



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA

DEPARTAMENTO DE ACUACULTURA

“Efecto de bacterias ácido lácticas en el sistema inmune y la supervivencia de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado naturalmente con virus de ADN (WSSV e IHNV)”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

KARLA YERIANA LEYVA MADRIGAL

GUASAVE, SINALOA, AGOSTO DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave el día 4 del mes agosto del año 2010, el (la) que suscribe Karla Yeriana Leyva Madrigal alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B081122, adscrito a CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. Antonio Luna González y César Marcial Escobedo Bonilla y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto de bacterias ácido lácticas en el sistema inmune y la supervivencia de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado naturalmente con virus de ADN (WSSV e IHHNV)”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección yeriana28@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Karla Yeriana Leyva Madrigal

Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 09:00 horas del día 02 del mes de agosto del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa para examinar la tesis titulada:

"Efecto de bacterias ácido lácticas en el sistema inmune y la supervivencia de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado naturalmente con virus de ADN (WSSV e IHNV)"

Presentada por el alumno:

<u>Leyva</u> Apellido paterno	<u>Madrigal</u> Apellido materno	<u>Karla Yeriana</u> Nombre(s)
		Con registro:
		B 0 8 1 1 2 2

aspirante de:

Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Antonio Luna González

Dr. César Marcial Escobedo Bonilla

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Dr. Juan Carlos Sainz Hernández

Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Jesús Méndez Lozano



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

“La verdadera ciencia consiste en conocer que se sabe lo que realmente se sabe, y que se ignora lo que en verdad se ignora. En esto consiste la verdadera sabiduría”.

Confucio

La presente investigación se llevó a cabo en el Departamento de Acuicultura del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Sinaloa, del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección del Dr. Antonio Luna González. La autora agradece el apoyo económico brindado por el IPN como becario PIFI y del programa de becas de posgrado, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada CVU 225126 durante la realización de este trabajo.

Todo el esfuerzo, dedicación y pasión puestos en este trabajo se los dedico a todas aquellas personas que me apoyaron y creyeron en mí durante todo este proceso. Mil gracias por estar tanto física como emocionalmente a mi lado.

Este nuevo logro académico también es de ustedes que me dieron la fortaleza, los ánimos y la paciencia para concluir mis estudios de maestría.

De manera especial le dedico este trabajo a cuatro maravillosas personas que perdí en el camino y extrañare por siempre.

A mi primo *Sergio Antonio Félix Madrigal †*. Gracias primo por dejar huella en los corazones de todos los que te queremos. Se que la biología fue uno de tus más grandes gustos y es por eso que te dedico este trabajo. Te quiero primo.

A mi tía *Elvira †*. Gracias tía por todo el cariño que me demostraste desde niña. Muchas gracias por las tardes que compartimos jugando lotería y por los dolores que cesaste con tus manos. Te quiero mucho.

A mi tío *Mayel †*. Gracias tío por marcar mi niñez y la de todos lo que te rodearon. Aunque nunca pudiste expresarte correctamente se que dentro de ti había un gran cariño hacia todos nosotros. Te quiero tío.

A mi tía *Susana †*. Mil gracias tía por cuidar de mi cuando pequeña, por permitirme ayudarte en tus tareas diarias, por dejarme lavarte las tripas (como solíamos decir) y sobre todo muchas gracias por el amor que me tenías. Te quiero mucho.



AGRADECIMIENTOS

A *Dios* por el regalo de la vida y el tiempo vivido, por mostrarme el camino a seguir y rodearme de tanto amor.

A mis padres *Heriberto Leyva* y *Ana Luisa Madrigal* por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprensido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque gracias a ustedes soy la persona que soy. Los amo.

A mis hermanos *Anhery (la gordis)*, *Heriberto (el cerdo)* y *Herian (la pulga)* por compartir toda una vida conmigo, por ser los mejores amigos y confidentes, por el apoyo que siempre me han brindado. Los amo.

A mi hermoso sobrino *Abraham* por alegrarme los días con sus locuras y hacer mi vida más divertida. Te amo flaco.

A mi esposo y amigo *Arturo* por amarme y escogerme como compañera de vida, por soñar y luchar a mi lado, por creer en mí y alentarme a cumplir cada una de mis metas. Te amo.

Al *Dr. Antonio Luna* por permitirme ser su alumna y apoyarme con sus correcciones y comentarios a lo largo de este camino. Gracias Doc.

A mis tutores *Dr. Ignacio Maldonado*, *Dr. Dagoberto Armenta*, *Dr. Juan Carlos Sainz* y *Dr. César Escobedo* por sus aportaciones a este trabajo y el valioso tiempo que dedicaron a la revisión y exposición de los avances de tesis a lo largo de estos dos años. Muchas gracias.

A mis amigas *Denisse*, *Mariel* e *Austón* por soportar las largas pláticas en torno a mi trabajo que se muchas veces no comprendían pero escuchaban atentas y con gusto. Gracias por seguir presentes después de tanto tiempo. Las quiero mucho.

A mis compañeros *Damaris*, *Carmen*, *Odet*, *Edahlí*, *Damián*, *Alex*, *Daniel*, *Natalie*, *Lucy*, *Raquel*, *Abraham* por su amistad y apoyo en este tiempo. A mi amigo a distancia *Alejandro* por escuchar y apoyarme a pesar de los kilómetros.

A *Derín Ortiz* por apoyarme en mi particular situación académica ante CIIDIR y CONACyT. Muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
GLOSARIO	X
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XIX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	6
III. JUSTIFICACIÓN	8
IV. OBJETIVOS	10
V. HIPÓTESIS	10
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)	11
6.2 Caracterización de las cepas bacterianas	11
6.2.1 Prueba de hemólisis en sangre humana	11
6.2.2 Cinética de crecimiento bacteriano de los aislados de BAL	12
6.2.3 Conteo de UFC mL ⁻¹ de BAL	12
6.2.4 Tinción con rojo congo (Prueba de hidrofobicidad)	12
6.2.5 Actividad enzimática extracelular	13
6.2.5.1 Prueba de degradación de la caseína	13
6.2.5.2 Prueba de hidrólisis de la gelatina	13
6.2.5.3 Prueba de hidrólisis de Tween 80 (Actividad lipolítica)	14
6.2.6 Prueba de antagonismo contra <i>Vibrio</i> sp.	14
6.2.7 Prueba de hemólisis con hemolinfa de camarón	14
6.2.8 Morfología y tinción de Gram	15
6.2.9 Identificación molecular de BAL	15
6.2.9.1 Extracción de ADN bacteriano con el kit Bactozol (MRC, Cincinnati, OH., USA)	15
6.2.9.2 Amplificación del gen 16S ADNr	16
6.2.9.3 Limpieza del producto de PCR	17
6.2.9.4 Cuantificación de ADN	17
6.2.9.5 Amplificación del gen 23S y 5S ADNr	17
6.2.9.6 Limpieza del producto de PCR	18
6.2.9.7 Cuantificación de ADN	18
6.2.9.8 Secuenciación	18

6.2.9.9 Análisis de secuencias e inferencia filogenética	19
6.3 Experimentos	19
6.3.1 Adición de las BAL al alimento	19
6.3.1.1 Estudio de viabilidad de las BAL adicionadas al alimento	20
6.3.2 Mantenimiento y operación	20
6.3.3 <i>Experimento 1: Distintas concentraciones de BAL en el alimento y su efecto sobre la supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHHNV en L. vannamei.</i>	21
6.3.3.1 Diseño experimental	21
6.3.3.2 Obtención de hemolinfa y conteo total de hemocitos	21
6.3.3.3 Prevalencia de camarones infectados con los virus WSSV e IHHNV	22
6.3.3.3.1 Extracción de ADN	22
6.3.3.3.2 PCR para WSSV	23
6.3.3.3.3 PCR para IHHNV	23
6.3.3.3.4 PCR para el gen GAPDH	24
6.3.4 <i>Experimento 2: Efecto de la frecuencia de aplicación de BAL en la supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHHNV en camarones blancos.</i>	24
6.3.4.1 Diseño experimental	24
6.4 Análisis estadístico	25
VII. RESULTADOS	26
7.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)	26
7.2 Caracterización de los aislados bacterianos	26
7.2.1 Prueba de hemólisis con sangre humana	26
7.2.2 Cinética de crecimiento bacteriano (curva de crecimiento)	27
7.2.3 Conteo de BAL presuntivas	27
7.2.4 Tinción con Rojo Congo (Prueba de hidrofobicidad)	28
7.2.5 Actividad enzimática extracelular	29
7.2.6 Prueba de antagonismo contra <i>Vibrio</i> sp.	32
7.2.7 Hemólisis en hemolinfa de camarón	32
7.2.8 Tinción de Gram	33
7.2.9 Identificación molecular	33
7.3 Selección de aislados con potencial probiótico	37
7.4 Experimento 1: Distintas concentraciones de inclusión de BAL presuntivas en el alimento y su efecto sobre la supervivencia y sistema inmune de organismos sanos de L. vannamei.	40
7.4.1 Adición de las BAL presuntivas al alimento	40
7.4.1.1 Estudio de viabilidad de las BAL presuntivas adicionadas al alimento	40
7.4.2 Mantenimiento y operación	40
7.4.3 Conteo total de hemocitos	41
7.4.4 Supervivencia y prevalencia de camarones infectados con WSSV e IHHNV	42
7.4.5 PCR para el gen GAPDH	43

7.5 Experimento 2: Efecto de la frecuencia de aplicación de BAL presuntivas en la supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHHNV en <i>L. vannamei</i>.	44
7.5.1 Mantenimiento y operación	44
7.5.2 Conteo total de hemocitos	45
7.5.3 Supervivencia y prevalencia de camarones infectados con WSSV e IHHNV	46
VIII. DISCUSIÓN	49
IX. CONCLUSIONES	59
X. ANEXOS	60
XI. REFERENCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la región de ADNr procariótico que muestra el lugar aproximado de anillamiento de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes 16S, 23S y 5S. En la figura no se muestra el oligonucleótido KP23S-F2 ya que su posición es muy cercana al oligonucleótido KP23S-F1 (nueve nucleótidos arriba). 16

Figura 2. Cinética de crecimiento de BAL presuntivas en medio MRS con 2% de NaCl, cultivadas a 30 °C por 96 h. a) Aislados 20,21,22 y 23; b) Aislados 28,29, 31 y 32; c) Aislados 33, 34 y 36; d) Aislados 37, 38 y 39. 27

Figura 3. Prueba de tinción con rojo congo. A la izquierda se muestra el aislado 29 teñido de un color rosa debido al pH (4.5) y a la derecha el aislado 23, teñido de rojo (pH 5.5). 29

Figura 4. Prueba de degradación de la caseína, con sobrenadante a pH 4.5. A la izquierda se muestra la placa del aislado 20 al 32 y a la derecha se muestra del aislado 33 al 39. CA: Control ácido (MRS con 2% de NaCl a pH 4); C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5); C+35: Control positivo (Cepa 35, β -hemolítica). 30

Figura 5. Prueba de degradación de la caseína, con sobrenadante a pH 6.5. A la izquierda se muestra la placa del aislado 20 al 32 y a la derecha se muestra del aislado 33 a la 39. C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5); C+35 y C+27: Control positivo (Cepa 35 y 27, β -hemolíticas). Puntas de flecha; aislados con actividad proteolítica (28, 29, 34 y 37). 31

Figura 6. Prueba de antagonismo de los aislados 33-39 contra la cepa 24 de vibrio. A la izquierda se muestra la placa con los sobrenadantes a pH 4.5 y a la derecha la placa con sobrenadantes a pH 6.5. CA: Control ácido (MRS con 2% de NaCl a pH 4); C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5) 32

Figura 7. Prueba de hemólisis en hemolinfa de camarón con sobrenadante a pH 6.5. A la izquierda se muestra la placa del aislado 20 al 32 y a la derecha la placa con los aislados 33 al 39. C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5). 32

Figura 8. Hemocitos teñidos con rosa de bengala y embebidos en medio basal. 33

Figura 9. Tinción de Gram. Cocos Gram (+) con arreglo en múltiplos de 2, 3 y racimos. 33

Figura 10. Productos de la PCR obtenidos de la amplificación del gen ribosomal 16S de los 8 aislados probados. Línea -: Control negativo; Línea M: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); Línea 20-39: Aislados de BAL. 34

Figura 11. Productos de la PCR obtenidos de la amplificación de los genes 23S y 5S de los 8 aislados probados. Línea -: Control negativo; Línea M: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); Línea 20-39: Aislados de BAL. 35

Figura 12. Productos de la PCR obtenidos de la amplificación con los oligonucleótidos internos (PK23S-F1, arriba y PK23S-F2, abajo) y el oligonucleótido P5S_R en los aislados de BAL presuntivas. Línea -: Control negativo; Línea M: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline). 36

Figura 13. Árbol filogenético mostrando la posición relativa de cinco aislados de BAL (BALCS20, BALCS28, BALCS29, BALCS33 y BALCS34), deducido por el método del vecino más cercano (neighbor-joining method) de la secuencia parcial del gen 23S ADNr. 37

