

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Sustratos influyentes en la formación de biopelículas de *Vibrio*
parahaemolyticus

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Luis Kevin Barco Ladines

David Alejandro Triviño Sánchez

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

Dedico este proyecto a mis difuntos abuelos quienes estarían bastante orgullosos y emocionados por poder ver este logro personal. Asimismo, lo dedico al resto de personas quienes por diversas razones ya no se encuentran en mi vida, pero que sé que igualmente se alegrarían por verme completar esta etapa.

David Triviño Sánchez

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a nuestra tutora, la Dra. Jenny Rodríguez, a la Dra. Cecilia Tomalá, del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), en ser nuestras mentoras en este trabajo y en guiarnos en lo primordial durante los ensayos realizados en el proyecto. Además, un fuerte agradecimiento a quienes ayudaron y guiaron durante nuestra estadía en CENAIM y facilitarnos utilizar debidamente y con cuidado en el área de Biodescubrimiento: a los técnicos Iván Gonzabay Aquino, Ricardo Palma y Alejandro Pinos, y a la M.Sc. María Gabriela Agurto

Kevin Barco


Agradecimientos

Agradezco a Dios, por tantos altibajos y pruebas de perseverancia. Agradezco profundamente a mi madre y mi abuelo, por tantos años de apoyo. A mis hermanos, por ser una constante motivación. A nuestra tutora Dra. Jenny Rodríguez y, de igual manera, a la Dra. Cecilia Tomalá, quienes nos brindaron esta grandiosa oportunidad y nos guiaron con sus conocimientos. También un agradecimiento a Iván Gonzabay, técnico de laboratorio quien siempre estuvo presto para brindarnos ayuda y conocimiento adicional. Y de manera general, al resto de personal de CENAIM, quienes de alguna u otra manera ayudaron a llevar a cabo este trabajo.

David Triviño Sánchez

Declaración Expresa

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (nombre de los participantes) y doy(damos) mi(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”



Luis Kevin Barco
Ladines



David Alejandro
Triviño Sánchez

Evaluadores

M. Sc. Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Ph.D. Jenny Antonia

Rodríguez León

Tutor de proyecto

Resumen

El cultivo de camarón es una de las actividades más productivas del sector acuícola en todo el mundo. *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria marina causante de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). Esta bacteria atrapa las larvas de camarón en biopelículas letales causando grandes pérdidas en producción. En este proyecto se investigó los sustratos que favorecen la formación de estas biopelículas letales. Se cultivó la bacteria en diferentes sustratos para monitorear su reacción. Se hicieron observaciones macroscópicas y microscópicas para analizar con detalle el proceso de formación de biopelículas. También se midió la concentración de exopolisacáridos en las muestras de los distintos tipos de biopelículas. Se encontró que el tipo de sustrato influye en la formación de biopelículas. Se comprobó que la bacteria tiene afinidad por la quitina y el quitosano, propio de los caparzones de crustáceos, para formar biopelículas mucilaginosas. Siendo esta posiblemente la principal razón por la cual presenta este fenotipo en presencia de larvas de camarón. Estos resultados brindan una nueva perspectiva sobre la manera en que el *V. parahaemolyticus* usa los recursos del ambiente de cultivo para acceder a los nutrientes (los camarones), proliferar y dominar el paisaje de aptitud.

Palabras Clave: Acuicultura, exopolisacáridos, larvicultura, *Penaeus vannamei*, virulencia bacteriana.

Abstract

*Shrimp farming is one of the most productive activities in the aquaculture sector worldwide. *Vibrio parahaemolyticus* is a marine bacterium that causes acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). This bacteria traps shrimp larvae in lethal biofilms causing great losses in production. In this project, the substrates that favor the formation of these lethal biofilms were investigated. The bacteria were grown on different substrates to monitor their reaction. Macroscopic and microscopic observations were made to analyse the biofilm formation process in detail. The concentration of exopolysaccharides was also measured in the samples of the different types of biofilms. It was found that the type of substrate influences the formation of biofilms. It was found that the bacterium has an affinity for chitin and chitosan, typical of crustacean shells, to form mucilaginous biofilms. This is possibly the main reason why it presents this phenotype in the presence of shrimp larvae. These results provide new insight into how *V. parahaemolyticus* uses resources from the culture environment to access nutrients (shrimp), proliferate, and dominate the fitness landscape.*

*Keywords: Aquaculture, exopolysaccharides, larviculture, *Penaeus vannamei*, bacterial virulence.*

Índice general

Resumen	I
Abstract	II
Índice general	III
Abreviaturas.....	V
Simbología	VI
Índice de figuras	VII
Capítulo 1	1
1. Introducción	2
1.1. Descripción del problema	3
1.2. Justificación del problema.....	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	5
1.1.1. <i>Objetivos específicos</i>	5
1.2. Marco teórico	5
Capítulo 2.....	8
2. Metodología	9
Capítulo 3.....	20
3.1 Resultados y análisis.....	21
<i>Capacidad de crecimiento de V. parahaemolyticus en fuentes de carbono</i> !Error!	Marcador
no definido.	
Capítulo 4.....	30
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	31
4.1.1 <i>Conclusiones</i>	31

<i>4.1.2 Recomendaciones</i>	32
Referencias.....	33

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
UFC	Unidades formadoras de colonia
AHPND	Necrosis hepatopancreática aguda
EPS	Exopolisacáridos
TSA	Agar tripticasa soya
TSB	Caldo Tripticasa soya
CT	Controles
ss	Solución salina
QQ	Mezcla de quitina y quitosano
MO	Materia orgánica
ART	Artemia
CM	Ensayo de muestra con movimiento (agitación)
SM	Ensayo de muestra sin movimiento (agitación)
BA	Ensayo de muestra expuesta a burbujeo alto
BB	Ensayo de muestra expuesta a burbujeo bajo
EXT	Extracto de camarón
MIX	Mezcla entre todos los sustratos antes mencionados
RGB	Modelo de colores basado en la síntesis aditiva (Rojo, Verde y Azul)

Simbología

g	gramo
mg	miligramo
µg	microgramo
L	litro
mL	mililitro
µL	microlitro
nm	nanómetros
pH	Potencial de Hidrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio
HCl	ácido clorhídrico
M	Molar
N	Normal
°C	Grados Celsius (Temperatura)
RCF	Fuerza centrífuga relativa
UFC	Unidades formadoras de colonias
rpm	revoluciones por minuto

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de la metodología y las actividades que se realizaron en este proyecto.....	9
Figura 2: Primer diseño experimental para evaluar el crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes fuentes de carbono presentes en los medios de cultivo de camarón	13
Figura 3: Segundo diseño experimental para evaluar la formación de biopelículas en diferentes sustratos	14
Figura 4: Tercer diseño experimental para evaluar la formación de los distintos fenotipos de biopelículas y el crecimiento planctónico de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> con distintas combinaciones de sustratos y fuentes de carbono	16
Figura 5: Distribución de las muestras en microplaca de 96 pocillos para estimar la concentración de exopolisacáridos en grumos, filamentos y mucilagos producidos por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
Figura 6: Crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes fuentes de carbono	21
Figura 7: Crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes sustratos bajo tratamiento de movimiento de agua.....	24
Figura 8: Observación macroscópica de biopelículas usando diferentes sustratos	25
Figura 9: Observación microscópica (60x) de muestras de mucílagos crecidos en sustrato de extracto de camarón	26
Figura 10: Observación microscópica (60x) de muestras de mucílagos crecidos en sustrato de artemia	27
Figura 11: Estimaciones de concentración de EPS en mg/mL presentes en diferentes muestras	28

Capítulo 1

1. Introducción

En los sistemas de cultivo de larvas de camarón en Ecuador, se ha encontrado la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, capaz de generar grumos y mucilagos que atrapan la materia orgánica, artemias, microalgas e, incluso, a las larvas de camarón. *V. parahaemolyticus* causa la enfermedad de la necrosis aguda hepatopancreática (AHPND). Esta enfermedad relativamente nueva, fue descubierta en China en 2009, siendo antes conocida como síndrome de mortalidad temprana (EMS), por su alta mortalidad especialmente al inicio del ciclo de cultivo en engorde. La enfermedad se desarrolla generalmente durante las primeras etapas de vida del camarón. El vibrio coloniza el estómago y produce las toxinas PirA/PirB que destruyen las células del hepatopáncreas, produciendo una atrofia en el hepatopáncreas del animal junto con cambios histopatológicos que terminan en su muerte (Kumar et al., 2021). Se estima que las pérdidas en producción causadas por AHPND son de alrededor de 4 mil millones USD en América y hasta alrededor de 8 mil millones USD en Asia (Aranguren Caro et al., 2020).

