más posibilidades de éxito al ser bacterias autóctonas del camarón adaptadas al sistema de cultivo, 5) permitiría la identificación de un consorcio de bacterias que al estar presentes en forma conjunta en animales exitosos sugeriría la formulación de mezclas de múltiple cepas, lo cual ahorraría realizar pruebas posteriores para evaluar el efecto sinérgico, 6) permitiría el descubrimiento de nuevos géneros y especies de probióticos para camarón y 7) existiría ahorro en los costos de experimentación del cribado inicial, comparado con el enfoque *in vivo*, porque se estaría seleccionando las bacterias de individuos exitosos.

Este nuevo enfoque metodológico manifiesta interesantes ventajas sobre los métodos de descubrimiento de probióticos utilizados principalmente en acuicultura. Sin embargo, hay dos aspectos que es necesario estudiar: 1) los costos de extracción, amplificación, secuenciación del material genético y análisis de datos que pueden tornarlo en una metodología cara y 2) la proporción de bacterias que puedan ser realmente cultivables de un grupo de taxas identificadas mediante el análisis *in silico*, ya que, se conoce que un mínimo porcentaje de bacterias identificadas *in silico* son cultivables. Estos limitantes son analizados en forma crítica en el análisis de factibilidad realizado en este trabajo para determinar el potencial de aplicación de esta nueva metodología para el descubrimiento de bacterias potencialmente probióticas para camarón de cultivo.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

- Evaluar la factibilidad de aplicar secuenciación de alto rendimiento para el descubrimiento de bacterias potencialmente probióticas para larvas de camarón *Penaeus vannamei*.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Analizar la información disponible en la literatura científica sobre la metodología de descubrimiento de probióticos utilizando secuenciación de alto rendimiento.
- Determinar mediante pruebas *in vitro* la factibilidad de detectar bacterias potencialmente probióticas utilizando resultados de secuenciación de alto rendimiento.

### **1.4 Marco teórico**

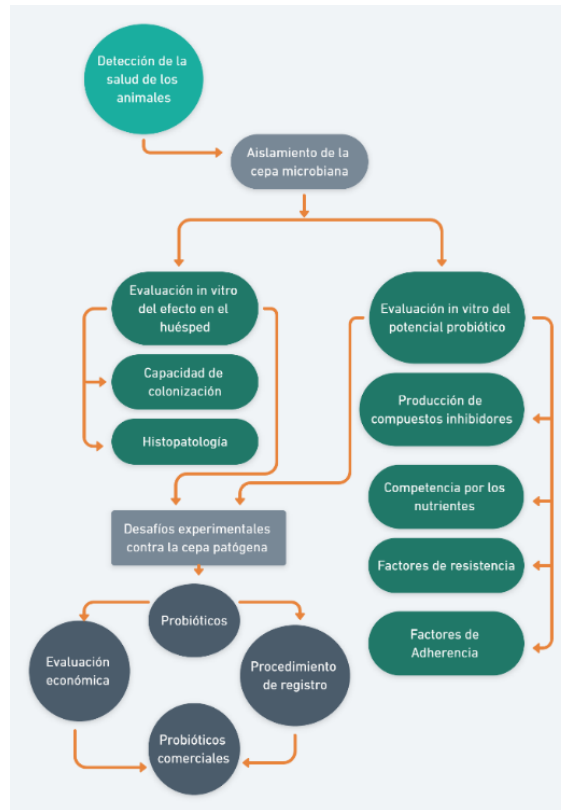
#### **1.4.1 Probióticos**

Los probióticos son microorganismos benéficos considerados en acuicultura como tratamientos alternativos de gran eficacia y con efectos secundarios menores [18]. Los probióticos disminuyen las enfermedades e incrementan la supervivencia, mediante la inhibición de las bacterias patógenas o cualquiera de sus otros modos de acción. El

efecto benéfico de los probióticos también se refleja en el mejoramiento del crecimiento de los animales y de la calidad de agua, por reducción considerable de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato del medio disminuyendo la carga orgánica [19]. La acción de los probióticos suele ser de forma transitoria y su administración debe ser de forma continua, como suplemento en la alimentación o también en el agua del cultivo, para que, el efecto biológico se mantenga en el tiempo.

#### **1.4.2 Mecanismo de acción de los probióticos**

Algunas bacterias probióticas presentan un mecanismo de acción de antagonismo directo (Figura 1.1), mediante el cual exhiben la capacidad de generar productos extracelulares como sustancias antimicrobianas y ácidos orgánicos encargados de inhibir o matar bacterias patógenas [2][19][20][21]. Algunas bacterias Gram-positivas como Gram-negativas presentan la capacidad de mejorar la respuesta inmune de los camarones contra potenciales microorganismos patógenos. Por ejemplo, el camarón (*P. vannamei*) al suministrarle tanto *Bacillus* y *Vibrio* en el alimento es capaz de incrementar la resistencia a *Vibrio harveyi* [22]. En tanto que, otras bacterias mediante un mecanismo de exclusión competitiva ocluyen el acceso de las bacterias patógenas a los sitios de adhesión del tracto gastrointestinal del huésped, permitiendo la colonización del probiótico en el epitelio intestinal. Este proceso permite tener una flora gastrointestinal beneficiosa para el huésped, ya que impide la colonización de una o varias bacterias patógenas en el microbiota intestinal. Los probióticos ayudan a que esto se lleve a cabo gracias a la unión con las células epiteliales del huésped, lo que también colabora a la alerta del sistema inmune del animal [21]. Por ejemplo, en *Penaeus monodón*, cepas *Bacillus* generan un efecto de exclusión competitiva contra *V. harveyi*, debido a la capacidad de la cepa *Bacillus* para adherirse a las paredes de las mucosas impidiendo que este *Vibrio* logre colonizar el tracto gastrointestinal del camarón.

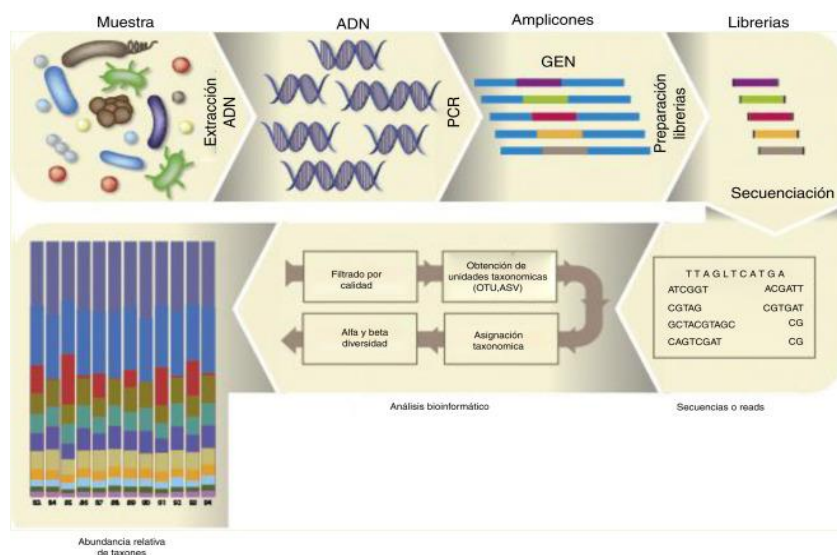


**Figura 1.1** Principales enfoques metodológicos (evaluación *in vitro* e *in vivo* y evaluación de modos de acción utilizados), modificado por García Referencia: [9]

### 1.4.3 Secuenciación de alto rendimiento

Dentro las últimas dos décadas se han desarrollado distintos estudios de la microbiota humana en forma independiente del cultivo bacteriano, basándose en análisis molecular y utilización de métodos de secuenciación de ADN. Una de estas técnicas es la metagenómica que estudia comunidades microbianas de forma directa en su medio sin hacer uso del aislamiento de las bacterias y su cultivo, revelando una mayor diversidad inclusive para ecosistemas desconocidos [23]. La metagenómica es el estudio del conjunto de ADN de comunidades enteras de microorganismos (metagenoma) en un determinado hábitat [24]. La disciplina se desarrolló como alternativa a la problemática de que únicamente entre el 0.1 y 10% de los microorganismos de una muestra son cultivables mediante técnicas microbiológicas clásicas. La mayoría de las bacterias de una muestra no pueden ser cultivadas porque se desconoce los requerimientos nutricionales y parámetros fisicoquímicos necesarios para un óptimo crecimiento de estas bacterias. Ante esta problemática se desarrolló la

metagenómica como una disciplina alternativa para determinar la diversidad de microorganismos presentes (cultivables y no cultivables) en un hábitat a través de la información genética, prescindiendo de los cultivos microbiológicos. Se utiliza también para caracterizar taxonómica y genéticamente a las comunidades bacterianas de distintos organismos, para seleccionar candidatos a probióticos [21][25][26], para el análisis de abundancia diferencial en organismos saludables comparados con organismos enfermos [27][28], y para el desarrollo de estrategias de control de patógenos [29]. El análisis de metagenómica se realiza a través de una serie de pasos (Figura 1.2), que en forma resumida consisten en: 1) obtención de la muestra de un hábitat, 2) extracción del ADN de partes de los genomas o de los genomas de los microorganismos de la muestra, 3) preparación de los fragmentos con un tamaño determinado del ADN extraído, (librerías o bibliotecas), 4) secuenciación de estos fragmentos utilizando tecnologías HTS para la obtención de secuencias de nucleótidos de los microorganismos presentes en la muestra, y 5) análisis de las secuencias de ADN (análisis bioinformático) para la asignación taxonómica de los microorganismos secuenciados, estudios de diversidad del microbioma, entre otros análisis. La secuenciación puede realizarse para el metagenoma completo (secuenciación shotgun) o para un fragmento o marcador del genoma bacteriano (secuenciación de amplicón o código de barras - barcoding), que a menudo se realiza para regiones hipervariables del gen ribosomal 16S rRNA.