Figura 14. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas adicionadas al alimento en un periodo de 5 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C). II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6). 40

Figura 15. Experimento I. Número promedio de hemocitos en cada tratamiento. I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); III, Camaronina

+ DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6). Se muestra la media y el error estándar ($p > 0.05$). 42

Figura 16. Experimento I. PCR para IHHNV en cada tratamiento. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6). 43

Figura 17. Experimento I. PCR anidado para WSSV en cada tratamiento. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6). 43

Figura 18. Experimento I. PCR del gen GAPDH de los organismos negativos para WSSV e IHHNV. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; C, Grupo control; II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6). 44

Figura 19. PCR anidada para WSSV realizado a 30 camarones de un lote de 150, antes de iniciar el experimento II. 44

Figura 20. PCR para IHHNV realizado a 30 camarones de un lote de 150, antes de iniciar el experimento II. Las flechas rojas indican las muestras positivas para el virus. 45

Figura 21. Experimento II. Número promedio de hemocitos en cada tratamiento. I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días. Se muestra la media y el error estándar ($p > 0.05$). 46

Figura 22. Experimento II. Supervivencia en cada uno de los tratamientos al finalizar el experimento. I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días. Se muestra la media y la desviación estándar ($p > 0.05$). 47

Figura 23. Experimento II. PCR anidada para WSSV en cada tratamiento. (M) Marcador de peso molecular; (-) Control negativo; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días. 47

Figura 24. Experimento II. PCR para IHNV en cada tratamiento. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días. 48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de hemólisis en agar sangre.	26
Tabla 2. Unidades formadoras de colonias por mililitro de cada uno de los aislados. La densidad óptica de la suspensión bacteriana fue de uno.	28
Tabla 3. Pruebas de actividad enzimática extracelular con sobrenadante ácido. Se midió el diámetro del halo de hidrólisis.	30
Tabla 4. Pruebas de actividad enzimática extracelular con sobrenadante a pH 6.5. Se midió el diámetro del halo de hidrólisis.	31
Tabla 5. Identificación molecular de los aislados secuenciados con los oligonucleótidos 27f y 1492r.	34
Tabla 6. Resultados de la identificación molecular de los aislados secuenciados con los oligonucleótidos P23S_F1 y P5S_R.	35
Tabla 7. Identificación molecular de los aislados secuenciados con el oligonucleótido interno KP23S-F1.	37
Tabla 8. Pruebas de caracterización de 12 aislados presuntivos de BAL (γ -hemolíticas) con potencial probiótico.	39
Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos del sistema de cultivo en el experimento I. Se muestra la media y desviación estándar (DE).	41
Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos del sistema de cultivo en el experimento II. Se muestra la media y desviación estándar (DE).	45

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
BAL	Bacterias ácido lácticas
CTH	Conteo total de hemocitos
DO	Dry oil
IHHNV	Infectious Hipodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética)
M1BAL	Mezcla 1 de bacterias ácido lácticas
M2BAL	Mezcla 2 de bacterias ácido lácticas
MRS	Medio de cultivo Man, Rogosa y Sharp
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PO	Fenoloxidasas
proPO	Profenoloxidasas
TSV	Taura Syndrome Virus (Virus del síndrome del Taura)
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
WSSV	White Spot Syndrome Virus (Virus del síndrome de la mancha Blanca)

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Ácido nucleico que se encuentra principalmente en los cromosomas que contienen la información hereditaria de los organismos. La molécula está constituida por dos cadenas complementarias de nucleótidos formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T) son las bases nitrogenadas que forman el ADN.

Acuicultura

Biología cuyos métodos y técnicas abarcan el manejo y control total o parcial de los cuerpos de agua y de sus recursos bióticos, con el objetivo de lograr su aprovechamiento socioeconómico o bien por interés de tipo biológico.

Cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. El cultivo implica alguna forma de intervención en el proceso de cría para aumentar la producción, tales como el aprovisionamiento regular, la alimentación, la protección contra depredadores, etc., así como la propiedad individual o colectiva del stock que se cultiva.

Amplificación

Incremento en la frecuencia de un gen o región cromosómica como resultado de la replicación de un segmento de ADN ya sea *in vivo* o *in vitro*, como la duplicación de un gen o PCR, respectivamente.

Anaerobio

Organismo que crece en la ausencia de oxígeno.

Antagonismo

Interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad o crecimiento de uno de ellos.

Asintomático

Ausencia de signos o síntomas de una enfermedad.

Bacilo

Bacteria en forma de bastón.

Bacteria

Organismo procariota microscópico unicelular perteneciente al reino Monera.

Branquiostegos

Sección ventrolateral expandida del caparazón que cubre las branquias.

Cepa

En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético. Conjunto de descendientes de un aislamiento en cultivo puro y que normalmente se origina a partir de sucesivos cultivos derivados a partir de una colonia inicial.

Coco

Bacteria con forma esférica.

Colonia

Grupo o conjunto de microorganismos que crecen en una superficie sólida como la superficie de agar de un medio de cultivo. A menudo el conjunto es directamente visible, pero también puede ser visto sólo microscópicamente.

Desnaturalización

Separación de las cadenas complementarias del ADN generalmente se obtiene por calentamiento o en condiciones alcalinas. Esto también se llama "fusión" de ADN. Con respecto a las proteínas, se refiere a la alteración de la estructura terciaria y secundaria, a menudo realizados por el calor, detergentes y agentes de reducción de sulfhídrico.

Enfermedad

Modificación del estado de completo bienestar físico o social de un organismo, que implica una serie de síntomas y una etiología bien definida, y que lleva a un deterioro de su función normal. Puede ser hereditaria o causada por parásitos, deficiencias dietéticas o factores físicos y químicos del ambiente.

Fase lag

Período que sigue de la introducción de microorganismos a un medio de cultivo nuevo donde no existe un incremento en el número de células o masa.

Fase log o exponencial

Fase de la curva de crecimiento durante la cual la población microbiana crece a un ritmo constante y máximo, dividiéndose y duplicándose a intervalos regulares.

Fermentación

Producción de energía química en forma de ATP mediante la conversión de carbohidratos en alcohol y dióxido de carbono o ácidos orgánicos bajo condiciones anaerobias.

Gen

Unidad física y funcional del material hereditario que determina un carácter del individuo y que se transmite de generación en generación. Su base material la constituye una porción de cromosoma (locus) que codifica la información mediante secuencias de ADN.

Hemocito

Células sanguíneas presentes en la hemolinfa.

Hemolinfa

Fluido circulatorio de los crustáceos y otros invertebrados, análogo a la sangre de los vertebrados. Está constituida por agua, sales (mayoritariamente Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+}), y compuestos orgánicos. La principal molécula transportista de

oxígeno en la hemolinfa es la hemocianina. Posee células libres, los hemocitos, que desempeñan un importante papel en la defensa inmunitaria en los artrópodos.

Hemólisis

Disrupción de las células rojas de la sangre. Existen 2 tipos de hemólisis: alfa-hemólisis y beta-hemólisis. En la hemólisis alfa se forma un halo verdoso alrededor de la colonia bacteriana debido a la hemólisis incompleta de los eritrocitos. En la beta-hemólisis se forma una zona transparente alrededor de la colonia debido a la hemólisis completa.

Hidrofobicidad

Asociación de grupos no polares o moléculas en un medio acuoso que surge de la tendencia del agua a excluir las moléculas no polares.

Homocedasticidad

Supuesto en el que las variables dependientes tienen los mismos niveles de dispersión desde el punto de vista de la variable independiente.

Hospedador u hospedero

Es cualquier persona o animal que en circunstancias naturales permite la subsistencia o el alojamiento de un agente infeccioso.

Infección

Invasión y multiplicación de un organismo infeccioso dentro de los tejidos del hospedero. Puede ser clínicamente benigno (ver subclínico o “portador”) o resultar en el daño celular o del tejido. La infección puede permanecer localizada y en forma temporal si los mecanismos de defensa son efectivos, o pueden esparcirse infecciones clínicas (enfermedades) agudas, subagudas o crónicas.

Inmunoestimulación

Aumento de la respuesta inmune.

Inóculo

Cultivo de organismos (bacterias, algas, rotíferos) utilizados como punto de partida de otro cultivo.

Kilobase (Kb)

Unidad de 1000 nucleótidos ya sea de RNA o DNA.

Lisozima

Enzima que degrada peptidoglicanos mediante la hidrólisis de los enlaces $\beta(1-4)$ que unen al ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina.

Nucleótido

Compuesto orgánico formado por una base nitrogenada, una pentosa y ácido fosfórico, que constituye la unidad estructural de los ácidos nucleicos. Si la pentosa es una unidad de ribosa o de desoxirribosa, el nucleótido resultante se denomina ribonucleótido o desoxirribonucleótido, respectivamente.

Patógeno

Organismo productor o causante de enfermedad.

PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del ADN, aunque sean minúsculas. Es un método de amplificación exponencial del ADN por la intervención de una enzima termoestable, la Taq polimerasa.

PCR anidado

Método de amplificación de ADN el cual toma una parte del producto de PCR simple y lo somete a un nuevo programa de PCR usando un juego diferente de oligonucleótidos que son internos al fragmento amplificado en la primera reacción (PCR simple).

Portador

Se refiere a un hospedero, alternativo o pasivo, que hospeda organismos patológicos sin sufrir daños, pero que actúa como fuente de contaminación para otros individuos.

Probiótico

Microorganismo vivo que puede proporcionar beneficios para la salud o incluso estimular su crecimiento más allá de su valor nutritivo cuando se ingiere.

Secuencia de ADN

Orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el ADN y que cifra toda la información genética. Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.

Sistema inmune

Sistema defensivo en un hospedero que consiste en respuestas inmunes no específicas y específicas. Se compone de células, tejidos y órganos que reconocen sustancias y microorganismos extraños y actúa para neutralizarlos o destruirlos.

Telson

Último segmento abdominal de los crustáceos, que suele ser en forma de remo.

Tinción de Gram

Tinción diferencial que divide las bacterias en Gram-positivas y Gram-negativas, basándose en su habilidad para retener el colorante cristal violeta cuando es decolorada con solventes orgánicos como el etanol en base a la composición de su pared celular.

Unidades formadoras de colonia (UFC)

Número de organismos que pueden formar colonias cuando son cultivados. Es un indicador del número viable de microorganismos en una muestra.

Vacuna

Antígeno procedente de uno o varios organismos patógenos que se administra para inducir la inmunidad activa protegiendo contra la infección de dichos organismos. Es una aplicación práctica de la inmunidad adquirida.

Virus

Entidad acelular infecciosa que, aunque puede sobrevivir extracelularmente, es un parásito absoluto porque solamente es capaz de replicarse en el seno de células vivas específicas, pero sin generar energía ni ninguna actividad metabólica. Los componentes permanentes de los virus son ácido nucleico (ADN o ARN, de una o de dos cadenas) envuelto por una cubierta proteica llamada cápside.

RESUMEN

El efecto de dos mezclas probióticas de cuatro bacterias ácido lácticas (BAL) presuntivas fue evaluada en cuanto a supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHHNV en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Las bacterias se aislaron de camarón café silvestre (*Farfantepenaeus californiensis*), fueron caracterizadas (actividad hemolítica, tinción de Gram, hidrofobicidad, actividad enzimática extracelular, antagonismo contra vibrios e identificación molecular) y se seleccionaron aquellas con potencial probiótico. Cinco de los aislados reportados pertenecen a *Pediococcus pentosaceus* y tres a *Staphylococcus haemolyticus*.

Se realizaron dos experimentos de 10 y 20 días respectivamente, con camarones infectados naturalmente con WSSV e IHHNV. Cada uno de los tratamientos en ambos experimentos se realizó por triplicado. En el experimento I se evaluaron distintas concentraciones (1×10^6 y 2×10^6 UFC g^{-1} de alimento) de BAL empleadas como dos mezclas probióticas en el alimento. En el experimento II se evaluó el efecto de la frecuencia (diario, cada tres y seis días) de aplicación del alimento adicionado con BAL a una concentración de 1×10^6 UFC g^{-1} . Al final de cada experimento, se determinó la supervivencia, prevalencia de camarones infectados con WSSV e IHHNV mediante la técnica de PCR sencillo y anidado y se realizó el conteo total de hemocitos (CTH) en cámara de Neubauer. Los resultados de supervivencia y CTH se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza, mientras que los resultados de prevalencia de los virus se analizaron con la prueba de Cochran.

En el experimento I no se encontraron diferencias significativas en supervivencia ni CTH ($p > 0.05$). Sin embargo, la prevalencia de WSSV fue más baja en los organismos alimentados con BAL. El grupo control registró una prevalencia de WSSV de 91.6% mientras que los tratamientos tuvieron un 16.6% (Tratamiento III y IV) y 8.3% (Tratamiento II y V) de prevalencia.