La industria camaronera es una de las actividades productivas más importantes a nivel global. Solo en 2022, se produjeron mundialmente 9.4 millones de toneladas de camarón, a pesar de una baja demanda debido al COVID-19, en el año 2021. En ese mismo año, Ecuador se posicionó como el productor líder de camarón blanco con 1.3 millones de toneladas producidas (FAO, 2023). Debido a su importancia, se tiene una especial atención en los patógenos y enfermedades que afectan al camarón, siendo la AHPND, la vibriosis más agresiva. El principal agente causal es el patógeno *V. parahaemolyticus*, una bacteria letal recurrente en los cultivos de camarón en los últimos años (Aranguren Caro et al., 2020). Los vibrios tienen afinidad por la quitina, sobre la cual se adhieren o forman biopelículas, lo que facilita la colonización de crustáceos en el medio o el uso de la nieve oceánica como fuente de carbono (Teschler et al, 2015).

Las biopelículas son agregados de células bacterianas unidas entre sí a una superficie, que puede ser biótica o abiótica, junto con una matriz mucilaginosa de compuestos exopolisacáridos (EPS). Las biopelículas resultan en una ventaja para la colonización de bacterias sobre una gran variedad de superficies y medios, facilitan la captación de alimentos, permitiéndoles además sobrellevar entornos estresantes, pues brindan un medio estable y cumplen con funciones de protección ante depredadores, virus, antibióticos y sustancias químicas nocivas (Dang & Lovell, 2015). Además, en estado de biopelículas, las células bacterianas aumentan su virulencia, por lo que se facilita la transmisión de enfermedades (Soto-Rodriguez et al., 2022).

1.1. Descripción del problema

V. parahaemolyticus encuentra un medio apropiado para su desarrollo en los tanques y piscinas de producción camaronera, ya que se beneficia de las condiciones y recursos de dichos medios controlados, como la alta temperatura y el pH. Además, la alta disponibilidad de materia orgánica y quitosano les sirve de sustrato para proliferar. Al mismo tiempo, las biopelículas formadas por estos microorganismos les sirven como mecanismos de protección ante posibles agentes antimicrobianos, como el cloro y antibióticos, por lo que no resulta posible erradicarlas sin comprometer a las larvas de camarón (Dang & Lovell, 2015; Wang et al., 2023). Las biopelículas permiten la colonización bacteriana en varios materiales como acero inoxidable, plástico, poliestireno, vidrio y otras superficies abióticas encontradas en los tanques de cultivo, permitiéndoles formar colonias relativamente grandes (Wang et al., 2023). En sistemas de larvas de cultivo de camarón se ha observado recientemente que *V. parahaemolyticus* genera grumos, filamentos y mucilagos muy conspicuos que atrapan a las larvas, llegando a inmovilizarlas y asfixiarlas.

En este estudio se evaluó la naturaleza de biopelículas de grumos y mucílagos que forma *V. parahaemolyticus* al momento de adherirse a distintos sustratos, además de su capacidad de utilizarlos como fuente de carbono por medio de ensayos *in vitro*. Se analizaron las variables que estimulan la aparición de grumos y mucílagos, las mismas que simulan las condiciones encontradas en los sistemas de cultivo de larvas, siendo estas presencia o ausencia de agitación de agua, burbujeo, presencia y ausencia de quitina, quitosano y materia orgánica, como fuentes de carbono. Se determinó las diferencias entre estos fenotipos a través de microscopía y del análisis de exopolisacáridos.

1.2. Justificación del problema

Las larvas son el primer eslabón de la producción camaronera y en ellas no solo las toxinas liberadas por *V. parahaemolyticus* son letales, sino también las biopelículas que producen. Por lo tanto, es importante conocer qué sustratos promueven el desarrollo de los distintos fenotipos de biopelículas letales en los diversos sustratos habituales de las larviculturas, materia orgánica, quitina, para tener una mayor comprensión de estas biopelículas a fin de encontrar formas de contrarrestarlas. Es muy importante conocer estos factores ya que la formación de biopelículas de *V. parahaemolyticus* dentro de medios de cultivo acuícolas, impide el desarrollo normal larvario ya que funcionan como una trampa mortal similar a una telaraña, atrapando de esta manera las larvas de camarón (fuente de nutrientes para el vibrio). Además, las biopelículas promueven el proceso de infección por parte del patógeno en caso de ejemplares adultos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar los sustratos: quitina, quitosano, materia orgánica, que activan biopelículas letales en *Vibrio parahaemolyticus*, causante de AHPND en camarón, evaluando su rol para la identificación de posibles factores inhibidores de estos fenotipos.

1.1.1. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de adherencia de *Vibrio parahaemolyticus* en quitina y quitosano.
- Determinar la capacidad del *Vibrio parahaemolyticus* usando quitina, quitosano y materia orgánica como fuente de carbono.
- Identificar la naturaleza de biopelículas de grumos y mucilagos que se forman en infecciones con *Vibrio parahaemolyticus*, testeando el efecto de los diferentes sustratos como presencia de quitina y quitosano, presencia de materia orgánica, además de la agitación del agua.

1.2. Marco teórico

Una biopelícula es un agregado de microorganismos enlazados en una matriz de polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS), producidos por estos mismos microorganismos para su protección presentándose tanto en superficies bióticas como abióticas. De esta manera, cada superficie sumergida en agua marina puede ser considerada un potencial *hotspot*. La composición de las biopelículas puede ser de una sola especie o por varias especies de bacterias, las cuales pueden ser Gram negativas y Gram positivas (Arunkumar et al., 2020; Dang & Lovell, 2015). En el medio natural, el 90% de los microorganismos se encuentran en forma de biopelículas, las cuales en su mayoría son producidas por bacterias bajo condiciones desfavorables,

como falta de nutrientes o la presencia de inhibidores microbianos (Liu et al., 2021). La colonización de superficies y subsecuente formación de biopelículas resulta en grandes ventajas para estos organismos. Las biopelículas cumplen varias funciones, principalmente de protección, pues brindan un medio estable aislado del exterior, que resulta adecuado para que las células bacterianas mantengan una correcta homeostasis fisiológica. Además, protegen de amenazas como depredadores, virus, antibióticos y agentes antimicrobianos, como desinfectantes clorados (Dang & Lovell, 2015; Wang et al., 2023).

Otras funciones de biopelículas incluyen: facilitar la captación de alimento, pues la matriz de EPS funciona como una capa permeable que permite la actividad enzimática extracelular, excreción de materiales de desecho y metabolitos secundarios y el intercambio de genes de manera horizontal. Además, en forma de biopelículas, se facilita la persistencia y aumenta la patogenicidad de organismos peligrosos (Arunkumar et al., 2020; Dang & Lovell, 2015). De este modo, las células bacterianas que conforman una biopelícula son mucho más resistentes que las células en estado planctónico, y a la vez, más difíciles de erradicar de sus superficies hospedadoras (Arunkumar et al., 2020).

El proceso de formación de biopelículas es complejo e involucra varios factores de regulación. Depende de factores ambientales como temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto y la disponibilidad de alimento (Tran et al., 2020). Asimismo, se ha reportado que en algunos casos la presencia de alcohol y desinfectantes pueden inducir la formación de biopelículas en *Vibrio* spp. (Arunkumar et al., 2020). Además, la relación con otras comunidades microbianas en el medio también juega un factor crucial para la formación de biopelículas. Por ejemplo, *V. parahaemolyticus*, al infectar a los camarones, inicialmente coloniza el estómago, donde subsecuentemente interactúa con el microbioma del intestino, alterando la diversidad de este

(Zhang et al., 2019). Una biopelícula puede ser interpretada como un micro ecosistema dinámico, con sus propios parámetros y procesos fisicoquímicos desarrollándose en su interior (Dang & Lovell, 2015).