**Figura 1.2** Pasos realizados en un análisis de metagenómica [30].

Las plataformas de secuenciación de metagenómica son cada vez más usadas para la obtención de probióticos para humanos y animales y consecuentemente disminuyen los costos de análisis. Por su lado, la culturómica permite el cultivo de bacterias viables, pero inicialmente no cultivables mediante la combinación de múltiples condiciones de cultivo, combinadas con la identificación rápida de bacterias, lo que ha permitido el cultivo de cientos de nuevos microorganismos [26][31].



# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Análisis bibliográfico sobre metodologías de descubrimiento de probióticos utilizando datos de secuenciación de alto rendimiento

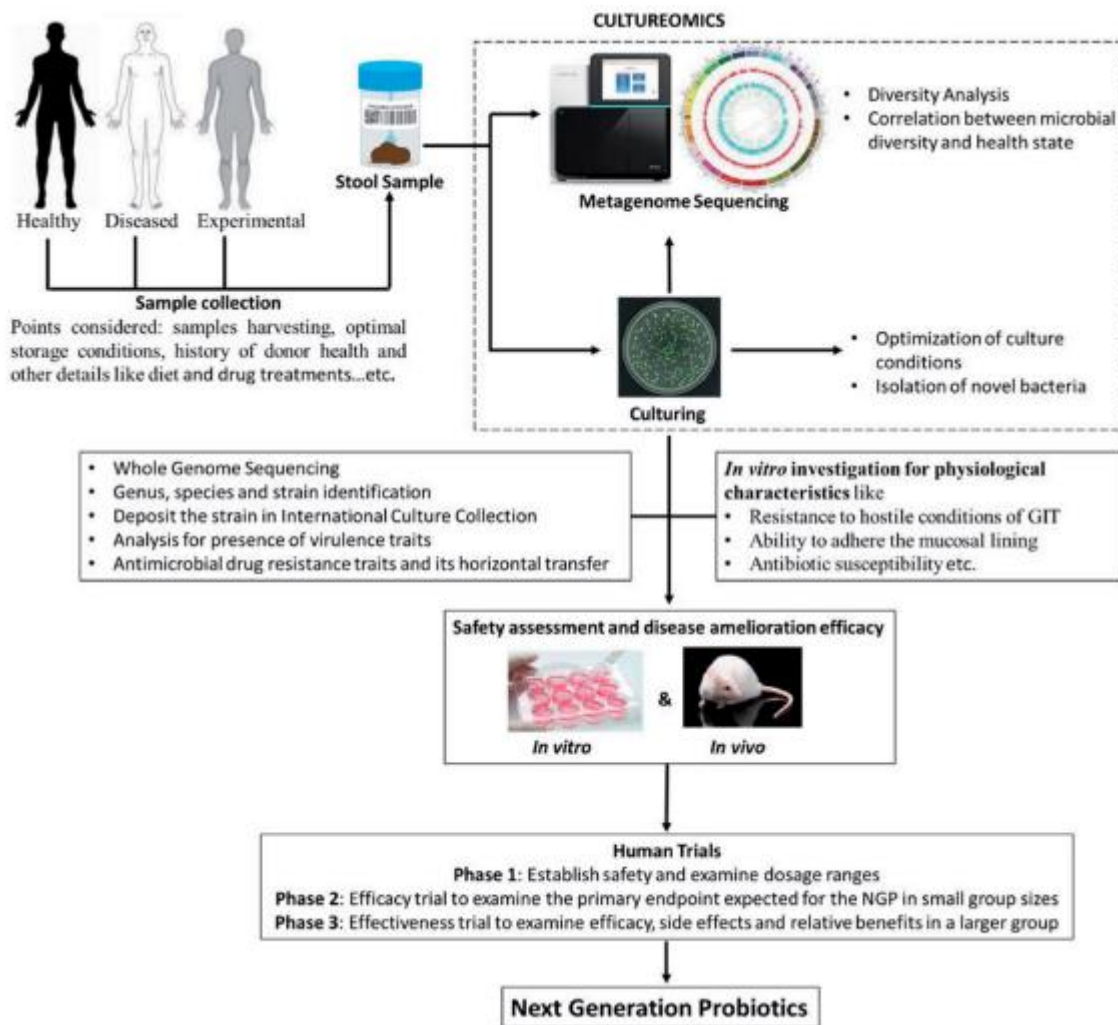
Se realizó un análisis bibliográfico sobre metodologías de descubrimiento de probióticos para humanos utilizando datos de secuenciación de alto rendimiento. La búsqueda bibliográfica también incluyó la revisión de los métodos tradicionales empleados en el descubrimiento de probióticos para acuicultura. Esta información sirvió posteriormente para identificar los procesos, análisis, ventajas y desventajas de los métodos tradicionales de descubrimiento de probióticos y el alternativo de HTS propuesto en este documento.

Con respecto a los probióticos para humanos, desde el descubrimiento de la bacteria del género *Bifidobacterium*, aislada en 1899 por Tissier de las heces de bebés lactantes, y el inicio del concepto de descubrimiento de probióticos por Metchnikoff en 1907 [32] con la proposición de que la microbiota humana podía ser alterada para promover la salud mediante el consumo regular de yogurt fermentado rico en bacterias ácidas lácticas, se han realizado numerosas investigaciones de causalidad entre la microbiota y la salud humana [33]. Sin embargo, al igual que en acuicultura, la mayoría de los probióticos comerciales para salud humana pertenecen a un limitado número de géneros, que incluyen principalmente a *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp [34]. Otras especies comerciales de probióticos para humanos son *Saccharomyces*, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Enterococci*, y *Weissella* spp. aisladas del tracto intestinal de humanos o de alimentos fermentados [35].

A medida que se ha ampliado el conocimiento del microbioma humano y sus funciones, se desarrollan potentes métodos de cultivo que permiten el aislamiento y la caracterización de una nueva gama de microorganismos. Paralelamente, los costos de secuenciación del ADN disminuyen, facilitando el descubrimiento de nuevos taxones de potenciales probióticos de siguiente generación (next-generation probiotics – NGP [33]. El descubrimiento de NGPs sigue la estrategia metodológica de “arriba hacia abajo”

(top-down), donde los probióticos son descubiertos a la medida para problemas específicos de salud, mediante la comparación de la microbiota del intestino de individuos saludables y enfermos, utilizando análisis de HTS y técnicas de culturómica (Figura 2.1). Antes del desarrollo de la HTS, el descubrimiento de probióticos con el enfoque top-down inició con los descubrimientos de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* [32]. En la era de HTS y la secuenciación de metagenómica, junto con la disciplina de la culturómica y la dilucidación del modo de acción de las cepas potencialmente probióticas con experimentos *in vitro* e *in vivo*, el descubrimiento de probióticos se ha perfeccionado, permitiendo la identificación de nuevos géneros de bacterias probióticas para humanos. Con este enfoque se ha descubierto a *Faecalibacterium prausnitzii*, diferencialmente más abundante en la microbiota intestinal de individuos sanos comparados con la de pacientes con diabetes, cáncer colon-rectal y enfermedad de Crohn. El mecanismo de acción de *F. prausnitzii* radica en su capacidad antiinflamatoria, por la producción de butirato y ácido salicílico por parte de la bacteria, lo cual por un lado inhibe ciertas vías inflamatorias, y por otro lado estimula otras vías antiinflamatorias en el huésped. Adicionalmente, el butirato presenta también un modo de acción anticancerígeno, ya que induce la apoptosis (muerte) de las células cancerosas del colon [36].

Otra cepa probiótica para la salud humana descubierta con el enfoque top-down es la bacteria *Akkermansia muciniphila*, abundante en la microbiota del intestino humano (0.5–5%) de las bacterias totales, pero diferencialmente poco abundante en la microbiota de pacientes con obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedad inflamatoria intestinal crónica [37] [38]. El modo de acción de *A. muciniphila* no está del todo revelado, pero se conoce que la proteína Amuc\_1100 de la membrana externa de *A. muciniphila* está implicada en la formación de pilis que participan en la interacción entre la bacteria y las proteínas Toll-like receptor 2 (TLR2) de ciertas células que regulan la inmunidad y el reconocimiento bacteriano del sistema inmune en humanos.



**Figura 2.1** Estrategia metodológica “top-down” para el descubrimiento de probióticos para humanos [33].

La segunda estrategia para el descubrimiento de NGPs está basada en el cribado de cepas potencialmente probióticas utilizando: pruebas *in vitro* con células de cultivo celular, modelos animales para la prueba de hipótesis de modos de acción inmunológicos, neuronal o metabólico, a nivel molecular haciendo un cribado de cepas potencialmente probióticas que en el análisis *in silico*, también presentan el potencial de producir moléculas (metabolitos o proteínas) capaces de modular el metabolismo de la microbiota o del huésped, y de esta forma influenciar en su estado de salud [33]. Utilizando esta estrategia se identificó la cepa *Hafnia alvei* 4597, que produce la proteína caseinolítica peptidasa B (CLpB) localizada en las mitocondrias, con alta expresión en el cerebro que imita los efectos de la hormona estimulante  $\alpha$ -melanocitos

( $\alpha$ -MSH) reguladora del apetito [32]. En tal sentido, la microbiota de pacientes obesos presentan menos abundancia de bacterias productoras de CLpB, y ratones con obesidad suplementados con la cepa *H. alvei* 4597 muestran una reducción de peso, aumento de masa grasa y una reducción en el consumo de alimento.