En el segundo experimento no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia ni en el CTH ($p > 0.05$). La prevalencia de ambos virus disminuyó en todos los tratamientos incluyendo el control. La prevalencia inicial fue de 26.6% y 100% para IHHNV y WSSV, respectivamente, mientras que la prevalencia final para cada tratamiento fue de 8.3% para IHHNV y 16.6% para WSSV en el tratamiento control;

8.3% para ambos virus en el tratamiento II; 16.6% para IHHNV y 25% para WSSV en el tratamiento III y 0% para IHHNV y 25% para WSSV en el tratamiento IV.

Las BAL evaluadas en este trabajo disminuyeron la prevalencia de WSSV en camarones infectados, pero no la de IHHNV.

ABSTRACT

The effect of two probiotic mixtures with four presumptive lactic-acid bacteria (LAB) each, on the immune system, survival and prevalence of WSSV and IHNV in *Litopenaeus vannamei* was evaluated. The LAB used in this work were isolated from the gut of wild brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*). Human blood hemolysis, shrimp hemolymph hemolysis, kinetics of bacterial growth, colony forming unit count, hydrophobicity test, extracellular enzymatic activity, antagonism against *Vibrio*, Gram staining and molecular identification were determined in bacterial isolates. The LAB that showed potential to be used as probiotics were selected to conduct this work. Five isolates were identified as *Pediococcus pentosaceus* and three as *Staphylococcus haemolyticus*.

Two experiments of 10 and 20 days respectively, were conducted with shrimp naturally infected with WSSV and IHNV, as determined by PCR assays. Experiments were conducted with treatments in triplicate. In experiment I, different concentrations (1×10^6 y 2×10^6 UFC g^{-1} of feed) of two LAB probiotic mixtures in feed were evaluated. In Experiment II, the effect of application frequency (daily, every three and six days) of the diet with BAL was evaluated. At the end of the experiments, survival, total hemocyte count, and viral prevalence were determined. Animals were monitored for the occurrence of IHNV and WSSV by single-step and nested PCR. THC results were analyzed by ANOVA. No significant differences in survival and THC were detected in both experiments. However, a decrease in WSSV prevalence was observed in shrimp fed with commercial feed added with LAB in experiment I. The control group registered 91.6% of WSSV prevalence while treatments registered 16.6% (Treatment III and IV) and 8.3% (Treatment II and V) of WSSV prevalence.

In experiment II prevalence of both viruses decreased in all treatments including control group. Shrimps registered an initial prevalence of 26.6% and 100% for IHNV and WSSV, respectively. At the end of the experiment the control group registered a prevalence of 8.3% for IHNV and 16.6% for WSSV; 8.3% for both virus in treatment II; 16.6% for IHNV and 25% for WSSV in treatment III and 0% for IHNV and 25% for WSSV in treatment IV.

The LAB evaluated in this work decreased the prevalence of WSSV in infected shrimp, but not that of IHNV.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es uno de los sectores de más rápido crecimiento en la producción de alimentos, registrando un crecimiento anual aproximado de 10% comparado con un 3% de la producción de carne y 1.6% de las pesquerías (Verschuere *et al.*, 2000). Según datos publicados por la FAO en 2006, México ocupa el décimo séptimo lugar en producción mundial por pesca y acuicultura siendo su principal cultivo acuícola el camarón debido al volumen y valor de producción obtenido. En el año 2008, México obtuvo una producción de 196,289 t de peso vivo de camarón a nivel nacional, de las cuales 130,021 t fueron aportadas por acuicultura, representando 66.33%. El estado de Sinaloa contribuyó con 37,413 t (28.77% del total), siendo el segundo productor a nivel nacional (CONAPESCA, 2008).

A pesar del aumento constante en la producción, la actividad es afectada por enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos y virus (Moriarty, 1999). Dentro de éstas, los virus son tal vez los más importantes ya que muchos de ellos han causado mortalidades masivas. El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), el virus de la necrosis hipodermal y hematopoyética (IHHNV, por sus siglas en inglés) y el virus del síndrome del Taura (TSV, por sus siglas en inglés), son los patógenos más importantes en el cultivo de camarón (FAO, 2002).

El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), pertenece a la familia Nimaviridae y al género *Whispovirus*. Es un virus de doble cadena de ADN (bicatenario), con un genoma circular que contiene 292.967 kb, encerrado en una cápside, que a su vez está rodeada por una envoltura trilaminar de naturaleza lipoprotéica. Es baciliforme, su tamaño varía de 210-380 nm de longitud y 70-167 nm de ancho. La nucleocápside mide 120-205 nm de longitud y 95-165 nm de diámetro. Posee un apéndice en forma de cola en uno de sus extremos. Los camarones que desarrollan esta enfermedad presentan manchas blancas (0.5-3.0 mm de diámetro) en el exoesqueleto (en la superficie interna del cefalotórax), coloración rojiza en el cuerpo y apéndices, inflamación de los branquiestegos por acumulación de fluidos, elongación y amarillamiento del hepatopáncreas, coagulación retardada de la hemolinfa y disminución del consumo de alimento (Vlak *et al.*, 2002; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

El virus de la necrosis infecciosa hipodermal y hematopoyética (IHHNV), pertenece a la familia Parvoviridae, y probablemente al género *Brevidensovirus*. Es un virus de ADN de una sola cadena o unicatenario, de aproximadamente 4.1 kb de longitud. El virión tiene forma icosaédrica, no presenta envoltura y tiene un tamaño de 22 nm de diámetro. Los signos clínicos de la enfermedad por este virus varían según la especie. En el camarón blanco se presenta el síndrome de la deformidad del rostro y enanismo (RDS), el cual se caracteriza por una baja producción, aumento en la variabilidad del tamaño de los camarones (con mayor número de camarones pequeños), deformaciones cuticulares, como desviación o deformidades del rostro, antenas arrugadas y aspereza del caparazón (Tang y Lightner, 2001).

El camarón, al igual que los demás crustáceos posee dos líneas de defensa contra éstos patógenos. La primera de ellas es la cutícula que constituye una barrera física que impide la entrada del patógeno al organismo. La segunda línea de defensa consiste en mecanismos celulares y humorales. Las células de la hemolinfa o hemocitos, se dividen en tres categorías de acuerdo a su morfología. Los hemocitos hialinos no presentan gránulos citoplasmáticos y participan en la coagulación y fagocitosis de partículas extrañas o células envejecidas del propio organismo. Los hemocitos semigranulares y granulares poseen gránulos citoplasmáticos (mayor número en granulares) y participan en los procesos de encapsulación y nodulación, donde un cuerpo extraño, que no puede ser fagocitado, es rodeado por hemocitos que lo contienen y evitan su expansión. Además, los gránulos contienen péptidos antimicrobianos, enzimas lisosomales y el sistema profenoloxidasa. Los mecanismos humorales parecen tener mayor actividad contra patógenos bacterianos y fúngicos, que contra los virales. El sistema profenoloxidasa (proPO) actúa oxidando fenoles para producir quinonas, las cuales darán origen a la melanina, la cual inhibe la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas. Los péptidos antimicrobianos o peneidinas son proteínas con actividad antibacteriana (principalmente contra bacterias Gram positivas) y antifúngica (Rendón y Balcázar, 2003; Maldonado *et al.*, 2004; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Wang y Zhang, 2008).

El sistema inmune juega un papel importante en la defensa contra virus; sin embargo, no es el único factor que determina la presencia o ausencia de una patología. La llamada triada epidemiológica lo explica claramente. La salud de un organismo, está influenciada por las interacciones entre el medio ambiente, los

patógenos y el hospedero. En los sistemas de producción de camarón, muchos patógenos potenciales, tales como las bacterias, hongos y virus, co-existen con el camarón sin causar un impacto negativo en la producción debido a un equilibrio en los factores de la triada. Sin embargo, cualquier alteración en alguno de ellos, como estrés en el organismo debido a las altas densidades de siembra, deterioro del ambiente ocasionado por las dietas ricas en proteínas o mutaciones de las cepas patógenas que adquieren resistencia por el uso de antibióticos pueden desencadenar brotes infecciosos que provocan pérdidas significativas en la industria (Flegel y Pasharawipas, 1998; Moriarty, 1999; Capy *et al.*, 2000; Spann *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001).

Las técnicas empleadas como el uso de desinfectantes y antibióticos han tenido un éxito limitado en la prevención o cura de enfermedades, ya que estos compuestos eliminan los signos de la enfermedad y rara vez al agente causal de la misma. El énfasis actual del manejo de enfermedades en organismos acuáticos es la prevención, opción que es más rentable que buscar la cura y puede llevar a la disminución en el uso de químicos (Verschuere *et al.*, 2000). Dentro de las estrategias empleadas para la prevención de brotes infecciosos podemos mencionar la mejora de técnicas en larvicultura, selección genética, aplicación de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y β -glucanos, y por último, el control biológico (Sotomayor y Balcázar, 2003).

El control biológico en acuicultura se inició a finales de 1980 y desde entonces la investigación del tema ha aumentado. El control biológico con bacterias consiste en el uso de bacterias capaces de estimular el crecimiento y mejorar la salud de los organismos. Éstas reciben el nombre de probióticos (“para la vida”) (Farzanfar, 2006). En acuicultura, el término probiótico se define como un suplemento microbiano formado por un cultivo simple o mixto de microorganismos que modifican las comunidades microbianas presentes en los sistemas de producción (Balcázar, 2002).

Los probióticos poseen múltiples mecanismos de acción para inhibir patógenos tales como la exclusión competitiva, activación del sistema de defensa, efectos antivirales, incremento en la digestión por el suministro de enzimas, mejoramiento de la nutrición por la contribución de nutrientes esenciales, producción de sustancias

que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas (antagonismo) y mejoramiento de la calidad del agua (Balcázar, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006).

La mayoría de las bacterias propuestas como agentes de control biológico en acuicultura pertenecen al grupo de las ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*) y a los géneros *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* *Aeromonas* y *Flavobacterium* (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006).

Las bacterias son seleccionadas con base a una serie de características funcionales que les confieren la actividad como probiótico, tales como la baja o nula virulencia, actividad antagónica contra patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas y la capacidad de adherencia para colonizar el tracto digestivo y competir por los sitios de adhesión con los organismos patógenos (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2005).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) cumplen con la mayoría de las características mencionadas anteriormente. Son bacterias Gram positivas, inmóviles, no esporuladas. Presentan dos formas morfológicas, cocos y bacilos. Poseen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B (Serna-Cock y Rodríguez de Stouvenel, 2005), lo que las hace diferentes a otros grupos bacteriológicos. Algunas BAL son productoras de bacteriocinas, componentes antimicrobianos, peróxido de hidrógeno, peróxido de carbono, diacetil e inhibidores de adhesión, que proveen un obstáculo para los microorganismos patógenos, incluso el mismo ácido láctico y otros productos metabólicos de las BAL ayudan en el proceso (Ramírez-Toro, 2005; Farzanfar, 2006). Además, estas bacterias son capaces de adherirse con alta eficiencia, mediante fuerzas pasivas, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas, ácidos lipoteicoicos y lectinas. La naturaleza hidrofóbica de su superficie, les facilita la adhesión al epitelio del hospedero, lo que les confiere una gran ventaja en la competencia para colonizar el tracto intestinal (Farzanfar, 2006; Mota *et al.*, 2006). El nombre de este grupo de bacterias se debe a su capacidad de producir compuestos ácidos a partir de la fermentación de carbohidratos y sobrevivir en medios con bajo pH (3.5). Acorde a los productos finales de la fermentación, las BAL se dividen en homofermentativas y heterofermentativas. En el metabolismo homofermentativo se produce predominantemente ácido láctico y las bacterias utilizan los carbohidratos siguiendo la vía de la glucólisis (vía de Embden-Meyerhof-Parnas). En esta vía, bajo

condiciones normales donde los azúcares no están limitados, una molécula de glucosa es fermentada a dos moléculas de ácido láctico resultando en una ganancia neta de dos moléculas de ATP (Aarnikunnas, 2006). Las especies que tienen este tipo de metabolismo son *Lactobacillus delbruekii*, *L. rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *Lactococcus lactis*, entre otros. Este tipo de fermentación puede dar lugar a una mezcla de ácidos (ácido láctico, formiato) cuando la concentración de glucosa es limitada, cuando se incrementa el pH, temperatura o bien cuando se fermentan azúcares distintos a la glucosa. La fermentación heteroláctica produce ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico a partir de la glucosa mediante la vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK). En esta vía la ganancia neta de energía es una molécula de ATP. Las bacterias que tienen este tipo de metabolismo son *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. bifidus* y todas las especies del género *Leuconostoc* (Serna-Cock y Rodríguez de Stouvenel, 2005). La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano, ya que la fermentación reduce la cantidad de carbohidratos lo que resulta en una cadena de moléculas orgánicas de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana como el ácido láctico, acético y propiónico (Zamora-Rodríguez, 2003; Aarnikunnas, 2006).

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto de dos mezclas de bacterias ácido lácticas (adicionadas en el alimento), en la respuesta inmune de *L. vannamei* infectado naturalmente con WSSV e IHHNV en el laboratorio.