V. parahaemolyticus es una bacteria Gram negativa que habita naturalmente en ambientes acuáticos marinos y estuarinos. Puede vivir de forma libre o como colonias (biopelículas) adheridas a distintos tipos de organismos tanto sésiles como planctónicos, como ostras, almejas, mejillones, pulpos, camarones, cangrejos y peces. En su forma de biopelícula, el *V. parahaemolyticus* es más resistente, lo que le ha permitido dispersarse fácilmente de manera intercontinental, debido a su alta patogenicidad y naturaleza persistente (Wang et al., 2023). La quitina es el polisacárido de mayor abundancia en el ambiente marino y un componente principal en la nieve marina.

Particularmente, los vibrios son capaces de aprovechar la quitina disuelta en el agua como fuente de carbono y nitrógeno debido a la enzima quitinasa (Dang & Lovell, 2015). Esto también resulta ventajoso para los vibrios al momento de colonizar superficies de organismos quitinosos, como crustáceos o moluscos, y facilita su proliferación en medios ricos en quitina, como los tanques o piscinas de cultivo en camaroneras (Arunkumar et al., 2020).

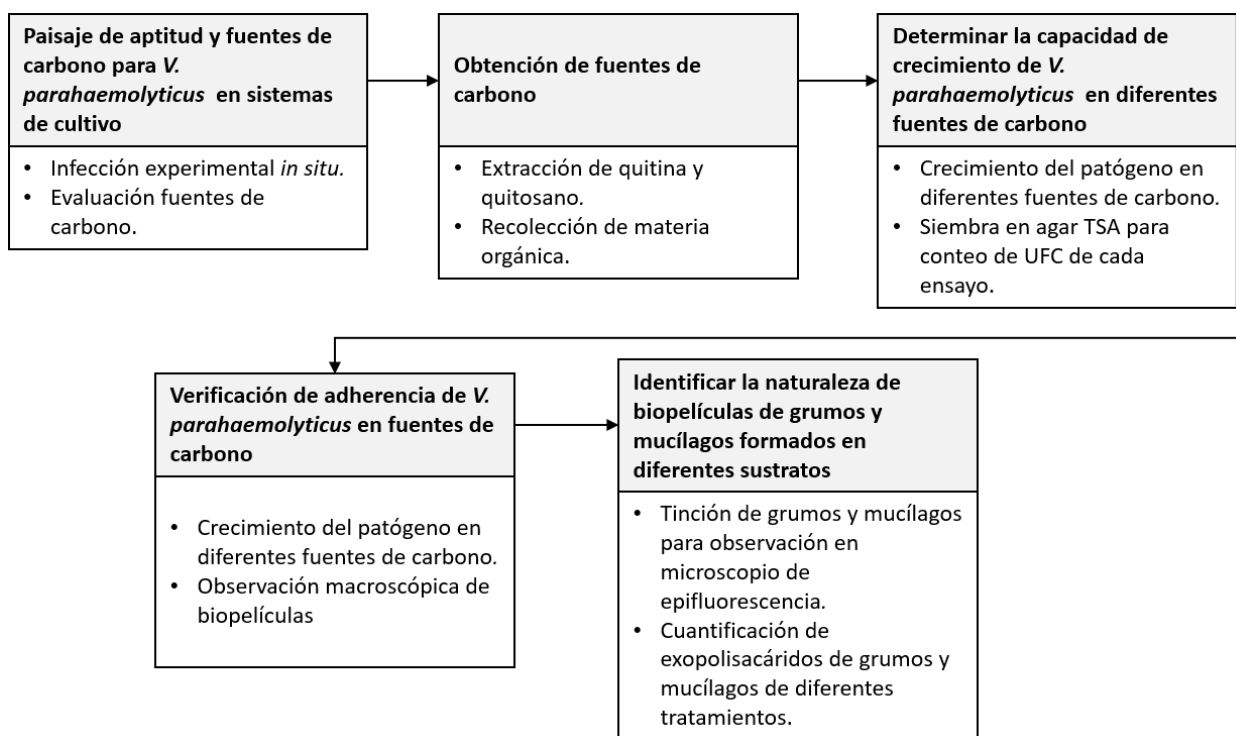
Capítulo 2

2. Metodología

La parte experimental del proyecto se efectuó en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y fue realizada bajo los protocolos detallados en la Figura 1.

Figura 1:

Esquema de la metodología y las actividades que se realizaron en este proyecto



Paisaje de aptitud de *V. parahaemolyticus* y fuentes de carbono en cultivos de camarón

Las fuentes de carbono evaluadas en este paisaje de aptitud:

- Quitina y Quitosano: Son proporcionadas directamente por el camarón.

- **Materia orgánica:** proporcionada por el manejo de medio ambiente (restos de alimentos y heces de acuarios donde están los camarones).

Infección experimental. Desde la estación experimental de CENAIM en Palmar, Provincia de Santa Elena, se trasladaron entre 300 a 400 animales de 8 a 10 gramos de peso aproximadamente por ejemplar. Los camarones fueron aclimatados por una semana. Durante ese lapso se realizaron recambios diarios de agua del 50% y se mantuvo la temperatura del agua a $30^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Se transfirieron los camarones a los acuarios de fibra de vidrio de 50 L, 3 réplicas y 4 controles negativos, 15 camarones por unidad experimental. La alimentación fue del 5% de biomasa. Doce horas antes de la infección no se proporcionó alimentación a los camarones. El día de la infección se realizó un recambio del 50 % en cada unidad experimental y se proporcionó alimento (2.5% de biomasa de camarón) infectado con *V. parahaemolyticus* **BA94C2** (Restrepo et. al., 2018), causante de AHPND, a una concentración de 2×10^8 UFC/g. Durante el ensayo, se controló la mortalidad de los camarones cada 2 horas durante 48 horas.

Recolección de muestras. En un periodo de 6 horas después de la infección, se realizó la recolección de muestras de agua (medio), de materia orgánica.

Obtención de fuentes de carbono

Extracción de quitina y quitosano a partir de cutícula de camarón. Para el crecimiento de biopelículas en los sustratos se avaluó la afinidad de los vibrios por la quitina (Teschler et al., 2015), evaluando tanto quitina como quitosano (en este caso como fuente directa de carbono). Para la obtención de dichos sustratos, se utilizó un protocolo de extracción

de caparazones de crustáceos (Sierra et. al., 2013). Para este caso, se utilizó cutículas de camarón los pasos del protocolo fueron:

a. Desproteínización: las muestras de cutícula fueron tratadas con solución de NaOH, a concentración del 3,5%, relación sólido: líquido 1:10, a temperatura de 95°C, bajo agitación constante durante 2 horas.

b. Desmineralización: Las muestras fueron tratadas con HCl, a concentración de 2N por un tiempo de 90 minutos a temperatura ambiente. Relación sólido: líquido 1:5, bajo agitación constante.

c. Purificación (Obtención de quitina): las muestras fueron inmersas en solución de NaOH al 2%, durante 1 hora, a temperatura cercana a los 100°C. Relación sólido: líquido de 1:5.

d. Desacetilización: La muestra de quitina se procedió a tratar en una solución de NaOH al 60% de concentración por 1 hora a temperatura de 100°C, bajo agitación constante. Relación sólido: líquido de 1:10.

Al finalizar todas las fases, la solución se filtró al vacío para remover cualquier rastro de humedad en la muestra. Luego de la fase de Purificación, la muestra se puso a secar a 50 o 60°C por 2 horas, así mismo, luego de la fase de desacetilización, la muestra se puso a secar a 80°C por 30 minutos a 1 hora

Obtención de materia orgánica. Se extrajo la materia orgánica de los acuarios donde se encuentran camarones en fases de crecimiento. Mediante sifón o limpieza de los acuarios se recolectó aproximadamente 12 gramos de materia orgánica, la misma que fue utilizada como fuente de carbono para futuros ensayos.

Determinar la capacidad de crecimiento de V. parahaemolyticus en diferentes fuentes de carbono

Preparación del patógeno previa inoculación en sustrato. Se activó la cepa patógena a 30°C toda la noche en medio TSA. Después de este tiempo se tomaron diez colonias sembrándolas en medio de cultivo TSB a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3 nm, que equivalen 1×10^8 UFC/mL, por medio de un lector de microplacas Varioskan LUX. Se centrifugó a 4000 RCF a 20°C por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en solución salina. Este inóculo bacteriano se utilizó en los ensayos de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en diferentes fuentes de carbono.