A pesar del avance de la investigación que muestran relaciones de causalidad entre probióticos y mejoramiento de la salud [39][40] los probióticos para humanos no son consumidos para controlar enfermedades específicas. Probablemente esto es explicado por la controversia que existe sobre la eficacia de los probióticos comerciales, lo que a su vez es provocado por variación entre cepas y efecto de persona a persona [41].

Por su lado, las bacterias de los géneros *Bifidobacterium*, *Bacillus* y *Lactobacillus* son los probióticos más usados en acuicultura [42]. Además de los *Lactobacillus*, otros probióticos ácidos lácticos usados en acuicultura son *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Aeromonas* [43]. Por su lado, los *Bacillus* también son ampliamente usados como probióticos por su capacidad de formación de esporas, lo que le confiere una ventaja de supervivencia frente a otras bacterias. Otros géneros de bacterias usadas como probióticos en acuicultura son: *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Phaeobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodospiridium*, *Roseobacter*, *Streptomyces* y *Vibrios* [44]. En tanto que, en Ecuador, la mayoría de los probióticos con registro sanitario comercializados para la salud de camarón pertenecen a un grupo limitado de géneros, que incluye: *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. toyonensis*), *Lactobacillus* (*L. plantarum*), *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus* (*P. acidilactici*) y *Paracoccus* [14].

El principal enfoque metodológico para la búsqueda de probióticos para acuicultura consiste principalmente en un proceso de cribado de las bacterias potencialmente probióticas que empieza con la ejecución de pruebas *in vitro* de la capacidad inhibitoria del potencial probiótico contra bacterias patógenas [45][46]. Las bacterias potencialmente probióticas que provocan una inhibición del crecimiento de la bacteria patógena, en presencia de un medio de cultivo, son empleadas en un siguiente paso,

donde mediante pruebas *in vivo* se prueba la toxicidad del potencial probiótico [45][47] y/o la protección al organismo en condiciones de desafío con el patógeno bacteriano [48]. Este enfoque es el más usado por la facilidad de experimentación, el requerimiento de poco espacio, y porque al inicio no requiere de animales de experimentación. En menor medida se ha utilizado el enfoque de iniciar el proceso de cribado con pruebas *in vivo* [49][50]. Este enfoque metodológico tiene la ventaja de permitir la actuación de todos los modos de acción de los potenciales probióticos, pero presenta la desventaja que demanda muchos recursos, principalmente espacio, animales de experimentación, réplicas, entre otros, lo cual se traduce en altos costos. Precisamente en términos de costos, el enfoque de búsqueda de probióticos mediante pruebas *in vitro* se ha utilizado mayoritariamente, ya que los costos son muy inferiores comparados con el enfoque *in vivo*.

## **2.2 Encuestas y entrevistas a técnicos de la industria acuícola**

Posteriormente a la búsqueda bibliográfica, se realizó una encuesta a 25 productores de camarón para identificar etapas productivas de mayor requerimiento de desarrollo de probióticos. Con los resultados obtenidos en el análisis bibliográfico y las encuestas se elaboró un formato de entrevista a expertos en desarrollo y comercialización de probióticos para la salud de camarón, entrevistando a un total de 5 expertos. Estas entrevistas tuvieron como objetivos profundizar en distintos aspectos de desarrollo y aplicación de probióticos, identificar la etapa productiva a la que se iba a aplicar la prueba de concepto e identificar criterios e indicadores de factibilidad para las metodologías de descubrimiento de probióticos.

## **2.3 Experimentación de pruebas de concepto**

Se realizó una experimentación de prueba de concepto mediante la cual se realizó un análisis de cultivo de bacterias potencialmente probióticas. Las muestras que se utilizaron en esta prueba de concepto correspondieron a macerados de larvas de camarón *P. vannamei* de una larvicultura comercial colectadas para ejecutar un proyecto de investigación de descubrimiento de probióticos. Se utilizó estas muestras porque en el mencionado proyecto se identificó, mediante análisis *in silico*, muestras de

larvas de camarón con consorcios de taxas de bacterias significativamente asociadas a cultivos exitosos comparados con cultivos no exitosos. Por tanto, se consideró que estas muestras debían contener algunas bacterias potencialmente probióticas. Dado el poco tiempo de ejecución del presente proyecto se investigó la presencia de bacterias potencialmente probióticas por el modo de acción de antagonismo. Sin embargo, dada la potencialidad de la metodología de HTS para descubrir probióticos con varios modos de acción, será necesario darle a continuidad a la presente investigación para descubrir en esas muestras cepas potencialmente probióticas por otros modos de acción. Las bacterias de estas muestras fueron aisladas y utilizadas en pruebas de antagonismo contra una bacteria patógena para camarón. La presencia de varias cepas potencialmente antagónicas contra la cepa patógena señaló evidencias a favor de la factibilidad de que la técnica sirva para encontrar cepas probióticas para camarón. Se utilizó un total de 20 muestras de larvas de camarón que presentaron mayor abundancia de secuencias con esas taxas bacterianas. Los géneros y especies de bacterias, que fueron identificados como significativamente asociados a los cultivos exitosos, fueron investigados en la literatura científica para determinar las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano.

### **2.3.1 Preparación de medios**

En base a la información bibliográfica se seleccionaron los siguientes medios para cultivo bacteriano: LB Broth Miller Luria-Bertani (LB), Yeast Extract (Extract of Autolysed Yeast Cells - YE), Marine Broth 2216 (MB), Tryptic Soy Broth (TSB), Brain Heart Infusion (BHI), Bacto Peptone (PEPTONA), Nutrient Broth (NB) y De Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Los medios se dispensaron en 25 tubos de ensayo de 15 ml, a razón de 5 ml por tubo de cada medio de cultivo.

### **2.3.2 Reactivación de las bacterias**

Se tomó 20 µl del producto macerado (almacenadas a -80°C y preservadas con PBS y glicerol) de cada una de las 20 muestras y se inoculó en 200 µl de solución salina. Se homogenizó y dispensó 20 µl en los tubos con 5 ml de medio de cultivo. Un grupo de muestras se incubaron en condiciones aeróbicas por 24 y 48 horas a 50°C. Mientras

que, las muestras restantes se incubaron a 30°C en condiciones anaeróbicas, utilizando fundas de anaerobiosis por 168 a 240 horas a 30°C (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Cámara de seguridad utilizada en el cultivo de bacterias.

### **2.3.3 Evaluación y selección de los medios de cultivo**

Después de 24 horas de incubación, se revisó visualmente la turbidez de los tubos con medios de cultivo (crecimiento bacteriano) descartando los medios de cultivo que no registraron crecimiento (PEPTONA). Los tubos que registraron crecimiento leve se incubaron por 48 horas. Luego de este proceso, se descartaron los medios YE y LB por poco crecimiento. Los medios que presentaron crecimiento a las 24 y 48 horas fueron utilizados para la siembra ajustando al 2% de Bacto agar. Cuando se registró turbidez alta en estos tubos se realizó hasta 6 diluciones (1:10), sembrando las tres últimas diluciones.

### **2.3.4 Preservación de muestras**

Se preservó dos tipos de muestras. Por un lado, las colonias fueron aisladas en agar TSA y suplementadas al 2% de NaCl para verificar la pureza, preservándolas en medio TSB suplementado al 2% de NaCl y 20% de glicerol a -80°C. Por otro lado, se agregó 500 µl de solución salina en la caja Petri de mayor concentración bacteriana por cada tipo de medio de cultivo. Se realizó un barrido y se resuspendió todas las bacterias presentes, preservando 100 µl en medio TSB suplementado al 2% de NaCl y 20% de glicerol en tubos de 1.5 ml. Para este proceso se juntaron todas las cajas de diferentes medios de cultivo procesadas para la misma muestra. Por ejemplo: la bacteria 5 que

fue sembrada en los medios AM, LB y TSA, los tres barridos fueron almacenados en un mismo tubo de 1.5 ml. Este procedimiento de agrupar los barridos de una misma muestra se realizó para disminuir el número de muestras a ser analizadas por HTS para la caracterización de la microbiota dependiente de cultivo.

### 2.3.5 Caracterización bacteriana (Bacterias aeróbicas)

Las bacterias presentes en los diferentes medios de cultivo de las 20 muestras totalizaron 176 aislados. Posteriormente, los aislados fueron caracterizados en base a sus características morfológicas (color, forma, borde, elevación y superficie) y codificados para su almacenamiento.

### 2.3.6 Siembra de aislados bacterianos en agar TCBS y TSA

Se preparó medio de cultivo TCBS para separar los posibles vibrios y Agar Tripticosa Soya (TSA) para aislar y purificar las bacterias. Se dividió las cajas Petri de TCBS en 8 partes y las de TSA en 2 partes. Posteriormente, se sembraron los 176 aislados bacterianos que previamente habían sido preservados en un cepario (ultracongelador -80°C), incubando en TSA por 24 horas a 30°C.

### 2.3.7 Observación de las muestras

Se revisaron las cajas Petri que fueron sembradas en agar TCBS y TSA (Figura 2.3), separando las colonias que resultaron positivas en TCBS. Además, los aislados bacterianos sembrados en agar TCBS, se indicaron con: (+) las que registraron crecimiento (posibles vibrios), (-) las que no crecieron y (±) las que presentaron un crecimiento mínimo.