II. ANTECEDENTES

En camarones peneidos, se han realizado importantes estudios sobre el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) como probióticos en los cultivos larvarios, de juveniles y adultos. Vieira *et al.* (2007) probaron dos cepas de BAL en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* y encontraron que ambas poseían actividad antagónica *in vitro* contra *Vibrio* sp. Sin embargo, sólo una de éstas mantenía dicha actividad *in vivo*, aumentando la sobrevivencia de los organismos y disminuyendo la densidad del vibrio patógeno. Lo anterior dio como resultado una mayor actividad de las larvas con respecto al control.

Ajitha *et al.* (2004) demostraron la capacidad antagónica de 4 cepas de BAL (*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* -56, *L. bulgaricus* -57 y *Streptococcus cremoris*) contra *Vibrio alginolyticus* (*in vitro* e *in vivo*) en *Penaeus indicus*. Los camarones tratados con bacterias benéficas registraron mortalidades bajas de entre 20 y 40%, seis días después de la infección, mientras que el grupo control presentó una mortalidad de 80%, apenas 48 h después de la infección.

En el año 2005, Ramírez-Toro realizó uno de los estudios más completos sobre la actividad probiótica de BAL en larvas y juveniles de *Litopenaeus vannamei*. En su ensayo de crecimiento de larvas, demostró que el alimento adicionado con BAL posee una ligera ventaja con respecto al alimento solo. Realizó también un ensayo de inhibición de 14 patógenos con BAL y diferentes antibióticos, demostrando que las BAL pueden competir fácilmente con el uso de antibióticos en la acuicultura. Observó también que las BAL pueden colonizar el tracto digestivo y hepatopáncreas de los organismos tratados a partir del quinto día de tratamiento. Al igual que los ejemplos anteriores, demostró que la sobrevivencia de larvas alimentadas con BAL, después de un desafío con *Vibrio harveyi*, es más alta (80%) que en el control (40%). Finalmente, realizó un desafío de juveniles positivos a WSSV con *Vibrio alginolyticus* para medir algunos parámetros del sistema inmune y encontró que en los organismos alimentados con BAL no se presentaba signos de vibriosis ni mancha blanca. En contraste, los organismos del control presentaron los signos clínicos de ambas enfermedades (expansión de cromatóforos en branquias, urópodos, telson, anténulas, necrosis localizada y puntos blancos en el cefalotórax). Así mismo, observó que el número de hemocitos después de la infección era mayor en las larvas

alimentadas con BAL. También observó que el tiempo de coagulación de la hemolinfa en los organismos del control fue de 274 s, casi el triple que en los organismos del tratamiento con BAL (88 s). Midió también las UFC mL⁻¹ de *Vibrio alginolyticus* en la hemolinfa, registrando un mayor número en el control comparado con el tratamiento con BAL.

Rodríguez *et al.* (2007) probaron combinaciones de una cepa probiótica de *Vibrio alginolyticus* y β -1,3/1,6-glucanos en *Penaeus vannamei* retado con el virus de la mancha blanca. Encontraron que la aplicación del probiótico en el agua durante la larvicultura (antes del estadio zoea II), y la posterior adición de los β -1,3/1,6-glucanos, en el alimento, desde el estadio zoea II en adelante, aumentaba la sobrevivencia de los organismos. Así mismo, observaron que después de la infección con el virus, los organismos sobrevivientes mostraban una resistencia al mismo, una fuerte actividad antibacteriana, un aumento en el número de hemocitos totales y la carencia de lesiones típicas de la enfermedad de la mancha blanca. También observaron que si se adicionan β -1,3/1,6-glucanos en la dieta, por lo menos 15 días antes de la infección con el virus, los organismos aumentan el nivel de proteína en plasma, la generación de O₂ y el número total de hemocitos.

Peraza-Gómez (2009) evaluó el efecto de plantas medicinales y una mezcla probiótica (BAL y una levadura), aislada de la tilapia *Oreochromis niloticus*, contra el virus de la mancha blanca en *Litopenaeus vannamei*. Observó que la adición de la mezcla probiótica en el alimento aumentaba la supervivencia de los organismos ante el virus y disminuía la prevalencia de organismos infectados con WSSV. En los camarones sobrevivientes tratados con bacterias aumentó el número total de hemocitos y la actividad de dos enzimas lisosomales.

III. JUSTIFICACIÓN

Los problemas virales en el cultivo de camarón en Sinaloa iniciaron en 1995 con la aparición del virus del Taura (TSV) en *Litopenaeus vannamei*, el cual causó pérdidas del 95% de la producción. Como medida de prevención, se optó por cambiar la especie de cultivo por *Litopenaeus stylirostris*, la cual es resistente a TSV, pero susceptible a otras enfermedades virales como IHHNV que se presentaron ese mismo año, y en años posteriores (Audelo y Montiel, 2005).

Los virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) se detectaron en el año 1990 (Morales-Covarrubias, 1999) y 2000 (Audelo y Montiel, 2005), respectivamente, en *Litopenaeus stylirostris*. Afortunadamente, el IHHNV pudo controlarse durante varios años, mientras que WSSV siguió causando pérdidas significativas en la camaronicultura. Con estos problemas virales vigentes, la SAGARPA y CONAPESCA implementaron una red de diagnóstico encargada de monitorear las tres enfermedades virales más importantes del camarón en Sinaloa: TSV, WSSV e IHHNV. Los resultados obtenidos en los monitoreos del periodo 2001-2003, muestran como los patógenos han extendido su cobertura. En 2001, WSSV se detectó en Angostura, Mazatlán y Navolato; para 2002, también se le localizó en Ahome, Culiacán, Guasave, La Cruz de Elota y Navolato. En el 2003 invadió el municipio de El Rosario. Con TSV se observa un fenómeno similar, en 2001 se localizó en Guasave, Mazatlán y Navolato; en 2002 sólo se observó en muestras de Guasave y Navolato y en 2003 se registraron epizootias de este patógeno en Ahome, Culiacán, Escuinapa, Guamúchil, La Cruz de Elota, Mazatlán, Navolato y El Rosario. De igual manera, el análisis reveló el retorno de IHHNV. En 2002 se detectó un brote en granjas de Navolato y en 2003 los brotes también se detectaron en granjas de Ahome, Angostura, Culiacán, Guasave y Mazatlán (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2005).

Está claro que los virus se han extendido y prevalecen en el estado, por lo tanto, la actividad camaronícola está destinada a lidiar con ellos en los tiempos venideros puesto que hasta el momento no es posible erradicarlos. Al hablar de “lidiar” con estos patógenos, no nos referimos a seguir experimentando pérdidas significativas en producción, sino a desarrollar técnicas amigables con el ambiente

que le permitan al camarón convivir con los patógenos sin ser afectados, o bien, técnicas que minimicen las pérdidas una vez detectado el virus en un cultivo.

Una buena opción, son los probióticos, que ya han mostrado buenos resultados contra estos virus, especialmente contra WSSV. Sin embargo, sigue siendo prioritario desarrollar mezclas probióticas con microorganismos aislados preferentemente de camarones, o en su defecto, de otros organismos acuáticos de la región, que estén adaptados a las condiciones climáticas del área.

IV. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Determinar el efecto de bacterias ácido lácticas (BAL), adicionadas al alimento, sobre el sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*, con el propósito de reducir las infecciones causadas por los virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV).

- **Objetivos específicos**

1. Aislar y caracterizar BAL del intestino de camarón.
2. Determinar la concentración de BAL efectiva para inmunoestimular camarones portadores de WSSV e IHHNV.
3. Determinar la frecuencia de aplicación de BAL más adecuada para inmunoestimular camarones portadores de WSSV e IHHNV.

V. HIPÓTESIS

Las bacterias ácido lácticas adicionadas al alimento mejoran la capacidad inmune de los camarones cultivados, lo cual contribuye a disminuir la prevalencia de organismos infectados con WSSV e IHHNV.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 **Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)**

Se realizó la extracción del intestino completo de 10 camarones, 5 de ellos de la especie *Litopenaeus vannamei*, provenientes de granja, y los 5 restantes de la especie *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), colectados en la Bahía de Navachiste. Cada una de las 5 muestras se colocaron en tubos Eppendorf (1.5 mL) con 200 μ L de solución salina estéril y se maceraron con un homogenizador automático Pellet Pestle motor (Kontes, NY, USA). Se sembraron por esparcimiento 100 μ L del homogenizado de cada muestra en placas de Petri con medio Rogosa LS (Difco, Sparks, MD, USA) con 2% de NaCl y se incubaron a 30 °C por 120 h. El crecimiento se observó cada 24 h. Posteriormente, cada colonia resultante se resembró por esparcimiento en placas Petri con medio MRS (Man, Rogosa y Sharp; BD Difco, Sparks, MD, USA), 2% de NaCl y se incubaron a 30 °C por 24 h. Finalmente, se cosecharon las bacterias y se colocaron en tubos Eppendorf con caldo MRS con 15% (v/v) de glicerol y 3% de NaCl. Los aislados se mantuvieron a -80 °C (Stock) para su posterior caracterización.

6.2 **Caracterización de las cepas bacterianas**

6.2.1 Prueba de hemólisis en sangre humana

Se tomaron 10 μ L de cada aislado bacteriano y se sembraron en tubos Falcon con 5 mL de caldo MRS con 2% de NaCl, incubándose a 30 °C por 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada uno de los cultivos previamente homogenizados y se colocaron en tubos Eppendorf para centrifugar a 13 000 x g, por 10 min. El pH del sobrenadante se ajustó a 6.5 con NaOH 1 M para evitar falsos halos de lisis ocasionados por la acidez del medio (Balcazar *et. al.*, 2008). Finalmente, se sembraron 50 μ L del sobrenadante en pequeños pozos dentro de placas Petri con agar sangre (BA, BD Bioxon, Estado de México, México) y placas con agarosa (20 mL de medio base agar o agarosa + 1 mL de sangre por placa; BD Bioxon). Las placas se incubaron a 37 °C por 48 h, tomando lecturas cada 24 h. Los aislados inoculados en el medio se compararon con un control negativo, el cual consistió en caldo MRS con 2% de NaCl. Se tomaron sólo aquellos aislados

bacterianos que presentaron hemólisis gamma (γ) en ambos medios y se realizó una segunda prueba para corroborar resultados.

6.2.2 Cinética de crecimiento bacteriano de los aislados de BAL

Con el fin de conocer las fases de crecimiento de los aislados a utilizar, se realizó una cinética de crecimiento, inoculando 20 μ L del stock de cada aislado en 50 mL de medio MRS con 2% de NaCl, incubando a 30 °C. Se determinó la absorbancia de los cultivos con respecto a un control (medio MRS) a 580 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 2, Thermo Scientific Waltham, MA, USA). Las lecturas se iniciaron a las 6 h después de la inoculación y luego cada 12, 24, 48, 72 y 96 h.

6.2.3 Conteo de UFC mL⁻¹ de BAL

Para el conteo de las BAL (UFC mL⁻¹) se utilizó el método de diluciones seriadas decimales. Primeramente se sembraron cada uno de los aislados en matraces con 50 mL de MRS al 2% con NaCl y se incubaron a 31 °C durante 24 h. De cada cultivo se tomó 1 mL, se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13 000 x g, por 20 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril con 2% de NaCl y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm. La absorbancia debió ajustarse a 1, ya sea adicionando una mayor cantidad de células o diluyendo en solución salina estéril. Una vez obtenida la absorbancia deseada, se tomó 1 mL de la muestra y se inoculó en un tubo Falcon con 9 mL de solución salina estéril al 2% de NaCl que representó la dilución 10⁻¹. El procedimiento se repitió hasta obtener la dilución 10⁻⁷. De la dilución 10⁻⁵ a la 10⁻⁶, se tomaron 100 μ L, se sembraron por esparcimiento en placas Petri con MRS con NaCl al 2% y se incubaron a 31 °C por 24 h. La siembra se realizó por duplicado.

6.2.4 Tinción con rojo congo (Prueba de hidrofobicidad)

Con el fin de determinar la hidrofobicidad de las bacterias, se realizó el cultivo de las mismas en agar MRS con 2% de NaCl y 0.03% de Rojo Congo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Cada aislado se sembró por el método de estría y se incubó a 30 °C por 24 h. Se tomaron como resultados positivos aquellos aislados con

coloración roja y negativos aquellos aislados que formaron colonias blancas o translúcidas (Sharma *et al.*, 2006).

El medio MRS se esterilizó (121 °C por 15 min) y se dejó enfriar hasta una temperatura de 50-40 °C. Posteriormente, bajo condiciones estériles, se agregó el colorante rojo rongo, se homogenizó y se vació en placas Petri.