Crecimiento del patógeno en diferentes fuentes de carbono.

Primer diseño experimental. Se decidió utilizar los siguientes sustratos como fuentes de carbono: quitina, quitosano y materia orgánica (estériles). El primer diseño experimental (Figura 2) fue de tres réplicas por cada fuente de sustrato, además de controles solución salina (CT ss) y control con medio de cultivo (CT TSB). Cada unidad experimental constó de 100 mL de solución salina, dependiendo de la fuente de carbono se adicionó quitina (0.005g/10mL), quitosano (0.005g/10mL) y materia orgánica (Figura 2). En cada unidad experimental se adicionó el inóculo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL. Se dejó en crecimiento toda la noche a 30°C. Pasado este tiempo se realizó la siembra en agar de cada muestra.

Figura 2

Primer diseño experimental para evaluar el crecimiento de V. parahaemolyticus en diferentes fuentes de carbono presentes en los medios de cultivo de camarón















Capacidad de crecimiento y verificación de adherencia de V. parahaemolyticus en fuentes de carbono

Crecimiento del patógeno en diferentes fuentes de carbono.

Segundo diseño experimental. Se repitió la inoculación del patógeno en cada sustrato igual que en el primer diseño experimental, pero esta vez en nuevos sustratos como fuentes de carbono: cistos de artemia estériles (ART), una mezcla de quitina y quitosano (QQ) y nuevamente solución salina como control (CT ss). Se añadieron nuevas variables para ser evaluadas que fueron con movimiento (CM), sin movimiento (SM), burbujeo alto (BA) y burbujeo bajo (BB). Cada uno de los ensayos constó de tres réplicas para cada tratamiento (Figura 3). Cada envase contenía 30 mL de solución salina junto con la mezcla de QQ (0.005 g/10 mL) y de ART (≈ 0.037 g/10 mL). Para crear el burbujeo alto y bajo se usaron aireadores con control de flujo de aire. En este ensayo no pretendía solamente medir el crecimiento de la bacteria en diferentes sustratos, sino también monitorear la formación de biopelículas en función del sustrato y tratamiento de agua, y su caracterización morfológica.

Figura 3

Diseño experimental para evaluar la formación de biopelículas en diferentes sustratos

Con movimiento (CM)			
	QQ	ART	CT ss
Sin movimiento (SM)			
	QQ	ART	CT ss
Burbujeo alto (BA)			
	QQ	ART	CT ss
Burbujeo bajo (BB)			
	QQ	ART	CT ss

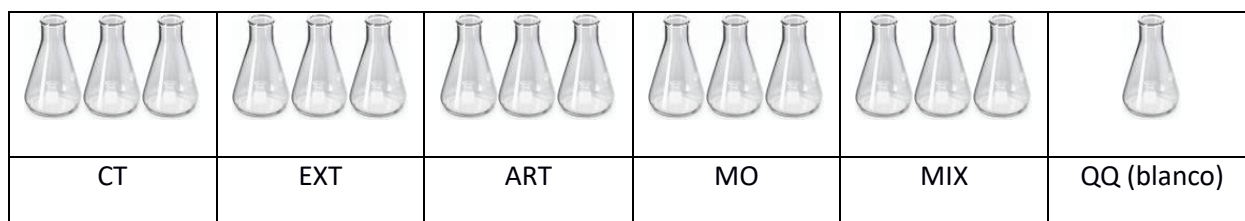
Capacidad de crecimiento del patógeno. Se dejaron las muestras en crecimiento toda la noche. De las distintas fuentes de carbono se tomó una alícuota de cada una y se realizaron diluciones seriadas en solución salina e inmediatamente fueron sembradas en medio TSA (Agar Tripticasa Soya). Se dejó en crecimiento a 28°C por aproximadamente 24 horas. Pasado este tiempo se realizó el conteo de UFC. Este proceso se repitió para los dos primeros diseños experimentales.

Tercer diseño experimental. Se procedió con un nuevo ensayo basado en los anteriores diseños experimentales, modificando las fuentes de carbono en base a los sustratos ya utilizados y adicionando un nuevo sustrato: extracto de camarón. Se hicieron tres réplicas para cada tipo de muestra, las mismas que tuvieron como base una mezcla de QQ (0.005 mg/10mL) Los sustratos utilizados fueron: un control de QQ (CT), extracto de camarón (EXT), artemia (ART), materia orgánica (MO), una mezcla de todos los sustratos (MIX) y un control blanco de QQ sin inocular (QQ). Para obtener el extracto de camarón, se trituraron seis camarones grandes provenientes de las instalaciones de CENAIM (≈ 24 g c/u). El triturado fue filtrado a través de un filtro de malla de 30 μm . Cada frasco contenía 30 mL de solución salina donde fue adicionada la mezcla base de QQ junto a cada sustrato: 100 μL de EXT, ≈ 0.037 g/10 mL de ART, ≈ 0.0042 g de MO. Para el sustrato MIX se usaron las mismas cantidades de cada sustrato mencionado anteriormente. La Figura 4 muestra el diseño experimental para este ensayo.

Observación macroscópica de grumos y mucílago. Tanto para el segundo como para el tercer diseño experimental, se monitoreó cada réplica de cada sustrato periódicamente: primero se dejaron en crecimiento toda la noche (aprox. 12 horas) y luego se observaron cada 2 horas y se anotaron los cambios físicos. Se pudo evidenciar macroscópicamente presencia de grumos, filamentos y/o mucílago.

Figura 4

*Tercer diseño experimental para evaluar la formación de los distintos fenotipos de biopelículas y el crecimiento planctónico de *Vibrio parahaemolyticus* con distintas combinaciones de sustratos como fuentes de carbono*



Identificación de la naturaleza de biopelículas formadas por *V. parahaemolyticus* en diferentes fuentes de carbono

Se filtraron las muestras de grumos y/o mucílagos formados en cada frasco del ensayo del tercer diseño experimental en papel filtro para separar los sólidos por cada sustrato (excepto el control blanco de QQ). Se tomaron dos alícuotas por cada muestra para evaluar adherencia del patógeno a los sustratos, naturaleza de las biopelícula y producción de exopolisacáridos.

Adherencia de *V. parahaemolyticus* en distintas fuentes de quitina y quitosano y observaciones en microscopio de epifluorescencia. Se tomó una alícuota de cada muestra. Las alícuotas fueron disueltas en 100 µl de solución salina (2%ClNa), colocada en portaobjetos. Se cubrió el portaobjeto con naranja de acridina (1 mg/mL) y se dejó en oscuridad por 5 minutos. Se realizaron dos lavados con solución salina para eliminar el exceso de colorante y se observó en el microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse).

Determinación de Exopolisacáridos producidos por *V. parahaemolyticus*.

Una alícuota de los grumos y/o mucilagos se dejó en etanol al 100% toda la noche. Pasado este tiempo se centrifugó a 5000 RCF por 20 minutos a 4°C. Después se dejó evaporar la muestra en el concentrador de vacío SpeedVac por 30 minutos. Se cuantificó la presencia de exopolisacáridos siguiendo el protocolo de ácido sulfúrico – fenol de Dubois et al. (1956) para sacáridos, basado en colorimetría, con algunas modificaciones. De cada muestra procesada se tomaron 40 mg y se disolvieron en 1 mL de solución de ácido sulfúrico – fenol (2 mL de agua Milli-Q, 1 mL de fenol 5% disuelto en agua Milli-Q y 5 mL de ácido sulfúrico). Adicionalmente se hizo la curva estándar de glucosa para usarla como referencia con concentraciones de glucosa de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/mL. Se estimó las concentraciones de EPS de forma visual tomando como referencia las tonalidades de color presentadas por la reacción relacionándolas con la concentración de exopolisacáridos. Se tomaron 200 µL de cada reacción y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos, distribuidas en el orden mostrado en la Figura 5. Por cada una de las tres réplicas de cada sustrato se usaron tres pocillos y se usaron las seis primeras concentraciones de la curva estándar de glucosa.