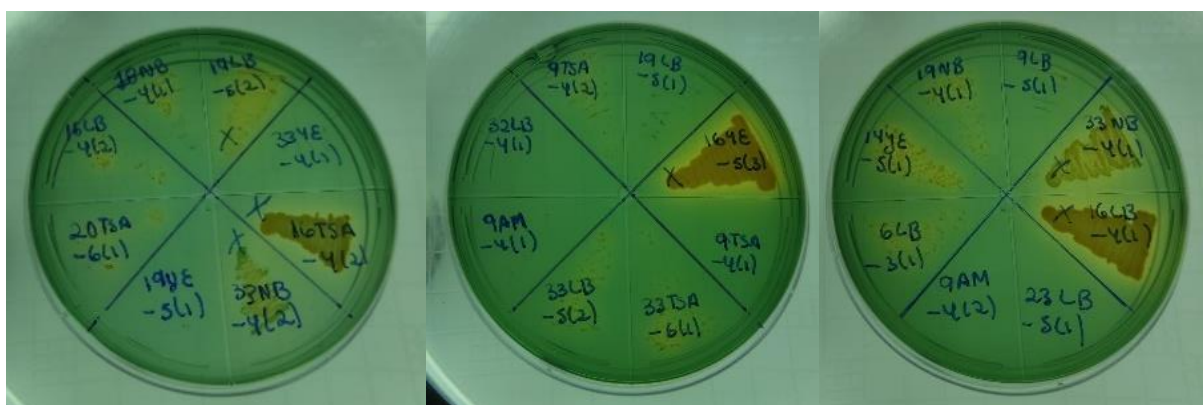


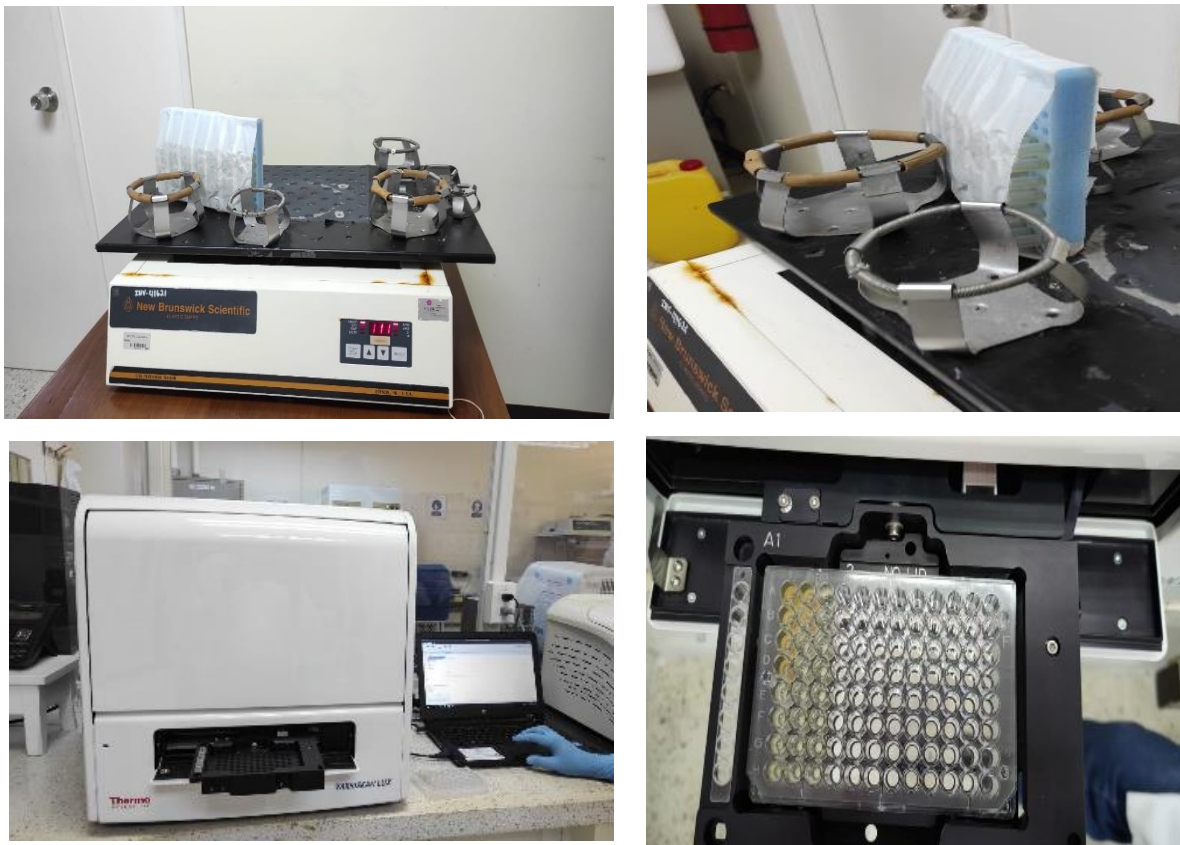
Figura 2.3 Cajas Petri conteniendo las colonias cultivadas en agar en TCBS.



Los aislados que no crecieron en TCBS, pero si en TSA fueron sembrados en tubos de 1.5 ml conteniendo 100  $\mu$ l de medio de cultivo TSB suplementado al 2% NaCl, y ubicados en agitación constante utilizando un shaker por un lapso de 4 h (Figura 2.4). Posteriormente, se retiraron los tubos y el contenido fue inoculado en cajas Petri con medio TSA e incubados por 24 horas a 30°C, con la finalidad de obtener una biopelícula.

### 2.3.8 Activación de la cepa bacteriana patógena

La cepa bacteriana patógena *Vibrio parahaemolyticus* para camarón fue sembrada en una caja de agar TSA al 2% de NaCl e incubada por el lapso de 18 horas a 30°C. Una colonia se transfirió a 5 ml de medio TSB ajustado al 2% de NaCl. Se incubó por 4 horas en baño María a 30°C con agitación constante, y se midió el crecimiento microbiano por turbidez ( $OD_{600}$ ) a 240 nm (concentración de  $10^8$  UFC/ml). Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas 1:10 para llegar a la concentración final sugerida de  $10^5$  UFC/ml.



**Figura 2.4** Distintas fases de la activación de cepas potencialmente probióticas y patógena.

### **2.3.9 Pruebas de antagonismo (exclusión competitiva) de bacteria patógena**

Se realizó pruebas de antagonismo (exclusión competitiva) por los métodos de cúmulos y de difusión del tapón de agar. Para el efecto, se preparó medio de cultivo Muller-Hinton (MH) y se inóculo 100 ul de la bacteria patógena, esparciéndola con hisopo estéril. Para el método de exclusión competitiva por cúmulos, se colocó un cúmulo de biofilm bacteriano, previamente incubado por 24 horas a 30°C en las placas MH, que contenía la bacteria patógena. Para el método de exclusión competitiva por el método de difusión del tapón de agar, con una pipeta estéril se cortó un círculo de agar conteniendo biofilm bacteriano previamente incubado por 24 horas a 30°C y se lo colocó en la placa de MH conteniendo la bacteria patógena. En ambos casos las placas se incubaron por 24 y 48 horas a 30°C en condiciones aeróbicas. Se realizó la observación de sensibilidad de la bacteria patógena provocada por las bacterias potencialmente probióticas, observándose dos comportamientos de sensibilidad de la bacteria patógena: 1) inhibición de la bacteria patógena frente a las bacterias potencialmente probióticas y 2) exclusión de la bacteria patógena por las bacterias potencialmente probióticas, manifestada esta última por la observación de crecimiento de la cepa potencialmente probiótica sobre la bacteria patógena.

### **2.4 Análisis de factibilidad de descubrimiento de bacterias usando secuenciación de alto rendimiento**

Se cuantificó la factibilidad de descubrir probióticos para camarón por los dos métodos de descubrimiento de probióticos más utilizados en acuicultura: enfoque *in vitro* y enfoque *in vivo*, así como por la alternativa propuesta de HTS. Para la factibilidad económica se elaboró un flujograma de los procesos y análisis (laboratorio y datos) que se requieren para descubrir probióticos para los tres métodos. Estos procesos y análisis fueron considerados como los indicadores cuantificables del criterio costos de la factibilidad. En tanto que, para la factibilidad técnica, la información obtenida en la revisión bibliográfica, entrevistas y encuestas fue resumida en un análisis de ventajas y desventajas para los tres métodos. Estas ventajas y desventajas fueron agrupadas en criterios cuantificables de factibilidad técnica. Cada uno de los criterios técnicos y

económicos fueron ponderados de acuerdo con la importancia relativa entre ellos, de tal forma que la suma de la ponderación fue 100%. Una vez identificados los criterios e indicadores semi-cuantificables y asignadas las respectivas ponderaciones, se procedió a asignar una valoración para los tres métodos usando valores 1, 2 o 3, que significaron factibilidad baja (1), intermedia (2) y alta (3). Finalmente, estos valores fueron llevados a la ponderación del indicador respectivo, y los valores fueron sumados para obtener la factibilidad final para cada método. Donde métodos con mayores valores de la sumatoria señalaron una mayor factibilidad para descubrir probióticos.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Entrevistas y encuestas a expertos de la industria acuícola sobre desarrollo industrialización, aplicación de probióticos

Para el 40% de los encuestados todas las etapas de cultivo son críticas para el desarrollo de probióticos comerciales (Tabla 3.1). Otro 40% de los encuestados opinó que la etapa de cultivo de larvas es más crítica. En general, los encuestados consideraron que en zoea es la etapa larvaria para la cual se necesita desarrollar más probióticos y que la pre-cría/pre-engorde es la etapa más crítica del engorde. Se encontró una predominancia de usar tres probióticos durante el cultivo de camarón. Todos los encuestados recomendaron usar probióticos microencapsulados. *Bacillus* es el género de probióticos más usado. En tanto que, los probióticos son mayoritariamente usados tanto para la salud como para la biorremediación.