6.2.5 Actividad enzimática extracelular

Se determinó cualitativamente la producción de enzimas extracelulares (proteasas y lipasas) por los aislados de BAL. Para ello se cultivaron los aislados en MRS caldo con 2% de NaCl y se incubaron a 30 °C por 40 h. Se manejaron los cultivos crudos y otros a los cuales se les ajustó el pH a valores de 6.5 con NaOH 1 M para comparar la actividad de las enzimas en los distintos valores de pH, se observó si la actividad enzimática se mantenía para descartar la formación de falsos halos ocasionados por la acidez del medio. De cada cultivo se tomó 1 mL y se centrifugó a 13 000 x g, durante 20 min. Se tomaron 50 µL de sobrenadante y se inocularon en pozos en placas de Petri con el medio correspondiente. La adición del sustrato enzimático (leche descremada, gelatina y tween 80) al medio basal se hizo posterior a la esterilización (121 °C por 15 min) y enfriamiento (40 °C) del mismo.

6.2.5.1 Prueba de degradación de la caseína

El sobrenadante microbiano se inoculó en pozos perforados en una placa de Petri con medio basal (agar 1.5% y extracto de levadura 0.5%) adicionado con 2% de leche descremada (Fluka, Sigma Aldrich, Switzerland). Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h. Se consideró como resultado positivo, aquellos aislados que formaron un halo transparente alrededor del pozo.

6.2.5.2 Prueba de hidrólisis de la gelatina

El sobrenadante microbiano se inoculó en pozos perforados en una placa de Petri con medio basal (agar 1.5% y extracto de levadura 0.5%) adicionado con 1% de gelatina. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h. Se consideró como resultado positivo, aquellos aislados que formaron un halo transparente alrededor del pozo.

6.2.5.3 Prueba de hidrólisis de Tween 80 (Actividad lipolítica)

El sobrenadante microbiano se inoculó en pozos perforados en una placa de Petri con medio basal (agar 1.5% y extracto de levadura 0.5%) adicionado con 1% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h. Se consideró como resultado positivo, aquellos aislados que formaron un halo opaco alrededor del pozo.

6.2.6 Prueba de antagonismo contra *Vibrio* sp.

Se determinó el efecto antagónico de cada aislado de BAL contra dos cepas patógenas de *Vibrio* sp. aisladas de intestino y hepatopáncreas de camarón blanco (Flores-Miranda, com. pers.). Las BAL se inocularon en MRS caldo con 2% de NaCl y se incubaron a 30 °C por 24 h. Los vibrios se inocularon en TSA (TSA, BD Bioxon, Estado de México, México) caldo con 3% de NaCl y se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL del cultivo de *Vibrio* y se centrifugó a 13 000 x g, por 20 min. La pastilla se resuspendió en solución salina estéril al 3% y se llevó a una absorbancia de 1 (580 nm). Con base en el conteo de UFC mL⁻¹, se hicieron los cálculos correspondientes para sembrar de forma masiva 1 x 10⁶ UFC mL⁻¹ en una placa de TSA con 3% de NaCl. Después de sembrado el *Vibrio*, se hicieron pequeños pozos en la placa con ayuda de un sacabocados. Del cultivo de BAL, se tomó 1 mL y se centrifugó a 13 000 x g, por 20 min. Se tomaron 50 µL del sobrenadante y se colocaron en los pozos hechos en la placa de TSA. Al cultivo restante se le ajustó el pH a valores de 6.5 y se repitió la última acción descrita. En cada una de las placas se colocaron dos controles negativos (MRS con 2% de NaCl a pH 7 y MRS con 2% de NaCl a pH 4) con los cuales se compararon los resultados obtenidos. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h, y posteriormente se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

6.2.7 Prueba de hemólisis con hemolinfa de camarón

Los aislados se sembraron en MRS caldo con 2% de NaCl y se incubaron a 30 °C por 36 h. El pH de los cultivos se ajustó a 6.5 con NaOH 1 M. Se tomó 1 mL de cada aislado y se centrifugaron a 13 000 x g por 20 min. La actividad en hemolinfa se realizó en los aislados que presentaron hemólisis γ en sangre humana. La técnica utilizada consistió en una adaptación de la descrita por Chin-I *et al.* (2000). Se extrajo

1 mL de hemolinfa de camarones adultos e inmediatamente se transfirió a un tubo Eppendorf con 266 μ L de anticoagulante (buffer de SIC-EDTA; NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM + EDTA- Na₂ 10 mM, pH 6.9) y se agregó el colorante rosa de Bengala (3%) para teñir las células (hemocitos). El contenido del tubo se mezcló en un matraz con 15 mL de medio basal agar estéril (10 g de bacto peptona, 5 g de cloruro de sodio y 15 g de bacto agar disuelto en 1000 ml de agua, con un pH ajustado de 6.8). El medio se esterilizó en autoclave y se vació en la placa de Petri. Una vez que solidificó el agar se hicieron perforaciones con ayuda de un sacabocados. Se inocularon 50 μ L del sobrenadante del cultivo bacteriano en los pozos de la placa. Como control negativo se colocaron 50 μ L de MRS caldo con 2% de NaCl. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h. Posteriormente, se midió y analizó el halo de lisis.

6.2.8 Morfología y tinción de Gram

La morfología celular de las BAL se determinó con un microscopio compuesto (Carl Zeiss), utilizando el objetivo 100X, después de teñir una muestra de cada una de ellas con la tinción Gram siguiendo las instrucciones del kit de tinción.

6.2.9 Identificación molecular de BAL

6.2.9.1 Extracción de ADN bacteriano con el kit Bactozol (MRC, Cincinnati, OH., USA)

Se utilizaron 3 mL de cultivo bacteriano para obtener aproximadamente 40 μ g de ADN. La suspensión bacteriana se centrifugó a 6 000 x g por 5 min. El sobrenadante se desechó y el pelet resultante se resuspendió en 100 μ L de solución enzimática bactozol 1X, agitando con el vortex o la pipeta para homogenizar la suspensión. Las células bacterianas se lisaron incubándolas a 55 °C por 1 h. Posteriormente, se agregaron 400 μ L de DNAzol, se dejó incubar la muestra a temperatura ambiente por 10 min y luego por 15 min a 55 °C. La muestra se centrifugó a 10 000 x g, por 7 min, y se recuperaron 400 μ L de sobrenadante. El ADN se precipitó adicionando 500 μ L de etanol al 100% y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Las muestras se mezclaron invirtiendo los tubos (5-8 veces) y se centrifugaron a 3 000 x g, por 5 min, decantando el

sobrenadante. Se adicionó 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 4 000 x g, por 4 min. Se decantó el sobrenadante y se extrajo el líquido remanente con una pipeta automática. Las muestras se secaron por 10 min en un Termoblock a 55 °C. Finalmente el ADN se resuspendió en 30 µL de agua ultrapura y se almacenó a -20 °C.

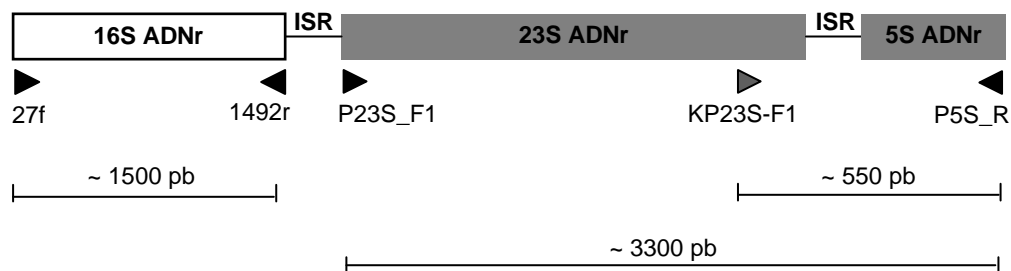


Figura 1. Representación esquemática de la región de ADNr procariótico que muestra el lugar aproximado de anillamiento de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes 16S, 23S y 5S. En la figura no se muestra el oligonucleótido KP23S-F2 ya que su posición es muy cercana al oligonucleótido KP23S-F1 (nueve nucleótidos arriba).

6.2.9.2 Amplificación del gen 16S ADNr

La identificación del género de los aislados se hizo mediante secuenciación del ADN ribosomal 16S. Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos diseñados con base en secuencias conservadas del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (Jensen, 2002). Los oligos que se utilizaron en la reacción de PCR fueron 27f (sentido) 5'-AGAGTTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492r (contrasentido) 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (Fig. 1). El tamaño esperado del fragmento fue de aproximadamente 1500 pb. La mezcla de reacción para la PCR se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL en un volumen total de 25 µL, como sigue: 14.75 µL de H₂O; 2.5 µL de búfer de reacción 10X (Bioline, Randolph, MA, USA); 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM; Bioline); 0.5 µL de dNTPs (10 µM; Bioline); 0.5 µL de cada oligo (10 µM cada uno; Sigma-Genosys) y 0.25 µL de Taq polimerasa (5 UµL⁻¹); Bioline). Se añadieron 5 µL del ADN a una dilución 1:30. La amplificación se realizó en un termociclador Biometra Tpersonal (Whatman, Goettingen, Germany) usando el siguiente programa:

desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min para el anillado del primer par de oligonucleótidos de la PCR, 72 °C, por 45 s para la extensión y 72 °C por 5 min, para la extensión final. Los ciclos fueron repetidos 34 veces. Los fragmentos amplificados se visualizaron (incluido un marcador de peso molecular de 1 kb) en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, en un transiluminador UV.

6.2.9.3 Limpieza del producto de PCR

Se agregaron 3 volúmenes de NaCl 6M por volumen de muestra y se incubó a 55 °C durante 5 min. Posteriormente la muestra se colocó en una columna casera con filtro dentro de un tubo Eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 13 000 x g, por 1 min, y se decantó el líquido remanente en el tubo. La muestra se lavó con 700 µL de búfer de lavado, se centrifugó a 13 000 x g por 1 min, y se decantó el líquido remanente en el tubo. Este paso se repitió 3 veces. La columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 80 µL de agua destilada MilliQ a 55 °C y se incubó durante 20 min a 55 °C. Finalmente, la muestra se centrifugó a 13 000 x g por 1 min, se recuperó el líquido en el tubo y se almacenó a -20 °C para su posterior cuantificación.

6.2.9.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó con el kit Quant-iT™ dsDNA HS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se midió la fluorescencia en un equipo Qubit Q32854 (Invitrogen).

6.2.9.5 Amplificación del gen 23S y 5S ADNr

Para diferenciar entre especies del género determinado en el punto 9.2 se amplificaron los genes 23S y 5S del ADN ribosomal. Los oligos que se utilizaron en la PCR fueron los siguientes: P23S_F1 5'-GTAAAGTTATAAAGGGCGCATG-3' y P5S_R 5'-GCATGGCAACGTCCTAC-3' (Pfannebecker y Fröhlich, 2008). El tamaño esperado del fragmento fue de aproximadamente 3300 pb. La mezcla de reacción para la PCR se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL en un volumen total de 25 µL, como sigue: 18.75 µL de H₂O; 2.5 µL de búfer de reacción 10X

(Bioline); 1 μL de MgCl_2 (50 mM; Bioline); 0.5 μL de dNTPs (10 μM ; Bioline); 0.5 μL de cada oligo (10 μM cada uno; Sigma-Genosys), 0.25 μL de Taq polimerasa (5 $\text{U}\mu\text{L}^{-1}$; Bioline) y 1 μL de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Biometra (Tpersonal) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min para el anillado, 72 °C por 3 min para la extensión y 72 °C por 10 min para la extensión final. Los fragmentos amplificados se visualizaron (incluido un marcador de peso molecular de 1 kb) en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV.

6.2.9.6 Limpieza del producto de PCR

La limpieza del producto de PCR se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2.9.7 Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó con el kit Quant-iT™ dsDNA HS (Invitrogen) y se midió la fluorescencia en un equipo Qubit Q32854 (Invitrogen).

6.2.9.8 Secuenciación

La secuenciación del gen 16S se realizó con los oligonucleótidos de la PCR reportados por Jensen (2002). Los genes 23S y 5S fueron secuenciados en dos ocasiones, la primera de ellas con los oligonucleótidos de la PCR reportados por Pfannebecker y Fröhlich (2008) y para la segunda secuenciación se diseñaron dos oligonucleótidos internos a la secuencia de 3300 pb amplificada con los oligonucleótidos P23S_F1 y P5S_R, con el fin de obtener secuencias más cortas y legibles, pero sobre todo para obtener la región espaciadora intergénica (ISR). Los oligonucleótidos se diseñaron en el software en línea Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000), utilizando una región conservada encontrada en el alineamiento de secuencias del gen 23S del ADN ribosomal de siete secuencias de *Pediococcus* publicadas en la base de datos GenBank, NCBI. Los oligonucleótidos se denominaron KP23S-F1 5' GAACGTCGTGAGACAGTTCCG 3' y KP23S-F2 5' GAGACAGTTCGGTCCCTATCC 3' los cuales se unen al extremo 3' del gen 23S ADNr entre los nucleótidos 2609-2638. Para comprobar la

efectividad de los oligonucleótidos se realizó un PCR semianidado utilizando como oligonucleótido reverso P5S_R. La mezcla de reacción para la PCR se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL en un volumen total de 25 μ L, como sigue: 18.75 μ L de H₂O; 2.5 μ L de búfer de reacción 10X (Bioline); 1 μ L de MgCl₂ (50 mM; Bioline); 0.5 μ L de dNTPs (100 μ M; Bioline); 0.5 μ L de cada oligo (10 mM cada uno; Sigma-Genosys), 0.25 μ L de Taq polimerasa (5 U μ L⁻¹; Bioline) y 1 μ L de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Biometra (Tpersonal) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min para el anillado, 72 °C por 1 min para la extensión y 72 °C por 5 min para la extensión final. Los fragmentos amplificados se visualizaron (incluido un marcador de peso molecular de 1 kb) en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV.