Figura 5

*Distribución de las muestras en microplaca de 96 pocillos para estimar la concentración de exopolisacáridos en grumos, filamentos y mucilagos producidos por *Vibrio parahaemolyticus**

	1	2	3	4	5*	6	7	8	9	10	11	12
A	QQ1	QQ2	QQ3	EXT1	EXT1*	EXT2	EXT3	ART1	ART2	ART3	MO1	MO2
B	QQ1	QQ2	QQ3	EXT1	EXT1*	EXT2	EXT3	ART1	ART2	ART3	MO1	MO2
C	QQ1	QQ2	QQ3	EXT1	EXT1*	EXT2	EXT3	ART1	ART2	ART3	MO1	MO2
D											MO3	MO3
E											MO3**	MO3
F	C1	C2	C3	C4	C5	C6				MIX3	MIX2	MIX1
G	C1	C2	C3	C4	C5	C6				MIX3	MIX2	MIX1
H	C1	C2	C3	C4	C5	C6				MIX3	MIX2	MIX1

Nota. En la distribución de las muestras, se usaron tres pocillos por cada réplica de muestra. Los pocillos 5A, 5B y 5C contienen la muestra repetida de EXT1 usada en los tres primeros pocillos de la columna 4. La muestra del pocillo 11E, MO3, es la misma que las otra de MO3. En el lado inferior, en las tres últimas filas, las seis primeras columnas corresponden a tres muestras por cada concentración en la curva estándar de glucosa.

Para poder estimar teóricamente la concentración de EPS por muestra, se utilizó la fotografía de la microplaca para tomar los valores RGB de cada pocillo, usando el software Photoshop. Se promedió cada valor de RGB por cada uno de los tres pocillos correspondientes a cada réplica de muestra, y luego, se promediaron estos valores por cada réplica de muestra, para así obtener un solo valor de RGB correspondiente a un solo color por muestra. Se hizo el mismo procedimiento para cada concentración de la curva estándar. Para poder unificar los tres valores RGB de cada color en un solo valor, se aplicó un filtro de escala de grises para cada color obtenido por muestra y concentración.

Con estos valores unificados, considerando que el valor más alto en la escala RGB es 255 y el menor es 0, se encontró el porcentaje de cada muestra respecto a estos límites. El principio de este ensayo se basa en que, mientras más oscuro el color, mayor concentración de EPS en la muestra. Sin embargo, esto es lo contrario en la escala de valores RGB, donde un valor más alto indica la ausencia del color (es decir, más cercano al blanco), por lo tanto, los valores de porcentaje más altos correspondían a las tonalidades más claras. Para hacer coincidir estos porcentajes con la concentración de EPS, simplemente se restó el porcentaje obtenido de 100%.

Tomando en consideración que se conoce la concentración de glucosa de la curva estándar, se tomó el porcentaje de RGB correspondiente a la primera concentración como el 100%, y respecto a este valor se ponderaron los porcentajes de RGB de cada muestra, dando como resultado un nuevo porcentaje que se encuentra debajo del valor conocido correspondiente a cada concentración: 1, 2, 3, 4, 5, 6 mg/mL. Finalmente, se ponderaron estos valores respecto a la concentración madre de glucosa, de 10 mg/mL, para obtener valores de concentración de cada muestra en mg/mL.

Capítulo 3

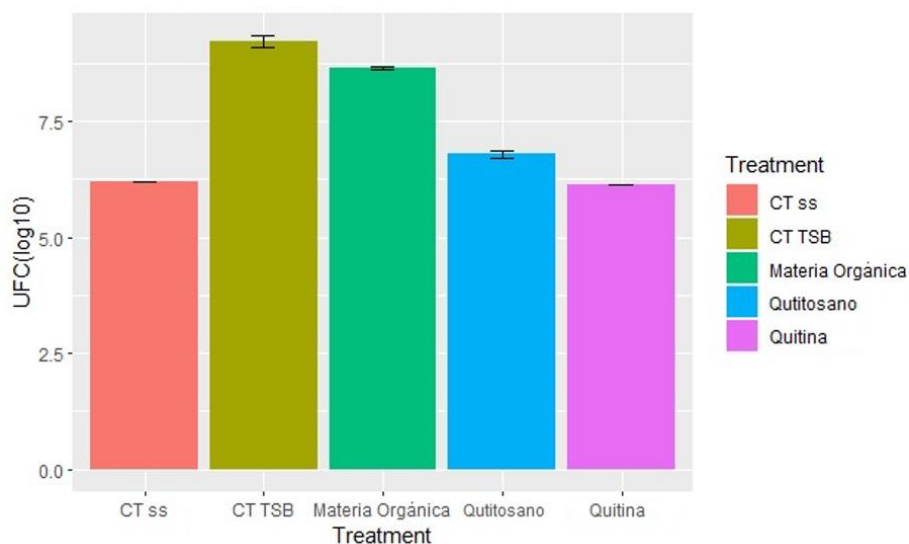
3.1 Resultados y análisis

Crecimiento y observación de biopelículas de V. parahaemolyticus en diferentes sustratos y tratamientos de movimiento del agua

De los cuatro sustratos evaluados como fuentes de carbono para el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, se demostró que el quitosano y la materia orgánica son las mejores fuentes de carbono para esta bacteria patógena de camarón. En el sustrato de quitina creció a escala logarítmica de 5,5 UFC/mL igual que el control en solución salina (Figura 6). Este resultado indica la capacidad del vibrio de utilizar los sustratos del ambiente de cultivo como fuente de carbono para proliferar. La mayor biodisponibilidad de carbono del quitosano explica el mejor crecimiento que en quitina. La presencia de otros nutrientes en materia orgánica explica el mejor crecimiento en este sustrato.

Figura 6

Crecimiento de V. parahaemolyticus en diferentes fuentes de carbono.



Nota. Gráfico de barras que muestra las medias en escala logarítmica de UFC contadas para cada sustrato usado como posible fuente de carbono para el crecimiento de la bacteria.

Se observó macroscópicamente una mayor producción de biopelículas en el sustrato de quitina combinada con quitosano (QQ). En la evaluación de formación de biopelículas las variables de burbujeo alto y movimiento afectó significativamente el crecimiento y la formación de biopelículas de *V. parahaemolyticus*, produciendo crecimiento como fenotipo grumoso, en tanto que con burbujeo bajo y sin movimiento se observó que la formación de las biopelículas es mucho más rápida y eficiente. De esta manera se evidenció la posibilidad que el éxito del vibrio patógeno como fenotipo mucilaginoso (biopelículas) esté influenciado por movimiento y burbujeo del agua, que son variables que se encuentran en los sistemas de cultivo de camarón y larviculturas. Está bien documentado que otros factores físicos como la temperatura o el pH del agua influyen en la formación de biopelículas (Song et al., 2017; Correa et al., 2023), movimiento (Kumar et al., 2020) y virulencia (Tran et al., 2020) de *V. parahaemolyticus*.

Los cistos de artemia poseen quitina y quitosano, como fuente natural de carbono para crecimiento de *V. parahaemolyticus*, además del contenido de otros nutrientes. En la Figura 7 se muestra la evaluación de la nueva fuente de carbono como cistos de artemia estériles (ART) y el control mezcla de quitina y quitosano (QQ) en los diferentes tratamientos de agua descritos en la metodología. Se observó que las fuentes naturales de quitina, quitosano y otros nutrientes (cistos de artemia) fueron las más propicias para obtener mejor crecimiento de la bacteria en la mayoría de los tratamientos, excepto en el de burbujeo bajo, donde solo el sustrato de artemia obtuvo un mejor crecimiento. Asimismo, de manera general, el tratamiento de movimiento de agua no representó diferencias significativas a través de los sustratos usados.