Los expertos mencionaron que los análisis de inocuidad para humanos, pruebas *in vivo* de toxicidad y desafío de camarones con bacterias patógenas y pruebas en campo son los que las empresas acuícolas evalúan antes de iniciar el proceso de industrialización de un probiótico (Tabla 3.2). Los expertos mencionaron que no todos los probióticos comerciales han sido aislados del tracto gastrointestinal del camarón, por lo que presentan acción transitoria por desventajas en la capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal de los camarones, requiriendo la administración continua. Los géneros más usados como probióticos para la salud del camarón son *Pediococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*. Los expertos coincidieron con los técnicos que el cultivo de larvas es la etapa con mayor requerimiento de desarrollo de probióticos. Sin embargo, la mayor parte de los probióticos son desarrollados para la etapa de engorde. Los expertos no mencionaron que cepas anaeróbicas sean comercializadas como probióticos, pero si mencionaron una bacteria facultativa anaeróbica. Los probióticos comercializados en Ecuador si poseen gran efectividad en el control y prevención de enfermedades bacterianas. En tanto que, los expertos coincidieron con los técnicos en que la microencapsulación es la forma más adecuada de administración de los probióticos. Aspectos importantes para el futuro de los probióticos son: el diseño de productos para

patógenos locales, desarrollar probióticos para algunas bacterias patógenas y mejorar el proceso de microencapsulación para la obtención de probióticos de mejor calidad.

**Tabla 3.1** Resultados de las encuestas realizadas a 25 productores de camarón.

PREGUNTA	RESPUESTA	PORCENTAJE
¿Para qué etapa productiva del cultivo de camarón es más crítico el desarrollo de probióticos comerciales?	Cultivo de larvas de camarón	40
	Cultivo de juveniles de camarón	20
	Todas las etapas de cultivo	40
¿Para qué etapa de desarrollo larval de camarón es más crítico el desarrollo de probióticos?	Zoea	56
	Mysis	8
	Postlarvas	36
¿Para qué etapa de engorde de camarón es más crítico el desarrollo de probióticos?	Toda la etapa	40
	Pre-cría y pre-engorde	48
	Cuando existen problemas de materia orgánica	8
	Cuando se excede la capacidad de carga	4
¿Cuántos probióticos usted emplea en un cultivo de camarón?	1	12
	2	20
	3	48
	4	12
	5	4
	6	4
¿Qué tipo de probiótico es recomendado usar?	Micro encapsulado	100
	On top	0
¿Cuáles son los géneros que más usa como probióticos para la salud de camarón?	<i>Bacillus</i>	52
	Nitrificantes	8
	<i>Bacillus</i> y nitrificantes	40
¿Los probióticos que están usando son para salud o biorremediación?	Ambos	56
	Biorremediación	16
	Salud	28

**Tabla 3.2** Resultados de las entrevistas realizadas a 5 expertos en desarrollo y comercialización de probióticos

<p><b>Tipos de análisis y pruebas que el personal de I+D+i (Investigación, Desarrollo e Innovación) de una empresa acuícola evalúan antes de iniciar el proceso de industrialización de un probiótico</b></p>	<p>Análisis de inocuidad para humanos  Pruebas de toxicidad para camarones  Pruebas de desafío con bacterias patógenas emergentes  Pruebas de efectividad en condiciones de producción (al menos un ciclo de producción para desarrollo de probióticos para engorde o aproximadamente un mes si se desarrolla un probiótico para larvas de camarón)</p>
<p><b>Tiempo que toma las investigaciones para el desarrollo de un probiótico comercial</b></p>	<p>Aproximadamente un año</p>
<p><b>Probióticos aislados del tracto intestinal de la especie hospedera estudiada</b></p>	<p>Algunos probióticos son parte del tracto intestinal, pero no todas las cepas que se encuentran en el mercado son aisladas del tracto gastrointestinal del camarón. Estas últimas tienen acción transitoria, por tanto, requieren ser administrados de forma continua.</p>
<p><b>Géneros más usados como probióticos para la salud de camarón</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pediococcus acidilactici</i></li> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> <li>• <i>Bacillus licheniformis</i></li> <li>• <i>Bacillus toyonensis</i></li> <li>• <i>Lactobacillus plantarum</i></li> </ul>
<p><b>¿Por qué son mayoritariamente usados estos probióticos (<i>Bacillus</i> o <i>Lactobacillus</i>)? ¿Forman parte del microbiota intestinal del camarón?</b></p>	<p>La gran mayoría de los <i>Bacillus</i> están presentes en el fondo de los estanques y algunas especies se encuentran dentro del tracto intestinal del camarón. Los <i>Lactobacillus</i> no forman parte de la microbiota del camarón, pero son utilizados porque producen metabolitos benéficos; su acción es transitoria por desventajas en la capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal de los camarones, por tanto, requieren de administración continua</p>

<b>¿Para qué etapa productiva del camarón es más necesario el desarrollo de probióticos comerciales y por qué?</b>	La etapa productiva del cultivo de camarón más crítica es en la larvicultura porque ocurren las mayores mortalidades.
<b>¿Qué porcentaje de los probióticos comerciales para la salud de camarón son para larvicultura y para engorde?</b>	Gran parte de los probióticos comerciales son para la etapa de engorde a diferencia para la fase de larvicultura.
<b>¿Las bacterias anaeróbicas son usadas como probióticos?</b>	Sí, por ejemplo, <i>Pediococcus acidilactici</i> es una bacteria facultativa anaeróbica, perteneciente a la familia <i>Lactobacillaceae</i> y es usada como probiótico para camarón.
<b>¿Considera que los probióticos comerciales en Ecuador son efectivos para disminuir las enfermedades?</b>	Los probióticos que se comercializan en Ecuador poseen gran efectividad en el control y prevención de enfermedades, así como en la mejora de la tasa de supervivencia y control de estrés, entre otros efectos benéficos.
<b>¿Cuál es el método adecuado de adición de los probióticos para la salud de camarón al sistema de producción acuícola (microencapsulados, incorporados a la dieta, incorporados al agua)?</b>	El método más adecuado de adición de los probióticos para la salud de camarón es a través de microencapsulados en la dieta. Las ventajas son: a) evitar el manipuleo en la preparación del probiótico, b) introducción directa al sistema digestivo del individuo, c) incremento en la viabilidad de almacenamiento, d) reduce gastos por pérdidas.
<b>¿Cuál es el futuro de los probióticos para camarón en el mundo y en el Ecuador?</b>	Diseño de probióticos para patógenos locales Abarcar un mayor abanico de bacterias patógenas, ya que no todos los probióticos actúan igual contra todos los patógenos Mejorar la calidad del probiótico en la etapa de industrialización de microencapsulación en el alimento.

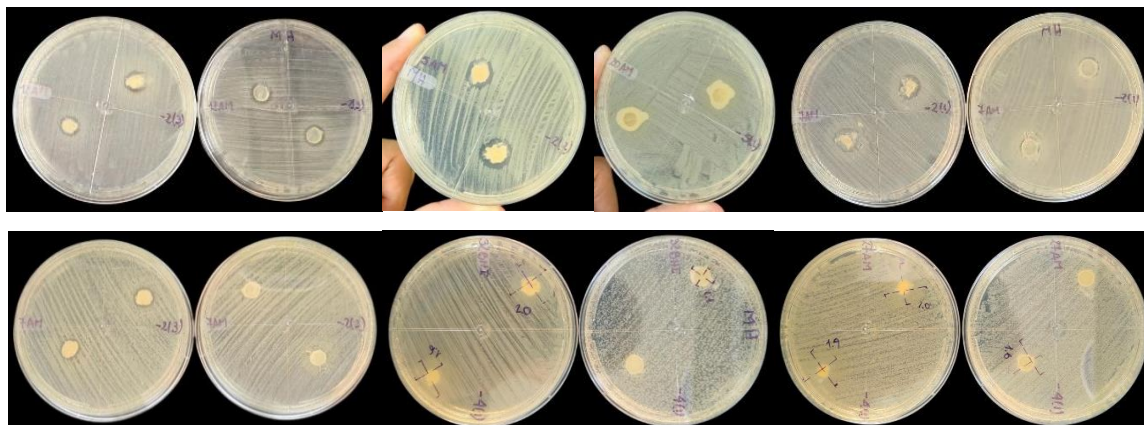
### 3.2 Experimentación de prueba de concepto

Los resultados de las encuestas y entrevistas a técnicos de la industria acuícola direccionaron a que la prueba de concepto se realizara para el caso de larvas de camarón, por mayor incidencia de problemas bacterianos. Al realizar la prueba de concepto se observó que un total de 6 cepas bacterianas se perfilaron como potencialmente probióticas por inhibición de la bacteria patógena, mientras que, 12 cepas bacterianas se perfilaron como potencialmente probióticas por exclusión competitiva de la bacteria patógena (Tabla 3.3 y Figura 3.1). Estos resultados señalaron evidencias a favor de que la técnica de HTS sirve para encontrar cepas probióticas para camarón.

**Tabla 3.3** Resultados de las pruebas de antagonismo (exclusión competitiva) por el método de cúmulos (método más efectivo), mostrando sensibilidad de una cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* frente a las bacterias potencialmente probióticas.