6.2.9.9 Análisis de secuencias e inferencia filogenética

La búsqueda de similitud de secuencias se llevó a cabo en la base de datos del GenBank perteneciente al NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Las secuencias obtenidas de los genes 23S y 5S con el oligonucleótido interno KP23S-F1 fueron importadas al software Clustal-X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) para su alineación. El árbol filogenético fue construido en el programa TreeView 1.6 (Page, 1996), utilizando el método del vecino más cercano (neighbor-joining method). *Thermotoga maritima* se utilizó como organismo externo al grupo de *Pediococcus* para enraizar el árbol. La topología del árbol fue evaluada sobre 1000 réplicas (bootstraps) en el programa Clustal-X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007).

6.3 Experimentos

6.3.1 Adición de las BAL al alimento

La incorporación de la mezcla bacteriana al alimento balanceado (Camaronina®, Purina), se hizo por medio del aditivo, attractante y adherente Dry Oil® (DO) de Innovaciones Acuícolas, S.A. de C.V., siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó DO en el alimento para el control sin bacterias para dar condiciones similares a todos los tratamientos.

Las bacterias se cultivaron inoculando 20 μL del stock bacteriano a 50 mL de MRS caldo con 2% de NaCl y se incubaron a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial. De cada cultivo se tomó 1 mL, se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13 000 x g, durante 20 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril con 2% de NaCl y se leyó la absorbancia (580 nm) en el espectrofotómetro. La absorbancia se ajustó a 1, ya sea adicionando una mayor cantidad de células o diluyendo con solución salina estéril al 2%. A partir del conteo inicial de UFC mL^{-1} , y de la cantidad de UFC g^{-1} a adicionar al alimento, se obtuvo el volumen de la suspensión a utilizar por gramo de alimento y se multiplicó por los gramos necesarios para alimentar por 5 días. Una vez obtenidos los volúmenes para cada aislado, se preparó la mezcla y se adicionó a 10 mL de DO, para finalmente asperjar al alimento.

6.3.1.1 Estudio de viabilidad de las BAL adicionadas al alimento

Se determinó la viabilidad de las bacterias en el alimento durante 5 días. Para ello se pesaron 50 mg de alimento y se molieron en un mortero adicionando 15 mL de solución salina estéril al 2%. De la suspensión se tomaron 50 μL y se sembraron por dispersión en una placa Petri con MRS adicionado con 2% de NaCl y azul de anilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), para diferenciar las BAL de otros microorganismos presentes en el alimento. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h. El cultivo se realizó por duplicado.

El medio MRS se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar hasta una temperatura de 50-40 °C. Posteriormente, bajo condiciones estériles, se agregó el azul de anilina, a razón de 200 mg por cada litro de medio, se homogenizó y se vació en placas de Petri.

6.3.2 Mantenimiento y operación

Ambos experimentos se realizaron en el Patio de Cultivo del Laboratorio de Acuicultura del CIIDIR-IPN (Unidad Sinaloa). Para ello, se utilizaron tinajas ovaladas de plástico con una capacidad de 120 L, las cuales se llenaron con 80 L de agua de mar filtrada (20 μm).

Los organismos se pesaron antes de iniciar la aclimatación para calcular la ración diaria de alimento, la cual consistió en un 5% de la masa corporal. La aclimatación de los organismos duró 5 días en el sistema de cultivo y se alimentaron dos veces al día (09:00 y 16:00) con el alimento Camaronina (Purina). La limpieza del sistema de cultivo se realizó cada dos días, eliminando la materia particulada del fondo por sifoneo y haciendo un recambio de agua del 50%. Los parámetros fisicoquímicos, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH se midieron cada 3 días en cada una de las tinas del cultivo.

6.3.3 *Experimento 1: Distintas concentraciones de BAL en el alimento y su efecto sobre la supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHHNV en L. vannamei.*

6.3.3.1 Diseño experimental

Se utilizaron 150 camarones de 6.83 ± 1.47 g de la granja Agapito Leal ubicada en el municipio de Guasave frente a la Bahía Macapule ($25^{\circ}24'33.56''$ N y $108^{\circ}39'13.94''$ O). Se analizaron 2 pools de 12 organismos del lote, para determinar la presencia de los virus WSSV e IHHNV. El resto de los organismos se repartió al azar, colocando 10 camarones por tina. El experimento tuvo una duración de 10 días y constó de 5 tratamientos, cada uno con tres réplicas:

T I) Control negativo (Camaronina + DO);

T II) Camaronina + DO + Mezcla 1 de BAL (1×10^6 UFC g^{-1});

T III) Camaronina + DO + Mezcla 1 de BAL (2×10^6 UFC g^{-1});

T IV) Camaronina + DO + Mezcla 2 de BAL (1×10^6 UFC g^{-1});

T V) Camaronina + DO + Mezcla 2 de BAL (2×10^6 UFC g^{-1}).

Al final del experimento, se registró la supervivencia, la prevalencia de los virus y se realizó el conteo total de hemocitos.

6.3.3.2 Obtención de hemolinfa y conteo total de hemocitos

Para realizar el conteo total de hemocitos, se tomó el 40% de la población de cada tratamiento que corresponden a 12 organismos (4 de cada réplica). La hemolinfa se extrajo con jeringas para insulina (27G x 13 mm) de la parte ventral del camarón, justo en la zona del segundo par de pleópodos. La jeringa se cargó

con una solución isotónica para camarón y EDTA como anticoagulante (SIC-EDTA, Na₂) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM + EDTA, Na₂ 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm/kg), previamente enfriado a 4 °C (Vargas-Albores *et al.*, 1993) en una proporción 2:1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen extraído de hemolinfa). Inmediatamente después de ser extraída la muestra de hemolinfa, ésta se colocó en tubo Eppendorf de 1.5 mL, previamente etiquetados. De dicha muestra se tomaron 50 µL y se diluyeron en 150 µL de una solución de formol al 4% (1:3 v/v). El conteo de hemocitos se realizó bajo microscopio compuesto (Carl Zeiss) utilizando una cámara de Neubauer, con una retícula de 0.01 mm. Para ello se tomaron 20 µL de la dilución de hemolinfa en formol y solo se contabilizaron los hemocitos presentes en el cuadrante superior izquierdo e inferior derecho. El número de hemocitos por mililitro se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Células mL}^{-1} = [(\text{Células contadas} / \# \text{ de cuadros contados}) \times 10\,000] [\text{Factor de dilución}]$$

6.3.3.3 Prevalencia de camarones infectados con los virus WSSV e IHHNV

Para determinar la prevalencia de los virus en los camarones, se analizaron individualmente los organismos previamente utilizados en el conteo total de hemocitos, que representaron el 40% de la población total de cada tratamiento.

6.3.3.3.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó una lamela branquial por organismo, la cual se colocó en 400 µL del reactivo DNAzol (Invitrogen), se maceró con un pistilo y se dejó incubar por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 13 000 x g durante 10 min. Se recuperaron 300 µL del sobrenadante, al cual se añadieron 400 µL de etanol absoluto frío. La mezcla se dejó reposar por 15 min, agitando periódicamente. A continuación se centrifugó a 9 000 x g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 9 000 x g durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se extrajo con una pipeta el líquido restante. Se colocó la muestra en un termoblock a 55 °C hasta secar y se añadieron 30 µL de agua ultrapura a 55 °C. Finalmente,

se agitó la muestra en un agitador vortex, se centrifugó a 9 000 x g y durante 30 s y se almacenó a -20 °C.

6.3.3.3.2 PCR para WSSV

La detección final de WSSV en los organismos se realizó mediante una PCR sencilla y una PCR anidada. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR sencilla fueron: WSSV1:5'-ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC-3' y WSSV2:5'-GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT-3'. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR anidada fueron: WSSV1 in (sentido) 5'-TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC 3' y WSSV2 in (contrasentido) 5'-TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG 3'. (Kimura *et al.*, 1996). Los dos pares de oligonucleótidos amplifican un fragmento de 982 pb y 570 pb, respectivamente. La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL e incluyó 18.75 µL de H₂O; 2.5 µL de búfer de reacción 10X (Bioline); 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM; Bioline); 0.5 µL de dNTPs (100 µM; Bioline); 0.5 µL de cada oligo (10 mM cada uno; Sigma-Genosys); 0.25 µL de Taq polimerasa (5 U µL⁻¹; Bioline) y 1 µL de DNA total para un volumen total de 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador Biometra (Tpersonal) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min, 35 ciclos de 30 s a 95 °C 30 s a 55 °C 2 min a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 4 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron (incluido un marcador de peso molecular de 1 kb) en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV. En la PCR anidada se redujo a 45 s el tiempo de polimerización a 72°C.

6.3.3.3.3 PCR para IHHNV

Se utilizaron los oligonucleótidos IHHNV392F:5'-GGGCGA ACC AGA ATC ACT TA-3' e IHHNV392R:5'-ATC CGG AGG AAT CTG ATG TG-3' (Tang *et al.* 2000) que amplifican un fragmento de 392 pb. La mezcla de reacción se preparó igual que en la PCR para WSSV. El programa utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C, por 3 min, 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 55 °C, 45 s a 72 °C y una extensión final a 72 °C, por 4 min.

6.3.3.3.4 PCR para el gen GAPDH

Para confirmar la calidad de la extracción de ADN de las muestras negativas para IHHNV y WSSV, se realizó la amplificación del gen GAPDH que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Este gen funciona como un control interno del DNA genómico del camarón. Para la mezcla de PCR se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Tang *et al.* (2000), GAPDH298F 5' TCA CCG TCT TCA ACG AGA TG 3' y GAPDH298R 5' ACC CTC CAG CAT CTC GAA CT 3' que amplifican un fragmento de 298 pb. La mezcla de reacción se preparó igual que en el PCR para WSSV. El programa utilizado fue el empleado para WSSV.

6.3.4 Experimento 2: Efecto de la frecuencia de aplicación de BAL en la supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHHNV en camarones blancos.

6.3.4.1 Diseño experimental

Se utilizaron 120 camarones de 17.33 ± 3.24 g de la granja Cuate Machado ubicada frente a playa Las Glorias ($25^{\circ}19'6.14''$ N $108^{\circ}29'37.87''$ O) en el municipio de Guasave. Se analizaron 30 organismos del grupo que se utilizó, mediante PCR individual (sencilla y anidada para WSSV), para determinar la presencia de los virus WSSV e IHHNV. El resto de los organismos se repartieron al azar colocando 10 camarones por tina. En este experimento se evaluó la frecuencia de aplicación del alimento adicionado con la mezcla 2 de BAL (M2BAL) a una concentración de 1×10^6 UFC g⁻¹. El experimento tuvo una duración de 20 días y constó de 4 tratamientos, cada uno con tres réplicas:

- T I) Camaronina + DO (Control negativo);
- T II) Camaronina + DO + M2BAL diario (Control positivo);
- T III) Camaronina + DO + M2BAL cada 3 días;
- T IV) Camaronina + DO + M2BAL cada 6 días.

Al final del bioensayo se registró la supervivencia, la prevalencia de los virus y se contaron los hemocitos como se describió para el experimento 1.

6.4 Análisis estadístico

Para comparar los datos del conteo total de hemocitos (CTH) obtenidos en cada tratamiento durante los experimentos, primero se realizó una prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y una prueba de homocedasticidad (Bartlett). Posteriormente, se realizó un ANDEVA de una vía, para detectar diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$). Finalmente, se realizó la prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ($p < 0.05$).

Los datos de supervivencia se transformaron con la fórmula $\arcseno \sqrt{\%/100}$ (Dughetti y De Carli, 1999; Araya *et al.*, 2000) para cumplir una distribución normal y realizar el análisis de varianza (ANDEVA) de una vía. Los resultados de prevalencia de ambos virus se analizaron con la prueba no paramétrica de Cochran para detectar diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$).

VII. RESULTADOS

7.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)

De los 10 camarones analizados, sólo dos, correspondientes a la especie *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), presentaron BAL presuntivas en intestino. Se lograron obtener 40 aislados presuntivos de BAL presuntivas pero en este trabajo sólo se tomaron 20 para su caracterización y posterior selección.

7.2 Caracterización de los aislados bacterianos

7.2.1 Prueba de hemólisis con sangre humana

De los 20 aislados de BAL presuntivas, 14 presentaron hemólisis gamma (γ) y 6 hemólisis beta (β) en agar sangre (Tabla 1), mientras que todos presentaron hemólisis γ en agarosa sangre. Los aislados β -hemolíticos fueron desechados por su capacidad para lisar eritrocitos humanos. Esto con el fin de eliminar o disminuir el efecto adverso del posible probiótico contra el hombre, consumidor final del camarón.