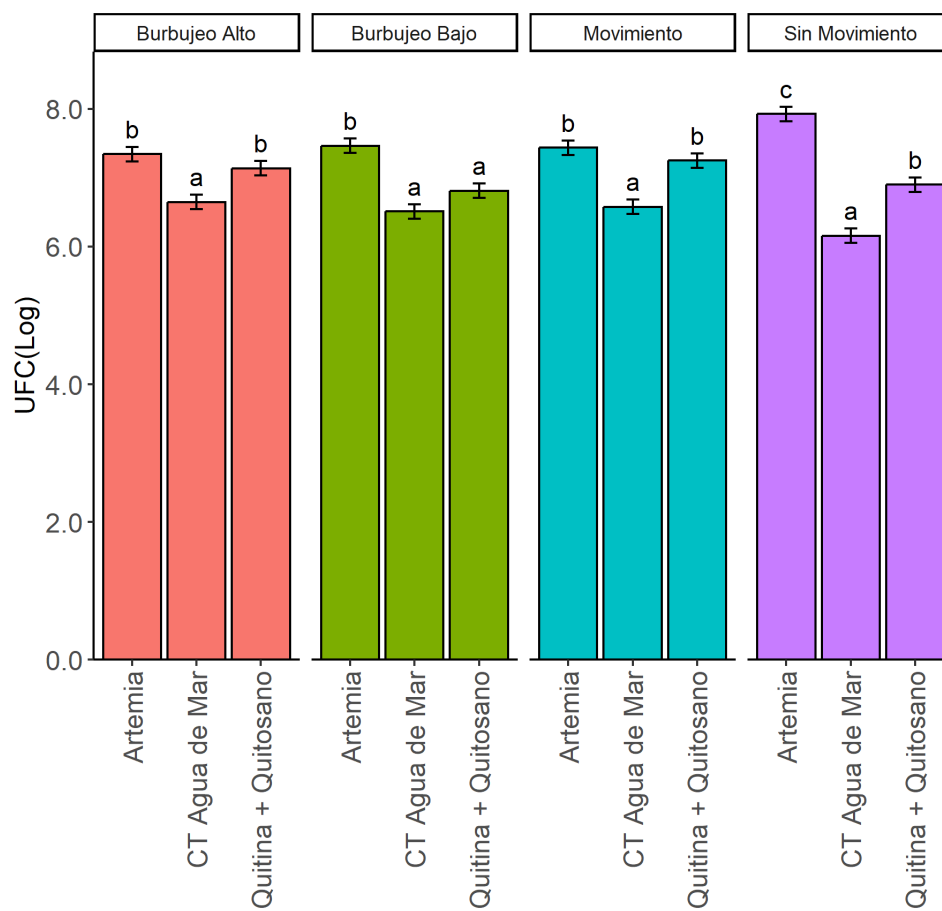
El mayor crecimiento se dio en el sustrato de artemia en ausencia del movimiento de agua, alcanzando una concentración de aproximadamente 8.0 UFC/mL, la más alta comparada con el resto. Estos resultados se asemejan a los de Kumar y colaboradores (2020) donde se

encontró que *V. parahaemolyticus* tiene un mejor crecimiento y formación de biopelículas a bajos niveles de agitación de agua (110 rpm). Por lo tanto, se puede concluir que la bacteria prefiere crecer en medios de bajo o nulo movimiento, razón por la cual el siguiente diseño experimental se realizó en ausencia de movimiento.

Distintas fuentes de carbono (extracto de camarón, artemia y materia orgánica) se combinaron con quitina y quitosano. La Figura 8 presenta los distintos comportamientos presentados por la bacteria dependiendo del sustrato de adherencia y las fuentes de carbono y otros nutrientes. En el sustrato base que sirvió como control (CT), de quitina y quitosano (QQ) (Figura 8A), se evidenció la formación de mucílago sin grumos para cada uno de los tres frascos, junto con la eliminación de partículas de quitina y quitosano del agua y la ausencia de bacterias planctónicas, lo que dio como resultado una alta transparencia de esta. Las tres muestras con extracto de camarón (EXT) (Figura 8B) presentaron una mezcla de grumos y algunos mucílagos débiles, junto con turbidez en el agua y células planctónicas. Estas características se presentaron igualmente en los frascos con artemia (ART) (Figura 8C), donde la única diferencia fue que los mucílagos fueron más notables y mejor formados que en los de extracto de camarón. Por otro lado, los frascos con quitina y quitosano, además de materia orgánica (MO) fueron parecidos a los del control, con transparencia en el agua, muy pocas células planctónicas, y con mucílago bien formado, pero con algunos grumos (Figura 8D). Finalmente, al usar todos los sustratos anteriores en una sola mezcla (MIX) se observó crecimiento planctónico con turbidez del agua y muchos grumos, junto con una ausencia total de mucílagos (Figura 8E). El último frasco sirvió como control blanco al poseer únicamente QQ sin inoculación del patógeno (Figura 8F).

Figura 7

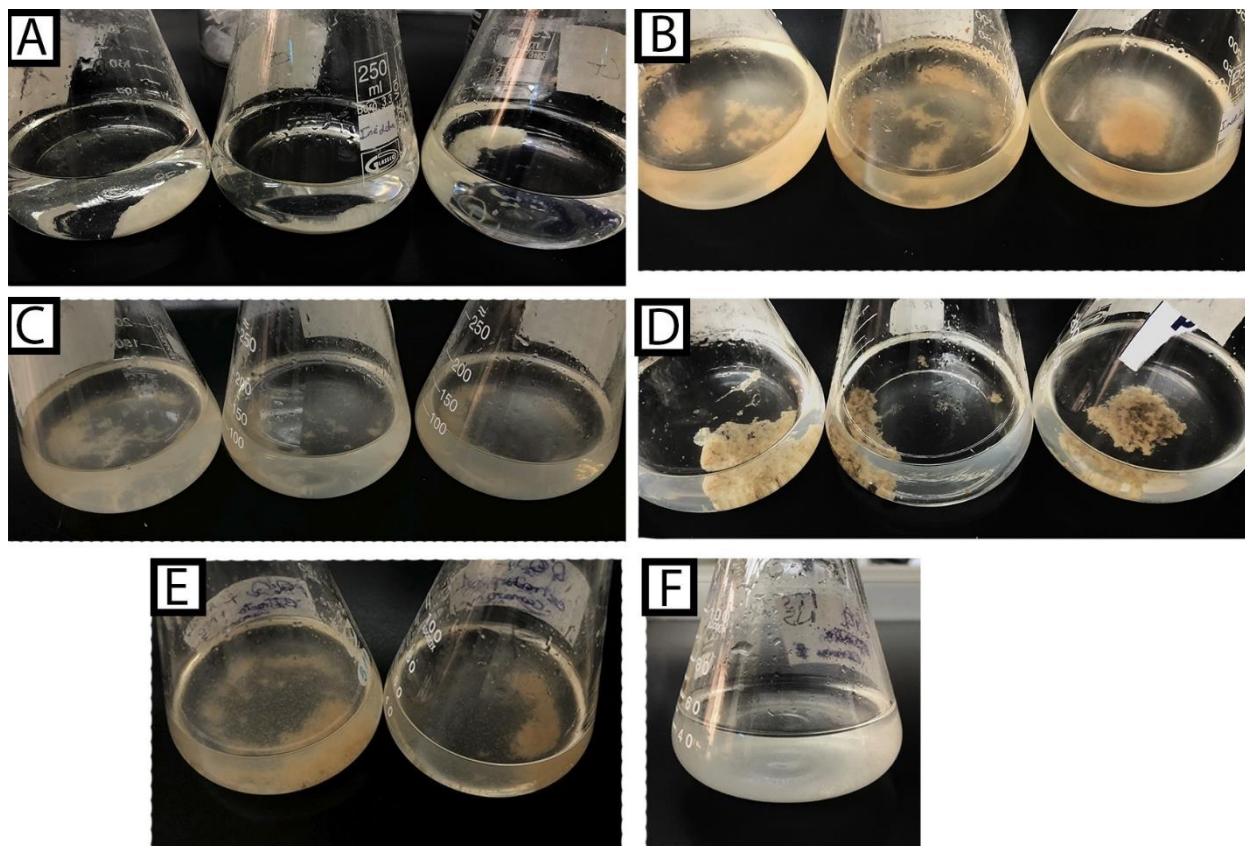
Crecimiento de V. parahaemolyticus en diferentes sustratos bajo tratamiento de movimiento de agua



Nota. Gráfico de barras que muestra las medias en escala logarítmica de UFC contadas para cada tratamiento de agitación de agua en cada sustrato de crecimiento.