Modo de acción de la cepa potencialmente probiótica	Código de la cepa potencialmente probiótica	Diámetro de inhibición de la bacteria patógena (mm)	
		24 h de incubación	48 h de incubación
Inhibición de la bacteria patógena	12AM-2(3)	19	19
	5AM-2(2)	28	28
	7AM-2(1)	22	22
	8TSA-4(1)	11	13
	9BHI-4(2)	20	20
	5AM-2(3)	12	12
Exclusión competitiva	7AM-2(3)	21	21
	32BHI-4(1)	20	16
	26BHI-4(2)	25	24
	32NB-2(2)	20	18
	27TSA-4(1)	19	20
	27AM-4(1)	20	19
	14BHI-4(2)	23	23
	8AM-2(2)	25	25
	32BHI-4(1)	20	16
	18MRS0(2)	18	19
	16TSA-4(2)	16	18





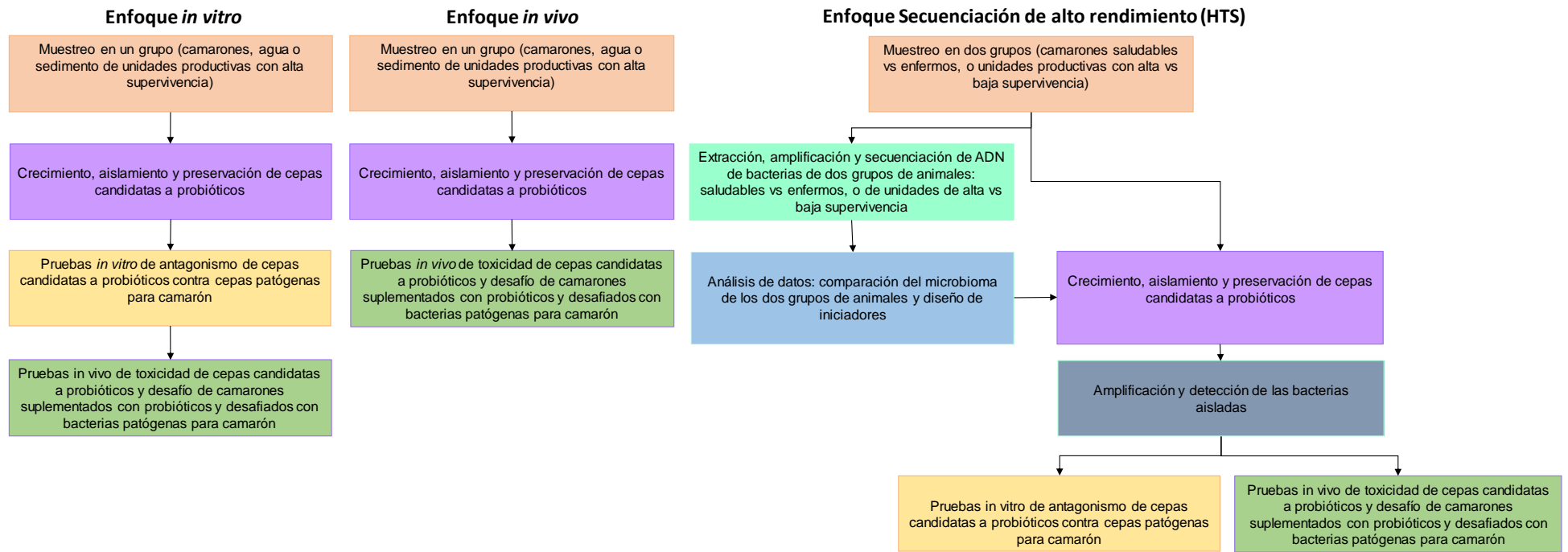
**Figura 3.1** Resultados de las pruebas de antagonismo/exclusión competitiva por los métodos de cúmulos (derecha) y de difusión del tapón de agar (izquierdo), mostrando la sensibilidad de una cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* frente a las bacterias potencialmente probióticas, estimada a través de halos de inhibición.

### 3.3 Análisis de factibilidad de descubrimiento de bacterias usando secuenciación de alto rendimiento

El análisis de la bibliografía, encuestas y entrevistas evidenció los principales procesos y análisis requeridos para descubrir probióticos por los tres métodos analizados (Figura 3.2). Los tres enfoques inician con la colección de muestras, que para los enfoques *in vitro* e *in vivo* generalmente provienen de unidades productivas con alta supervivencia. En el enfoque HTS se utilizan dos grupos de muestras de animales provenientes de cultivos exitosos *versus* no exitosos. Posteriormente, en los enfoques tradicionales *in vitro* e *in vivo*, las cepas candidatas a probióticos son obtenidas, aisladas y preservadas. Para el caso del enfoque *in vitro* las cepas candidatas a probióticos pasan luego al proceso de cribado mediante pruebas *in vitro* de antagonismo contra cepas patógenas para camarón. Luego, las cepas antagonicas son usadas en pruebas *in vivo* de toxicidad y desafío de camarones suplementados con estas cepas y desafiados con bacterias patógenas para camarón. Para el caso del enfoque *in vivo* las cepas candidatas a probióticos son probadas directamente en las pruebas *in vivo* de toxicidad y desafío. En el enfoque HTS, luego del muestreo, se realiza la extracción, amplificación y secuenciación de ADN de bacterias de esos dos grupos de animales. Posteriormente se realiza una comparación del microbioma de animales de los dos grupos mediante análisis bioinformático para obtener las secuencias de bacterias que

son diferencialmente más abundantes en el grupo de animales de cultivos exitosos. Paralelamente, en este proceso de análisis de datos se realiza el diseño de iniciadores para un posterior paso de obtención aislamiento y preservación de las muestras, las mismas que son usadas para la amplificación y detección de las bacterias significativamente más enriquecidas en los animales de cultivos exitosos. Los siguientes pasos de pruebas *in vitro* e *in vivo* no pueden descartarse en el enfoque HTS, dado que es importante confirmar el potencial probiótico de las cepas y determinar sus modos de acción.

La principal ventaja del enfoque *in vitro* es que presenta un costo relativamente bajo, mientras que la desventaja es que el descubrimiento se limita a cepas antagónicas contra bacterias patógenas (Tabla 3.4). En tanto que, la ventaja del enfoque *in vivo* es que se puede descubrir bacterias probióticas con varios modos de acción, pero presenta la desventaja de costos altos porque no hay un criterio inicial de selección de cepas potencialmente probióticas. Mientras que, la principal ventaja del enfoque de HTS es que se puede descubrir bacterias probióticas con varios modos de acción, pero tiene la desventaja que se incurre en costos adicionales por análisis de muestras y de datos.



**Figura 3.2** Flujograma de los procesos y análisis involucrados en los métodos de descubrimiento de probióticos

**Tabla 3.4** Ventajas y desventajas de los métodos de descubrimiento de probióticos

Ventajas y desventajas	Método de descubrimiento de probióticos		
	Enfoque <i>in vitro</i>	Enfoque <i>in vivo</i>	Enfoque Secuenciación de alto rendimiento (HTS)
<b>Ventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costos de descubrimiento relativamente bajos (cribado inicial se realiza con pruebas <i>in vitro</i> que no necesita animales ni muchos recursos de experimentación o espacio)</li> <li>• Productos comerciales exitosos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descubrimiento de bacterias probióticas con varios modos de acción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descubrimiento de bacterias probióticas con varios modos de acción</li> <li>• Posibilidad de identificar consorcio de cepas autóctonas</li> <li>• Permite descubrimiento de nuevas géneros y especies de probióticos</li> <li>• Ahorro en costos de experimentación (cribado se realiza con cepas bacterianas significativamente asociadas a condiciones de salud o a cultivos exitosos)</li> </ul>
<b>Desventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descubrimiento de bacterias probióticas se limita a un solo modo de acción (antagonismo contra bacterias patógenas)</li> <li>• Inconsistencia entre resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></li> </ul> <p>Bacterias que no mostraron antagonismo en pruebas <i>in vitro</i> pueden ser antagónicas <i>in vivo</i></p> <p>Bacterias antagónicas en prueba <i>in vitro</i> podrían no ser exitosas en pruebas <i>in vivo</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costos de descubrimiento altos (cribado se realiza con un gran número de cepas bacterianas candidatas a probióticos)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costos adicionales por extracción, amplificación y secuenciación de ADN de bacterias y análisis de datos relativamente altos</li> <li>• Posibilidad que los biomarcadores de potenciales probióticos no sean cultivables</li> </ul>