Tabla 1. Prueba de hemólisis en agar sangre.

Aislado	Hemólisis
20	γ
21	γ
22	γ
23	γ
25	β
26	β
27	β
28	γ
29	γ
30	β
31	γ
32	γ
33	γ
34	γ
35	β
36	γ
37	γ
38	γ
39	γ
40	β

7.2.2 Cinética de crecimiento bacteriano (curva de crecimiento)

La figura 2 muestra los resultados de la cinética de crecimiento de los 14 aislados γ -hemolíticos. La mayoría de los aislados presentaron una fase de aclimatación de 6 a 12 h, a excepción de los aislados 20 y 31, cuya fase de aclimatación se extendió hasta las 24 h (punta de flecha roja). La fase exponencial de los aislados inició en tres tiempos: 6 h (aislados 28, 29 y 34), 12 h (aislados 21, 22, 23, 32, 33, 36, 37, 38 y 39) y 24 h (aislados 20 y 31). La duración promedio fue de 41 h, la mínima de 24 h y la máxima de 60 h.

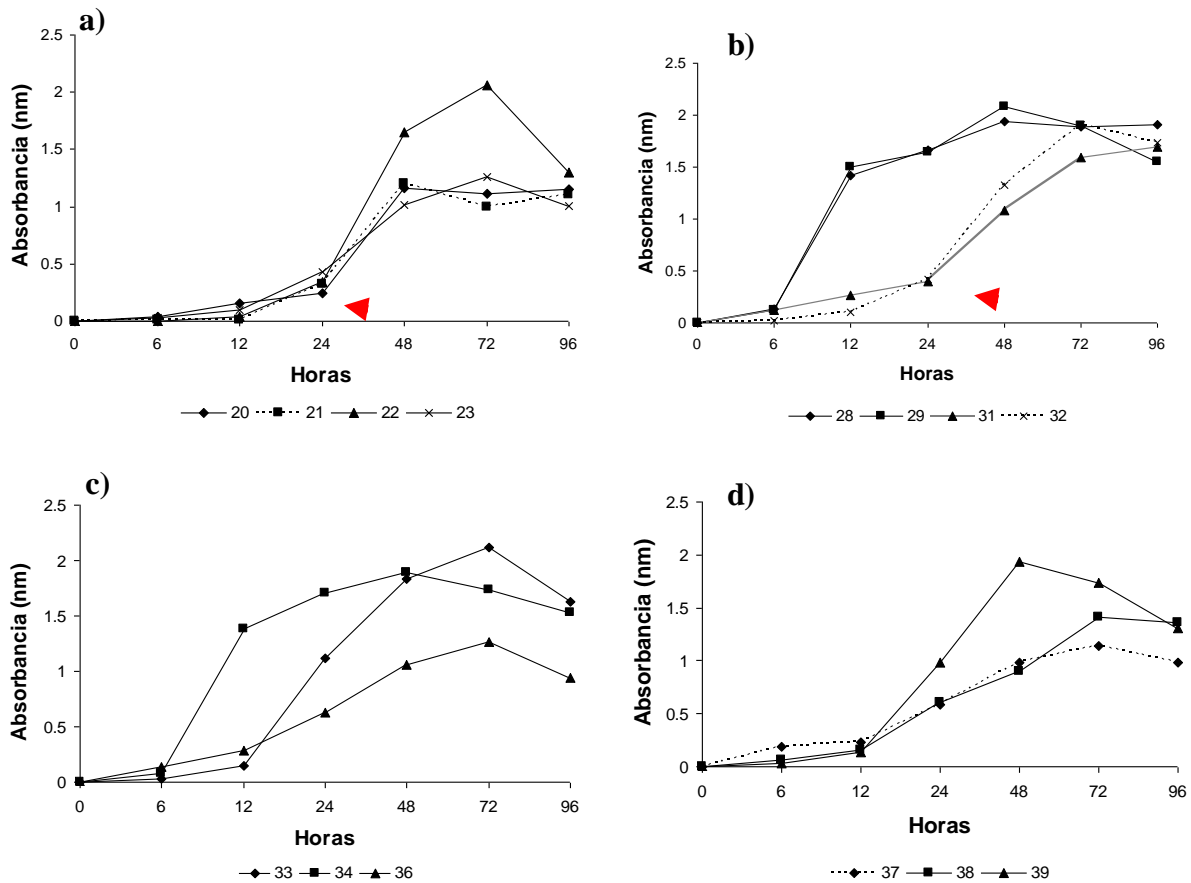


Figura 2. Cinética de crecimiento de BAL presuntivas en medio MRS con 2% de NaCl, cultivadas a 30 °C por 96 h. a) Aislados 20,21,22 y 23; b) Aislados 28,29, 31 y 32; c) Aislados 33, 34 y 36; d) Aislados 37, 38 y 39.

7.2.3 Conteo de BAL presuntivas

La tabla 2 muestra el número de UFC por mililitro de cada uno de los aislados. Los resultados mostraron valores entre 178 y 665 millones de UFC mL⁻¹. Los aislados 22 y 31 fueron descartados debido al menor número de UFC mL⁻¹.

Tabla 2. Unidades formadoras de colonias por mililitro de cada uno de los aislados. La densidad óptica de la suspensión bacteriana fue de uno.

Aislado	UFC mL⁻¹
20	374.75 x 10 ⁶
21	219.50 x 10 ⁶
22	178 x 10 ⁶
23	278.25 x 10 ⁶
28	383.25 x 10 ⁶
29	247.50 x 10 ⁶
31	195.50 x 10 ⁶
32	246.50 x 10 ⁶
33	380 x 10 ⁶
34	403 x 10 ⁶
36	216 x 10 ⁶
37	261 x 10 ⁶
38	665 x 10 ⁶
39	480 x 10 ⁶

7.2.4 Tinción con Rojo Congo (Prueba de hidrofobicidad)

Los 12 aislados cultivados asimilaron el colorante rojo congo, 9 formaron colonias rojas (20, 21, 23, 32, 33, 36, 37, 38 y 39) y 3 (28, 29 y 34) formaron colonias rosadas. Lo anterior demuestra que estas bacterias presentan estructuras hidrofóbicas en su pared celular con las cuales son capaces de establecer interacciones hidrofóbicas con el epitelio del intestino del camarón (Fig. 3).

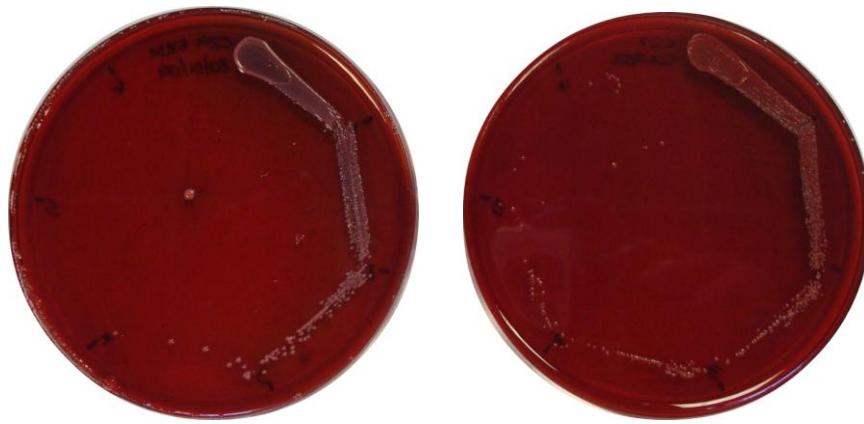


Figura 3. Prueba de tinción con rojo congo. A la izquierda se muestra el aislado 29 teñido de un color rosa debido al pH (4.5) y a la derecha el aislado 23, teñido de rojo (pH 5.5).

7.2.5 Actividad enzimática extracelular

En la prueba de degradación de la caseína, con sobrenadante ácido, el control de MRS estéril con pH 4, formó un halo de 6 mm de diámetro, apenas 1 mm más pequeño que los formados por los aislados 28, 29, 34, 36 y 37 (Tabla 3). Esto demuestra que el bajo pH de los cultivos ocasionado por la formación de ácidos como el ácido láctico es capaz de formar falsos halos de hidrólisis en la prueba con leche descremada (Fig. 4). Al aumentar el pH de los cultivos a un valor de 6.5, cuatro de las cinco cepas que formaron halos en la prueba anterior, vuelven a presentar halo de hidrólisis, pero significativamente más pequeños (Fig. 5). El control negativo (MRS caldo, pH 6.5) no formó halo, mientras que los aislados β -hemolíticos, utilizados como controles positivos, formaron halos de 4 mm de diámetro, al igual que el aislado 37. Sin embargo, los aislados 28, 29 y 34 formaron halos de entre 2 y 1 mm de diámetro, indicando una actividad proteolítica menor (Tabla 4).

Las pruebas de hidrólisis de gelatina y Tween 80 dieron resultados negativos tanto a pH 4.5 como a pH 6.5.

Tabla 3. Pruebas de actividad enzimática extracelular con sobrenadante ácido. Se midió el diámetro del halo de hidrólisis.

Aislado	pH	Degradación de la caseína	Hidrólisis de la gelatina	Hidrólisis de Tween 80
20	5.5	0	0	0
21	5.5	0	0	0
23	5.5	0	0	0
28	4.5	7 mm	0	0
29	4.5	7 mm	0	0
32	5.5	0	0	0
33	5.5	0	0	0
34	4.5	7 mm	0	0
36	4.5	7 mm	0	0
37	4.5	7 mm	0	0
38	5.5	0	0	0
39	5.5	0	0	0
Controles				
MRS	4	6 mm	0	0
MRS	6.5	0	0	0
Aislado 35	4.5	7 mm	0	0



Figura 4. Prueba de degradación de la caseína, con sobrenadante a pH 4.5. A la izquierda se muestra la placa del aislado 20 al 32 y a la derecha se muestra del aislado 33 al 39. CA: Control ácido (MRS con 2% de NaCl a pH 4); C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5); C+35: Control positivo (Cepa 35, β -hemolítica).

Tabla 4. Pruebas de actividad enzimática extracelular con sobrenadante a pH 6.5. Se midió el diámetro del halo de hidrólisis.

Aislado	pH	Degradación de la caseína	Hidrólisis de la gelatina	Hidrólisis de Tween 80
20	6.5	0	0	0
21	6.5	0	0	0
23	6.5	0	0	0
28	6.5	2 mm	0	0
29	6.5	1 mm	0	0
32	6.5	0	0	0
33	6.5	0	0	0
34	6.5	2 mm	0	0
36	6.5	0	0	0
37	6.5	4 mm	0	0
38	6.5	0	0	0
39	6.5	0	0	0
Controles				
MRS	6.5	0	0	0
Aislado 35	6.5	4 mm	0	0
Aislado 27	6.5	4 mm	0	0



Figura 5. Prueba de degradación de la caseína, con sobrenadante a pH 6.5. A la izquierda se muestra la placa del aislado 20 al 32 y a la derecha se muestra del aislado 33 a la 39. C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5); C+35 y C+27: Control positivo (Cepa 35 y 27, β -hemolíticas). Puntas de flecha; aislados con actividad proteolítica (28, 29, 34 y 37).

7.2.6 Prueba de antagonismo contra *Vibrio* sp.

Los aislados de BAL presuntivas no presentaron actividad antagónica contra la cepa 24 y 27 de vibrio, tanto a pH ácido (4.5) como a pH 6.5 (Fig. 6).



Figura 6. Prueba de antagonismo de los aislados 33-39 contra la cepa 24 de vibrio. A la izquierda se muestra la placa con los sobrenadantes a pH 4.5 y a la derecha la placa con sobrenadantes a pH 6.5. CA: Control ácido (MRS con 2% de NaCl a pH 4); C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5)

7.2.7 Hemólisis en hemolinfa de camarón

Todos los aislados de BAL presuntivas presentaron hemólisis gamma contra los hemocitos de camarón blanco, es decir, no lisan los hemocitos del camarón (Figs. 7 y 8).



Figura 7. Prueba de hemólisis en hemolinfa de camarón con sobrenadante a pH 6.5. A la izquierda se muestra la placa del aislado 20 al 32 y a la derecha la placa con los aislados 33 al 39. C-: Control negativo (MRS con 2% de NaCl a pH 6.5).

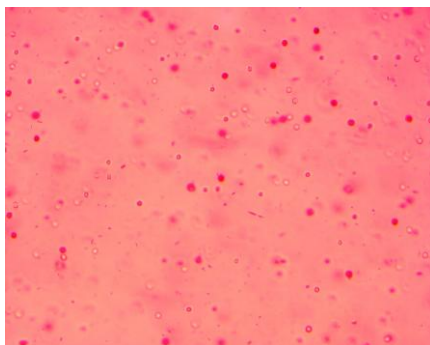


Figura 8. Hemocitos teñidos con rosa de bengala y embebidos en medio basal.