Figura 8

Observación macroscópica de biopelículas usando diferentes sustratos



Nota. Diferentes mezclas de sustratos que sirven como fuente de carbono para el patógeno usados para observación macroscópica de biopelículas. Todas las mezclas contienen el conjunto base de QQ. A: CT, B: EXT, C: ART, D: MO, E: MIX, F: QQ sin inoculación.

Varias investigaciones han demostrado la afinidad que presentan los vibrios por la quitina. *Vibrio cholerae* presenta una preferencia por formar biopelículas sobre zooplancton, fitoplancton y en presencia de la quitina marina que se desprende de otros organismos (nieve oceánica). Los exoesqueletos de zooplancton contienen quitina, *V. cholerae* usa este compuesto

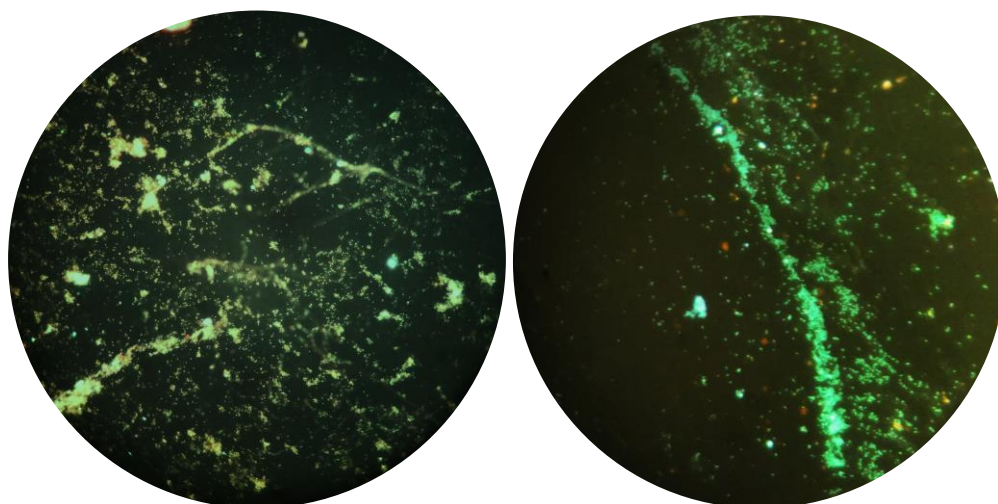
como fuente de carbono (Rawlings et al, 2007). Los resultados presentados en este ensayo demuestran que, al igual que *V. cholerae* y otros vibrios, *V. parahaemolyticus* presenta una preferencia para formar biopelículas mucilaginosas en presencia de quitina. Estos resultados explican porque la bacteria forma biopelículas mucilaginosas adhiriéndose a las larvas de camarón del mismo modo *V. parahaemolyticus* se adhiere a los fragmentos de artemia formando mucilagos alrededor de estos (Figura 9).

Observación de grumos y mucilagos bajo microscopio de epifluorescencia

Se pudo observar la asociación de células en forma de filamentos, grumos o mucilagos, diferenciadas claramente de las planctónicas. A continuación, se presentan algunas de estas observaciones en microscopía de epifluorescencia.

Figura 9

Observación microscópica (60x) de muestras de grumos y mucilagos crecidos en sustrato de extracto de camarón

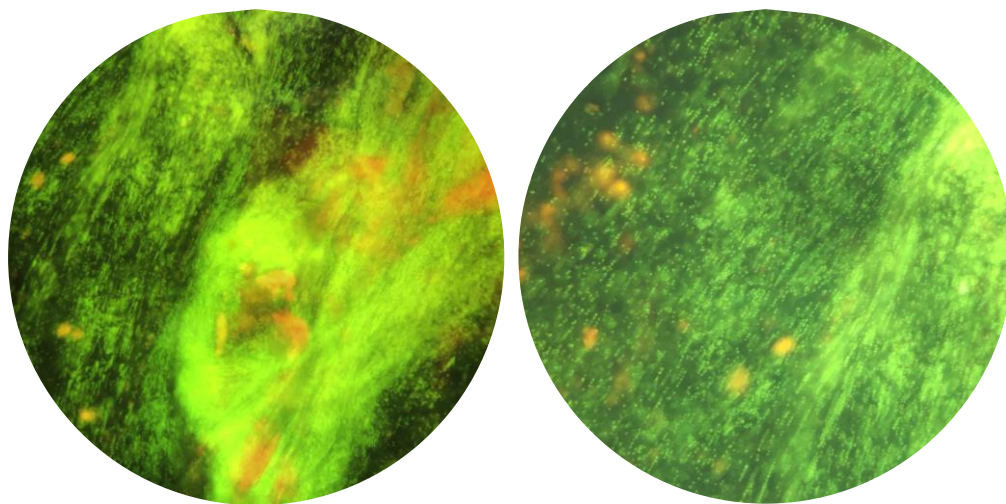


Nota. De izquierda a derecha: la primera figura muestra algunas formaciones filamentosas de células bacterianas con una alta cantidad de células planctónicas en el fondo. Por otro lado, la segunda figura muestra un filamento más linealizado y menos células planctónicas.

Además, se observaron formaciones más ramificadas de células bacterianas (Figura 10), agrupándose en grumos alrededor de fragmentos del sustrato utilizado en la muestra, ya sean partículas de quitina, quitosano, artemia, etc.

Figura 10

Observación microscópica (60x) de muestras de mucílagos crecidos en sustrato de artemia



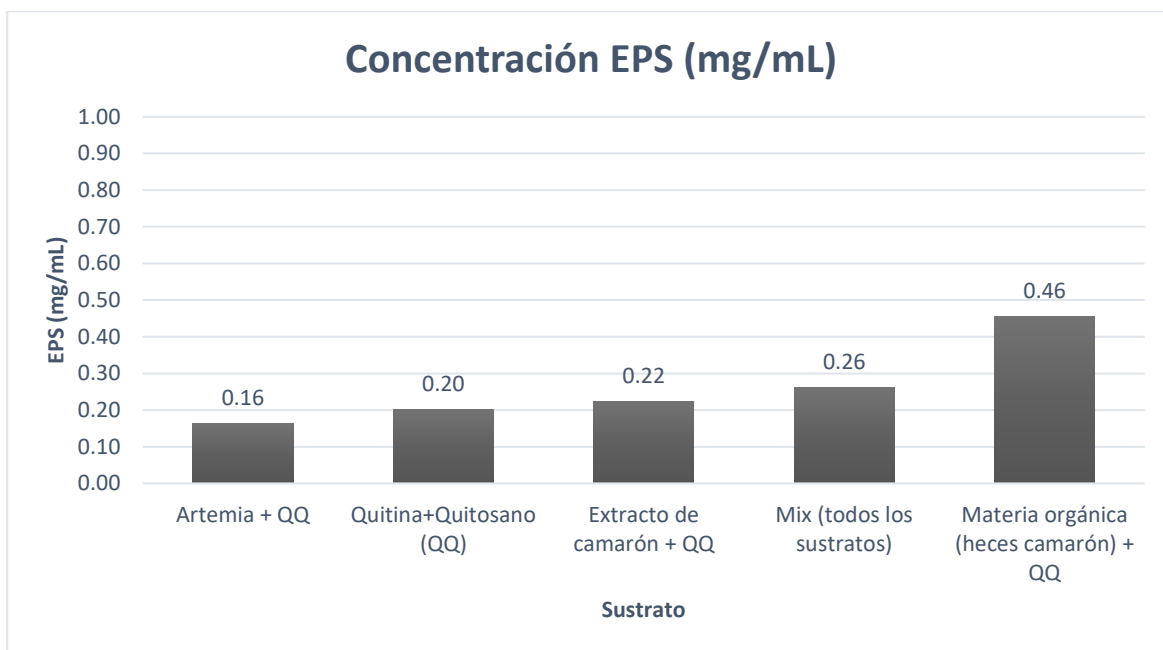
Nota. Se observan formaciones uniformes de bacterias en ramilletes encerrados en mucilagos, y un cúmulo rodeando fragmentos de artemia (en naranja).