Los procesos y análisis fueron agrupados en seis indicadores cuantificables del criterio costos, ya que su ejecución implica costos: a) muestreo, b) crecimiento, aislamiento y preservación de cepas candidatas a probióticos, c) pruebas *in vitro* de antagonismo, d) pruebas *in vivo* de toxicidad y desafío, e) extracción, amplificación, secuenciación de ADN (incluye amplificación y detección de las bacterias aisladas) y f) análisis de datos (bioinformática). Mientras que, las ventajas y desventajas fueron resumidas y agrupadas en tres criterios cuantificables de factibilidad técnica: a) posibilidad de identificar varios modos de acción, b) posibilidad de identificar cepas autóctonas y consorcio de bacterias y c) tiempo en obtener resultados. La tabla 3.5 muestra los criterios e indicadores del criterio costo, así como la ponderación recibida. Los criterios de costos recibieron el 50% de la ponderación, mientras que los criterios técnicos recibieron el otro 50% de la ponderación. A su vez, los indicadores de pruebas *in vivo* de toxicidad y desafío, así como extracción, amplificación, secuenciación de ADN recibieron cada uno un 12.5% de ponderación por ser procesos que implican mayores costos. Le siguió los procesos de crecimiento, aislamiento y preservación de cepas candidatas a probióticos, y análisis de datos (bioinformática), que recibió cada uno un 7.5% de ponderación. Los procesos de muestreo y pruebas *in vitro* de antagonismo recibieron las ponderaciones más bajas (5% cada uno) por ser procesos que implican menores costos. Por su parte, el criterio técnico con mayor ponderación fue el de la posibilidad de identificar varios modos de acción, que recibió una ponderación del 25%. El criterio de tiempo en obtener resultados (confirmación de contar con la cepa probiótica) recibió el siguiente puntaje más alto (15%), mientras que, la posibilidad de identificar cepas autóctonas y consorcio de bacterias recibió un 10% de ponderación. Con respecto a las valoraciones de cada método, el proceso de muestreo fue calificado con el valor más alto (3) para los tres métodos, ya que no es un proceso que incurre en muchos gastos. Sin embargo, el proceso de crecimiento, aislamiento y preservación de las cepas bacterianas recibió el valor 1 por ser un proceso que requiere de material y reactivos, recibiendo los tres métodos la misma valoración. Para la valoración del proceso de pruebas *in vitro* de antagonismo, el enfoque *in vitro* recibió la más baja valoración porque se realiza varios análisis, en tanto que con el enfoque *in vivo* recibió la más alta valoración porque este enfoque no realiza las pruebas, mientras que para el enfoque HTS se valoró con 2 porque, aunque se requiere realizar pruebas *in vitro*, no son de la misma envergadura que en el enfoque *in vitro*. Por su lado, las pruebas *in*

*vivo* recibieron los valores de 2, 1 y 3 para los enfoques *in vitro*, *in vivo* y HTS, dado que el enfoque *in vivo* es el que requiere de más pruebas *in vivo*, luego le sigue el enfoque *in vitro*, y finalmente HTS, ya que existiría ahorro en los costos de experimentación del cribado inicial, comparado con el enfoque *in vivo*, porque se estaría seleccionando las bacterias de individuos exitosos. Para el proceso de extracción, amplificación y secuenciación, los enfoques *in vitro* e *in vivo* recibieron la más alta calificación porque no contempla su ejecución. Mientras que el enfoque HTS recibió la más baja calificación porque se debe realizar una gran cantidad de estos análisis. En cuanto al proceso de análisis de datos, el enfoque HTS recibió la calificación más baja porque se necesita realizar análisis bioinformáticos, mientras que el análisis de datos para los otros dos métodos es mínimo. El criterio posibilidad de identificar varios modos de acción recibió la más alta calificación para los métodos *in vivo* y HTS, mientras que el enfoque *in vitro* recibió la más baja calificación. Por su lado, el criterio de posibilidad de identificar cepas autóctonas y consorcio de bacterias recibió la más alta calificación para el enfoque HTS y la más baja para los enfoques *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, para el criterio tiempo en obtener los resultados, el enfoque *in vitro* recibió la más alta calificación por que los resultados no toman mucho tiempo, mientras que con los enfoques *in vivo* y HTS se tarda más tiempo. Estos valores fueron llevados a la ponderación respectiva según el criterio e indicador. La sumatoria final de factibilidad para los enfoques *in vitro*, *in vivo* y HTS fue 62%, 68% y 72%, respectivamente.

**Tabla 3.5** Matriz de factibilidad para el descubrimiento de probióticos para camarón *Penaeus vannamei* utilizando los enfoques *in vitro*, *in vivo* y secuenciación de alto rendimiento.

Criterios de factibilidad	Indicadores Cuantificables	Ponderación (%)	Valoración para los métodos de descubrimiento de probióticos			Valoración ponderada para los métodos de descubrimiento de probióticos		
			Enfoque <i>in vitro</i>	Enfoque <i>in vivo</i>	Secuenciación de alto rendimiento	Enfoque <i>in vitro</i>	Enfoque <i>in vivo</i>	Secuenciación de alto rendimiento
Costos	Muestreo	5.0	3	3	3	5.0	5.0	5.0
	Crecimiento, aislamiento y preservación de cepas candidatas a probióticos	7.5	1	1	1	2.5	2.5	2.5
	Pruebas <i>in vitro</i> de antagonismo	5.0	1	3	2	1.7	5.0	3.3
	Pruebas <i>in vivo</i> de toxicidad y desafío	12.5	2	1	3	8.3	4.2	12.5
	Extracción, amplificación, secuenciación de ADN (incluye amplificación y detección de las bacterias aisladas)	12.5	3	3	1	12.5	12.5	4.2
	Análisis de datos (bioinformática)	7.5	2	2	1	5.0	5.0	2.5
Posibilidad de identificar varios modos de acción		25.0	1	3	3	8,3	25.0	25.0
Posibilidad de identificar cepas autóctonas y consorcio de bacterias		10.0	1	1	3	3,3	3.3	10.0
Tiempo en obtener resultados		15.0	3	1	1	15,0	5.0	5.0
Valor total de factibilidad		100	17	18	18	61.7	67.5	70.0

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

Dada la necesidad de prevenir y controlar las enfermedades bacterianas en el cultivo de camarón es necesario contar con técnicas de descubrimiento de probióticos que partan de un enfoque *in vivo* para permitir la identificación de una gama más amplia de bacterias probióticas [47]. Para ello es imprescindible una mejor comprensión de la ecología microbiana de la especie y del medio circundante acuícola porque las bacterias adaptadas al ambiente acuícola serán las más exitosas durante un cultivo. El enfoque de descubrimiento de probióticos utilizando el enfoque HTS se convierte en altamente promisorio para el descubrimiento de probióticos de precisión para camarón porque parte de un enfoque *in vivo* al iniciar con la comparación de la microbiota de animales saludables/enfermos. Además, permite conocer la microbiota natural y autóctona del camarón adaptada al sistema de cultivo, y facilita la identificación de un consorcio de bacterias asociadas a cultivos exitosos mediante la comparación con cultivos de bajo rendimiento [51][52][53][54][55][56].

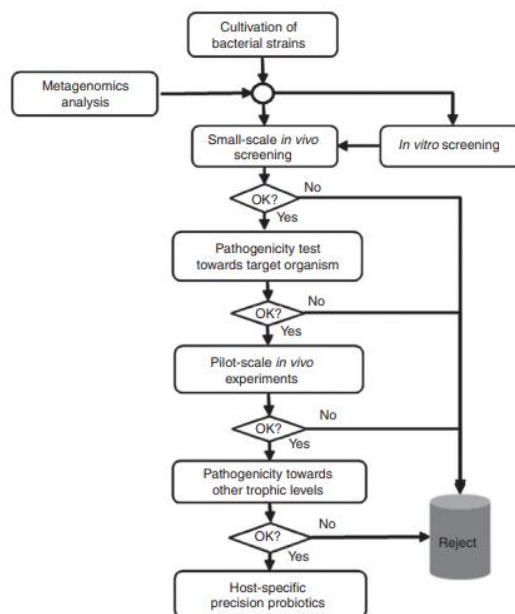


Figura 4.1 Metodología para probióticos de precisión [47].



En tal sentido, en este estudio se evaluó la factibilidad de aplicar HTS para el descubrimiento de bacterias potencialmente probióticas para larvas de camarón, comparando con los dos métodos de descubrimiento de probióticos más utilizados en acuicultura: enfoque *in vitro* y enfoque *in vivo*. Para determinar la factibilidad de la alternativa se realizó una revisión bibliográfica, entrevistas, encuestas, experimentación de pruebas de concepto y el estudio de factibilidad técnica y económica. Se analizó especialmente dos aspectos críticos de la alternativa.

- El análisis de los costos adicionales y la factibilidad técnica con la prueba de concepto, que se aplicó para el caso de larvas de camarón por mayor incidencia de problemas bacterianos.
- En la factibilidad técnica se utilizaron muestras de un proyecto de descubrimiento de probióticos, donde se encontró algunas cepas con potencial probiótico antagónicas contra una cepa patógena, señalando evidencias a favor de factibilidad de que la técnica sirva para encontrar cepas probióticas para larvas de camarón.

El análisis de factibilidad técnica y económica mostró un 72% de factibilidad de usar la metodología de secuenciación masiva para descubrir probióticos para camarón, lo que comparado con el 62% y 68% alcanzados con las metodologías tradicionales con el enfoque *in vitro* e *in vivo*, demuestra que esta es una alternativa que debe ser considerada por la industria acuícola. Las plataformas de secuenciación son cada vez más usadas y consecuentemente los costos de análisis se abaratan lo que permitirá que la industria considere el desarrollo de esta alternativa de descubrimiento de probióticos.

El impacto general de desarrollar esta alternativa metodológica para el descubrimiento de probióticos será contar con un arsenal de probióticos con varios modos de acción, y no solamente cepas antagónicas contra bacterias patógenas, lo cual beneficiará sustancialmente a la industria acuícola. A nivel de productores y país, se incrementaría el desarrollo de productos comerciales que contribuyan al control de enfermedades bacterianas. A nivel industrial, el desarrollo de la propuesta de valor generaría más inversión, empleos y crecimiento industrial de este sector.

La aplicación de esta metodología permitirá además conocer la microbiota natural del camarón, descubrir bacterias autóctonas de camarón saludables (consorcio de bacterias) mediante comparación con camarones enfermos y a su vez desarrollar probióticos para patógenos emergentes locales, al igual que descubrir nuevos géneros y especies de bacterias probióticas con potencial para la industrialización.