Cuantificación de exopolisacáridos

Se estimó la concentración de exopolisacáridos (EPS) presentes en las muestras de grumos y mucílagos encontrados en los diferentes sustratos expuestos a *V. parahaemolyticus*. La Figura 11 representa los resultados de la concentración estimada de EPS en mg/mL, de acuerdo con el procedimiento descrito en metodología. De las muestras usadas en este trabajo, la que menor concentración de EPS presentó fue la de artemia (ART) con 0.16 mg/mL, mientras que la que mayor concentración tuvo fue la de materia orgánica (MO) con 0.46 mg/mL (Figura 11).

Figura 11

Estimaciones de concentración de EPS en mg/mL presentes en diferentes muestras



Nota. Se presentan las estimaciones de concentración de EPS en cada muestra de sustrato usada para el crecimiento de la bacteria.

Las concentraciones de EPS en esta investigación son parecidas a las encontradas en otros vibrios. Se ha encontrado que *Vibrio campbellii* y *Vibrio fortis* produjeron 0.4 y 0.134 mg/mL de EPS, respectivamente. *V. campbellii* produjo cinco monosacáridos: arabinosa, galactosa, manosa y ramnosa, mientras que *V. fortis* solo produjo tres: arabinosa, galactosa y manosa (Kavita et al., 2013). A su vez, estas composiciones son parecidas con las biopelículas de *V. parahamolyticus*: arabinosa, galactosa, glucosa y manosa (Kavita et al., 2011).

También es importante mencionar que, aunque esta cuantificación de EPS se basó en un método de colorimetría, los valores de EPS por muestra son teóricos pues no se hizo uso del

lector de microplacas, como se mencionó en la metodología. Por lo que son necesarios futuros ensayos más precisos. Por otro lado, Felz y colaboradores (Felz et al., 2019), mencionan que los métodos de cuantificación de EPS basados en colorimetría no terminan siendo completamente precisos, y en su lugar recomiendan métodos más analíticos como cromatografía de gases (GC), espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), entre otros.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

- El sustrato que favoreció el mejor crecimiento del vibrio fue la materia orgánica, seguido del quitosano, el crecimiento bacteriano usando quitina no fue superior al control negativo. indicando que el vibrio es incapaz de usar quitina como fuente de carbono sin un aporte adicional de otra fuente con mayor biodisponibilidad.
- Los diferentes sustratos usados dieron como resultado diferentes tipos de biopelículas diferenciables a simple vista, donde la variable del tiempo fue un factor determinante. El sustrato de quitina o quitosano fue el que formó mucílago de manera más rápida y eficiente. Los demás sustratos tardaron más en formar estructuras filamentosas y mucilaginosas, predominando los grumos y células planctónicas. Estos resultados indican que la quitina es el factor inductor del fenotipo mucilago para *V. parahaemolyticus*.
- El factor físico del movimiento del agua influye en el crecimiento y la formación de biopelículas. La ausencia de agitación o movimiento del agua favorecen el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, así como la formación más rápida y eficiente de biopelículas.
- El tipo de fuente de carbono influye en la concentración de exopolisacáridos, donde la mayor concentración fue para la mezcla de quitina con quitosano y materia orgánica (presencia de grumos). Este resultado indicaría que el fenotipo de grumos genera mayor concentración de EPS.

- *V. parahaemolyticus*. presentó una notable afinidad al sustrato de quitina con quitosano, componentes propios del caparazón de los crustáceos, para formar biopelículas de tipo mucílago. En microscopía los mucilagos presentaron haces bacterianos bien organizados adheridos al sustrato. Estos resultados explican la expresión de este fenotipo en presencia de larvas de camarón.

4.1.2 Recomendaciones

Los resultados en este trabajo brindan una nueva perspectiva sobre la forma en que *V. parahaemolyticus* usa los recursos en el ambiente de cultivo de camarón. Se recomienda realizar una prueba mucho más precisa para la cuantificación de exopolisacáridos, con el fin de entender mejor la composición de estas sustancias y tener una mejor comprensión sobre su relación con el tipo de fuente de carbono usada por la bacteria. De igual manera, se recomienda continuar con investigaciones más profundas en base a los resultados presentados aquí, por ejemplo, investigaciones relacionadas a verificar la expresión de los genes que activan los distintos tipos de fenotipos de biopelículas, en función del tipo de sustrato.

Referencias

- Aranguren Caro, L. F., Mai, H. N., Noble, B., & Dhar, A. K. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. *Journal of Invertebrate Pathology*, *174*, 107424.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., & Nithya, C. (2020). In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* spp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry*, *94*, 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.029>
- Correa Velez, K. E., Leighton, R. E., Decho, A. W., Pinckney, J. L., & Norman, R. S. (2023). Modeling pH and Temperature Effects as Climatic Hazards in *Vibrio Vulnificus* and *Vibrio Parahaemolyticus* Planktonic Growth and Biofilm Formation. *GeoHealth*, *7*(4), e2022GH000769. <https://doi.org/10.1029/2022GH000769>
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2015). Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 91-138.
<https://doi.org/10.1128/membr.00037-15>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, *28*(3), 350-356.
- FAO. (2023, febrero 20). *Global farmed shrimp production increased in 2022 despite low demand*. Information and Analysis on Markets and Trade of Fisheries and Aquaculture Products. <https://www.fao.org/in-action/globefish/news-events/trade-and-market-news/q1-2023-jan-mar/en/>
- Felz, S., Vermeulen, P., van Loosdrecht, M. C. M., & Lin, Y. M. (2019). Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*, *157*, 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.068>

- Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2011). Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling*, *27*(3), 309-317.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2011.562605>
- Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2013). Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications. *Carbohydrate Polymers*, *94*(2), 882-888. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.010>
- Kumar, V., Roy, S., Baruah, K., Van Haver, D., Impens, F., & Bossier, P. (2020). Environmental conditions steer phenotypic switching in acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*, affecting PirAVP /PirBVP toxins production. *Environmental Microbiology*, *22*(10), 4212-4230. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14903>
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins*, *13*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>
- Liu, M., Zhu, X., Zhang, C., & Zhao, Z. (2021). LuxQ-LuxU-LuxO pathway regulates biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiological Research*, *250*, 126791.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126791>
- Rawlings, T. K., Ruiz, G. M., & Colwell, R. R. (2007). Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the Copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(24), 7926-7933. <https://doi.org/10.1128/AEM.01238-07>
- Restrepo, L., Bayot, B., Bajaaná, L., Betancourt, I., & Reyes Muñoz, A. (2019). Genomics and metagenomics: Tools for discovering and evaluating efficient shrimp probiotics. In Libro de resúmenes (Ed.), *XX CONGRESO ECUATORIANO DE ACUICULTURA* (pp. 12–13). Guayaquil, Ecuador.

- Sierra, D. M. E., Orozco, C. P. O., Rodríguez, M. A. Q., & Villa, W. A. O. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*, 18(1), 260-266.
- Song, X., Ma, Y., Fu, J., Zhao, A., Guo, Z., Malakar, P. K., Pan, Y., & Zhao, Y. (2017). Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation. *Food Control*, 73, 485-491. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.041>
- Soto-Rodriguez, S. A., Magallón-Servín, P., López-Vela, M., & Nieves Soto, M. (2022). Inhibitory effect of marine microalgae used in shrimp hatcheries on *Vibrio parahaemolyticus* responsible for acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture Research*, 53(4), 1337-1347. <https://doi.org/10.1111/are.15668>
- Tran, V. N., Nguyen, P. N. V., & Nguyen, T. T. H. (2020). Effects of pH, temperature and oxygen-limited condition on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Science and Technology Development Journal*, 23(3), Article 3.
- Teschler, J. K., Zamorano-Sánchez, D., Utada, A. S., Warner, C. J. A., Wong, G. C. L., Linington, R. G., & Yildiz, F. H. (2015). Living in the matrix: Assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3433>
- Wang, D., Fletcher, G. C., On, S. L. W., Palmer, J. S., Gagic, D., & Flint, S. H. (2023). Biofilm formation, sodium hypochlorite susceptibility and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 385, 110011. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110011>
- Zhang, X., Yuan, J., Sun, Y., Li, S., Gao, Y., Yu, Y., Liu, C., Wang, Q., Lv, X., Zhang, X., Ma, K. Y., Wang, X., Lin, W., Wang, L., Zhu, X., Zhang, C., Zhang, J., Jin, S., Yu, K., ... Xiang, J. (2019). Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent

molting. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>