## **4.2 Recomendaciones**

El resultado de la factibilidad de aplicar secuenciación de alto rendimiento en la obtención de bacterias potencialmente probióticas es muy prometedor y alentador, basados en la exploración de la literatura, pruebas de desafío incluyendo las entrevistas y encuestas realizadas a los expertos en esta temática. En el presente proyecto integrador se mostró un camino totalmente viable en la búsqueda de la solución a la problemática planteada. A continuación, se agregan varias recomendaciones a tomar en cuenta a futuro.

- Para ampliar el conocimiento acerca de los procesos en la investigación y desarrollo de nuevos probióticos se deberían aumentar la cantidad de entrevistas y encuestas a expertos con la finalidad de mejorar la muestra estadística para así consolidar toda la información recabada o aumentar un parámetro adicional a tomar en cuenta.
- Dado el corto tiempo para la ejecución de la prueba de concepto, se necesita investigar la presencia de otras cepas potencialmente probióticas en las muestras analizadas mediante el diseño de iniciadores para un posterior paso de amplificación y detección de las bacterias significativamente más enriquecidas en los animales de cultivos exitosos. Con las cepas que amplifiquen las secuencias de biomarcadores se deberá confirmar el potencial probiótico y sus modos de acción.
- Se debería ampliar la muestra primaria de otros laboratorios de larvas de la costa ecuatoriana para lograr una flora bacteriana más general y así poder encontrar más bacterias potencialmente probióticas.
- Las autoridades deberán tener mayor control con los probióticos comerciales que se venden en el mercado ya que algunos no poseen ninguna prueba de su eficacia en campo.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- [2] Chauhan, A., & Singh, R. (2019). Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*, 77(2), 99-113.
- [3] Hoseinifar SH, Sun Y-Z, Wang A, Zhou Z. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Front Microbiol* (2018)
- [4] Schmidt V, Gomez-Chiarri M, Roy C, Smith K, Amaral-Zettler L (2017) Subtle manipulation of the microbiome with probiotics reduces antibiotic-associated mortality in fish. *mSystems* 2 (6): e00133 – e00117.
- [5] Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7577-7587.
- [6] El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A., ... & Abdel-Latif, H. M. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*.
- [7] Wang YC, Hu SY, Chiu CS, Liu CH (2019) Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. *Fish and Shellfish Immunology* 84: 1050–1058.
- [8] Suez, J., Zmora, N., & Elinav, E. (2020). Probiotics in the next-generation sequencing era. *Gut microbes*, 11(1), 77-93.
- [9] Wang, A., Ran, C., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., ... & Zhou, Z. (2019). Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade. *Fish & shellfish immunology*, 86, 734-755.
- [10] Ma, T., & Suzuki, Y. (2018). Dissect the mode of action of probiotics in affecting host-microbial interactions and immunity in food producing animals. *Veterinary immunology and immunopathology*, 205, 35-48.
- [11] Cuellar-Angel, V.M. (2014). *Technical Guide Pathology and Immunology of Penile Shrimp (SECOND EDITION ed.)*. Panama: OIRSA.

- [12] Lee CT, Chen IT, Yang YT, Ko TP, Huang YT, Huang JY, Huang MF, Lin SJ, Chen CY, Lin SS, Lightner DV, Wang HC, Wang AHJ, Wang HC, Hor LI, Lo CF (2015) The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent when acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proc Natl Acad Sci USA 112 (34): 10798–10803.
- [13] LL Fu, Y. Wang, ZC Wu, WF Li In vivo evaluation for oral administration of *Bacillus subtilis* harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* Aquaculture, 322-323 ( 2011 ) , pp. 33 – 38
- [14] Nuñez J, Mora E (2019) Diseño de un protocolo de evaluación de probióticos para camarón *Penaeus vannamei* basado en criterios de calidad.
- [15] Gram, L., Lùvold, T., Nielsen, J., Melchiorsen, J., and Spanggaard, B. (2001) In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. Aquaculture.
- [16] Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E. & Buchmann, K. (2003) Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus 2B). J. Fish Dis., 26, 495–498
- [17] Primicia. Cuatro factores mejoran el índice de producción del sector camaronero. Accedido el 5 de julio de 2021, desde <https://www.primicias.ec/noticias/economia/factores-mejoran-indice-produccion-camaron/>
- [18] Maldonado Muñiz, M. (2020). Biosíntesis de nanopartículas con extractos de macroalgas, caracterización y evaluación contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND/EMS) en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- [19] Valdes, C. E. M., Macías, E. B., Álvarez-González, C. A., Hernández, C. T., & Sánchez, A. J. (2013). Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) en cultivo intensivo. Revista de Biología Tropical, 61(3), 1215-1228.
- [20] Yılmaz, S., Yılmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Abdel-Latif, H. M. (2021). Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. Aquaculture, 737514.

- [21] Villamil-Díaz, L., & Martínez-Silva, M. A. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña.
- [22] Aguirre-Guzmán, G., Lara-Flores, M., Sánchez-Martínez, J. G., Campa-Córdova, A. I., & Luna-González, A. (2012). The use of probiotics in aquatic organisms: A review. *African Journal of microbiology research*, 6(23), 4845-4857.
- [23] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN *et al.* Diversity of human intestinal microbial flora. *Science* 2005 ; **308** : 1635 - 1638 .
- [24] De, R. (2019). Metagenomics: aid to combat antimicrobial resistance in diarrhea. *Gut Pathogens*, 11(1), 47.
- [25] Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV (2013) Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penile shrimp. *Dis Aquat Org* 105:45–55
- [26] Yılmaz, S., Yılmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Abdel-Latif, H. M. (2021). Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. *Aquaculture*, 737514.
- [27] Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S. W., Park, T. J., & Bajpai, R. (2005). Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 96(17), 1897-1906.
- [28] Gatesoupe, F. J. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14(1-3), 107-114.
- [29] B. JL, R.-Z. I. and C. D, "The role of probiotics in aquaculture," *Veterinary Microbiology*, pp. 173-186, 2020.
- [30] Hernández, M. (2020) Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Journal of molecular microbiology*.
- [31] Chithira, M. S., Aishwarya, P. V., Mohan, A. S., & Antony, S. P. (2021). Metagenomic analysis of microbial communities in the sediments of a semi-intensive penaeid shrimp culture system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-4.
- [32] Veiga, P., Suez, J., Derrien, M., & Elinav, E. (2020). Moving from probiotics to precision probiotics. *Nature microbiology*, 5(7), 878-880.

- [33] Singh, T. P., & Natraj, B. H. (2021). Next-generation probiotics: a promising approach towards designing personalized medicine. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-20.
- [34] Douillard, F. P., & De Vos, W. M. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-21.
- [35] O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature microbiology*, 2(5), 1-6.
- [36] Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J., ... & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
- [37] Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1469-1476.
- [38] Cani, P. D., & de Vos, W. M. (2017). Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1765.
- [39] FAO/OMS. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y pautas para la evaluación. FAO Nutrición Alimentaria 2006; 85.
- [40] Khachatryan ZA , Ktsoyan ZA , Manukyan GP , Kelly D , Ghazaryan KA , Aminov RI . Predominant role of host genetics in controlling the composition of the gut microbiota. *PLoS One* 2008 ; **3** : e3064.
- [41] Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Bombo B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC (2014) Consensus statement of the international scientific association of probiotics and prebiotics on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11 (8): 506–514. [https:// doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66)
- [42] Chauhan, A., & Singh, R. (2019). Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis*, 77(2), 99-113.
- [43] Ringø, E. (2020). Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquac Fish* 5: 1–27.
- [44] Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., ... & Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research*, 41(4), 451-467.

- [45] Chythanya, R., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208(1-2), 1-10.
- [46] Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
- [47] Cui, J., Xiao, M., Liu, M., Wang, Z., Liu, F., Guo, L., ... & Liu, C. (2017). Coupling metagenomics with cultivation to select host-specific probiotic micro-organisms for subtropical aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 123(5), 1274-1285.
- [48] Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., & Menasveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167(3-4), 301-313
- [49] Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Van Driessche, K., Decamp, O., & Dinis, M. T. (2005). Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an in vivo approach. *Letters in applied microbiology*, 40(4), 274-277.
- [50] Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio parahaemolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1139-1146.
- [51] Martínez-Cordova LR, Martínez Porchas M, Cortes-Jacinto E (2009) Mexican and world shrimp farming: sustainable activity or polluting industry? *International Journal of Environmental Pollution* 25: 181–196.
- [52] Stewart EJ (2012) Growth of non-cultivable bacteria. *Journal of Bacteriology* 194 (16): 4151–4160.
- [53] Garza DR, Dutilh BE (2015) From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(22): 4287– 4308.
- [54] Cheung, KC, Leung, HM and Wong, MH (2008) Concentrations of metals from marine and freshwater fish common to the Pearl River Delta in southern China. *Arch Environ Contam Toxicol* 54 , 705 - 715 .
- [55] Cui, J., Xiao, M., Liu, M., Wang, Z., Liu, F., Guo, L., Meng, H., Zhang, H., Yang, J., Deng, D., Huang, S., Ma, Y., & Liu, C. (2017). Coupling metagenomics with

cultivation to select host-specific probiotic micro-organisms for subtropical aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5), 1274–1285.

- [56] Lixinhua. (2017, diciembre 4). Announcement of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China No. 2045. Gov.cn. [http://www.moa.gov.cn/nybgb/2014/dyq/201712/t20171219\\_6104350](http://www.moa.gov.cn/nybgb/2014/dyq/201712/t20171219_6104350).