7.2.8 Tinción de Gram

Todos los aislados son cocos Gram (+). El arreglo celular se observó en pares o en grupos de múltiplos de 2 y 3 y en racimos que forman grandes masas (Fig. 9).

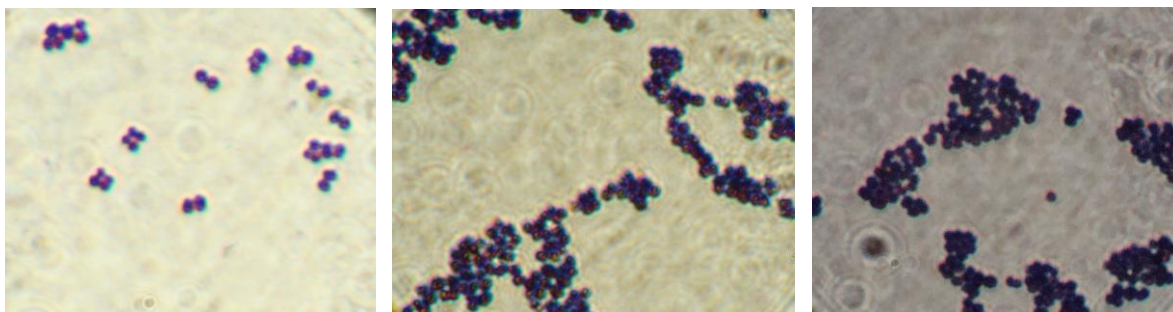


Figura 9. Tinción de Gram. Cocos Gram (+) con arreglo en múltiplos de 2, 3 y racimos.

7.2.9 Identificación molecular

Se realizó la identificación molecular de los ocho aislados evaluados en los experimentos (BALCS20, BALCS28, BALCS29, BALCS33, BALCS34, BALCS37, BALCS38 y BALCS39). Dicha selección estuvo basada en los resultados de las pruebas de caracterización previas (Véase resultados sección 7.3).

La figura 10 muestra el fragmento de 1500 pb obtenido de la amplificación del gen ribosomal 16S cuya secuenciación permitió la determinación del género de 4 aislados con porcentajes de identidad que van desde 90% (aislado 33) a 98% (aislado 29) para la especie *Pediococcus pentosaceus* (Tabla 5). Sin embargo, en algunos aislados se presentaron porcentajes de identidad similares para otras especies del género *Pediococcus* como son *P. acidilactici* (aislado 34 con 97% de

identidad; aislado 28 con 96% de identidad; aislado 33 con 96% de identidad), *P. parvulus* (aislado 34 con 93% de identidad) y *P. clausenii* (aislado 34 con 94% de identidad). No se lograron identificar los aislados 20, 37, 38 y 39.

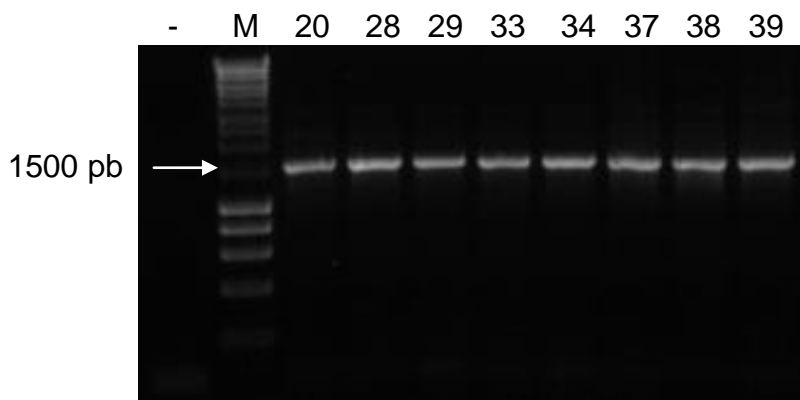


Figura 10. Productos de la PCR obtenidos de la amplificación del gen ribosomal 16S de los 8 aislados probados. Línea -: Control negativo; Línea M: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); Línea 20-39: Aislados de BAL.

Tabla 5. Identificación molecular de los aislados secuenciados con los oligonucleótidos 27f y 1492r.

Aislado	Especie	GenBank	Porcentaje de identidad
20	Bacteria no cultivable	GQ088738	97%
28	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	FJ538556	94%
29	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	J538552	98%
33	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB481102	90%
34	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EU080993	95%
37	Bacteria no cultivable	GQ076330	95%
38	Bacteria no cultivable	GQ115388	97%
39	Bacteria no cultivable	GQ029205	95%

Una vez que se identificó el género (*Pediococcus*) al cual pertenecen cuatro aislados probados y asumiendo que los cuatro aislado restantes pertenecían al mismo género debido a los resultados obtenidos en la caracterización, se procedió a la diferenciación entre especies, para lo cual se realizó la secuenciación de un

fragmento de aproximadamente 3300 pb correspondiente a los genes 23S y 5S del ADNr (Fig. 11). Las secuencias obtenidas (ver anexos) presentaron alta homología con la especie *Pediococcus pentosaceus* en cinco de los ocho aislados (Tabla 6). Al parecer los tres aislados restantes estaban contaminados (secuencias con doble bandeo), por lo que se procedió a limpiar los aislados desde la muestra original para una posterior secuenciación.

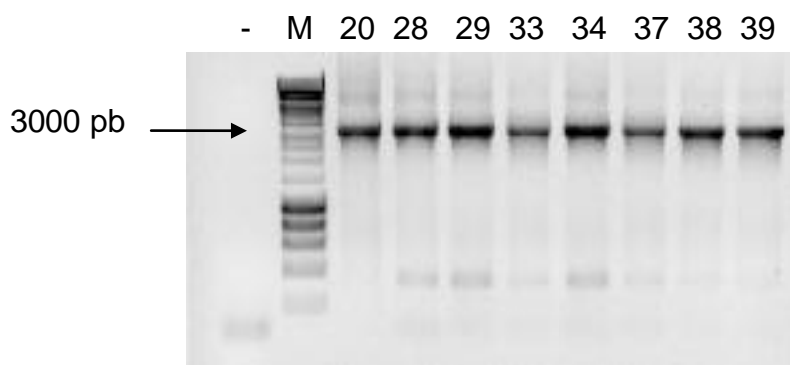


Figura 11. Productos de la PCR obtenidos de la amplificación de los genes 23S y 5S de los 8 aislados probados. Línea -: Control negativo; Línea M: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline); Línea 20-39: Aislados de BAL.

Tabla 6. Resultados de la identificación molecular de los aislados secuenciados con los oligonucleótidos P23S_F1 y P5S_R.

Aislado	Especie	GenBank	Porcentaje de identidad
20	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EF116577	99%
28	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EF116577	97%
29	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EF116577	99%
33	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EF116577	100%
34	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	EF116577	99%
37	No identificada		
38	No identificada		
39	No identificada		

Para realizar la segunda secuenciación de los genes 23S y 5S primeramente se corroboró la efectividad de los oligonucleótidos internos KP23S-F1 y KP23S-F2

mediante PCR semianidado con el oligonucleótido reversa P5S_R. La temperatura de anillamiento utilizada en la reacción de PCR (57 °C) fue el promedio de las temperaturas óptimas de anillamiento de los oligonucleótidos, 59 °C para los dos oligonucleótidos internos y 55 °C para P5S_R. Con cada juego de oligonucleótidos se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 550 pb (Fig. 12).

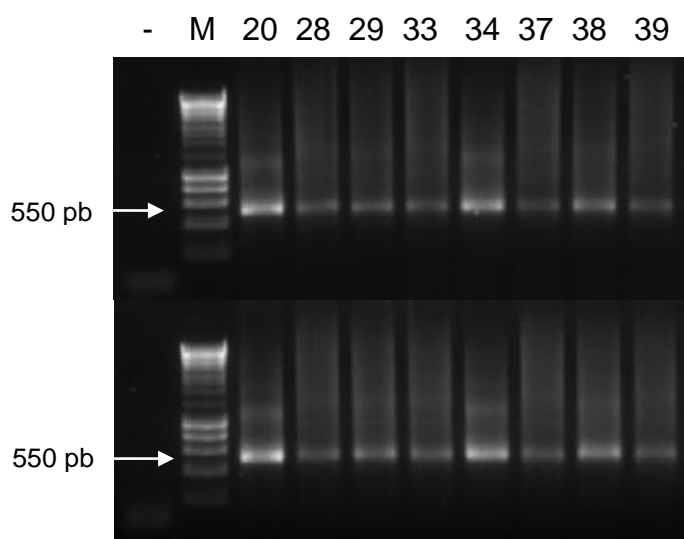
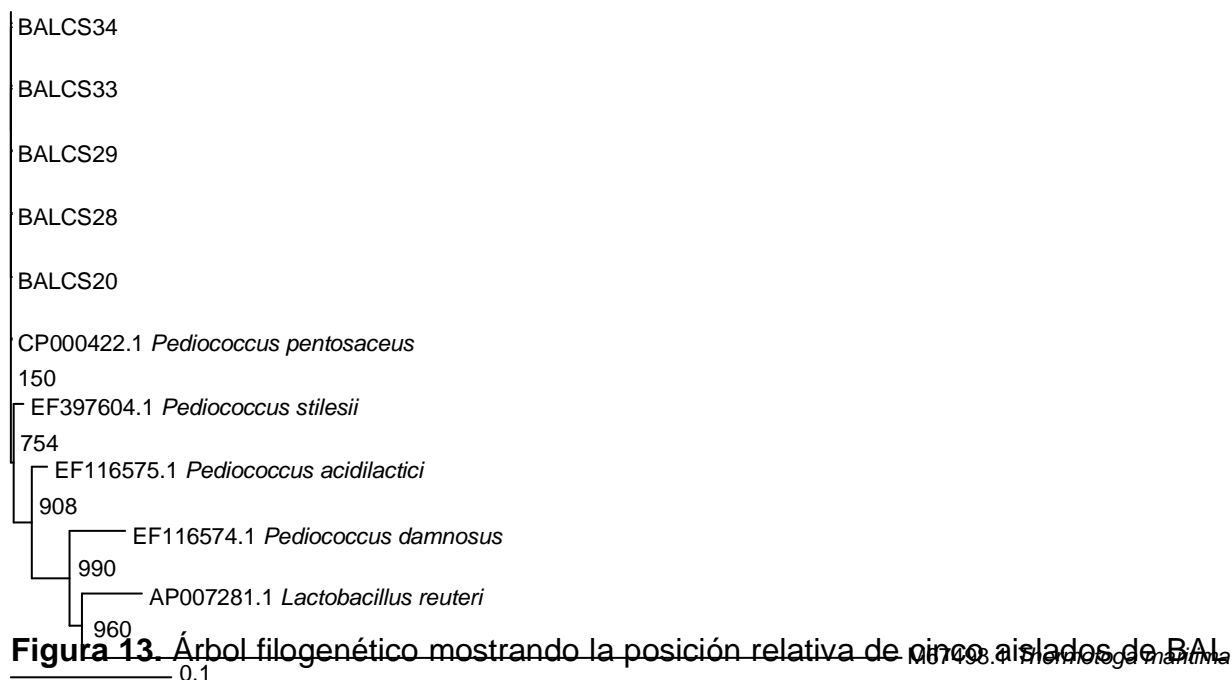


Figura 12. Productos de la PCR obtenidos de la amplificación con los oligonucleótidos internos (PK23S-F1, arriba y PK23S-F2, abajo) y el oligonucleótido P5S_R en los aislados de BAL presuntivas. Línea -: Control negativo; Línea M: Marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline).

Comprobada la efectividad de ambos oligonucleótidos internos se decidió realizar la secuenciación con el oligonucleótido KP23S-F1. Las secuencias obtenidas (ver anexos) permitieron identificar todos los aislados a nivel de especie. Cinco (20, 28, 29, 33 y 34) de ellos registraron 100% de homología con *Pediococcus pentosaceus* (Tabla 7), lo cual concuerda con los resultados de cuatro aislados obtenidos en la primera secuenciación de estos genes. Los tres aislados restantes (37, 38y 39) registraron 99% de homología con la especie *Staphylococcus haemolyticus*. Para la construcción del árbol filogenético sólo se utilizaron los aislados de *P. pentosaceus*, debido a la obtención de secuencias incompletas en los aislados de *S. haemolyticus* (Fig. 13).

Tabla 7. Identificación molecular de los aislados secuenciados con el oligonucleótido interno KP23S-F1.

Aislado	Especie	GenBank	Porcentaje de identidad
20	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CP000422.1	100%
28	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CP000422.1	100%
29	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CP000422.1	100%
33	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CP000422.1	100%
34	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CP000422.1	100%
37	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AP006716.1	99%
38	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AP006716.1	99%
39	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AP006716.1	99%



7.3 Selección de aislados con potencial probiótico

De los resultados obtenidos en cada una de las pruebas, se seleccionaron dos grupos, a los que se les evaluó su capacidad inmunoestimulante en camarón blanco infectado con WSSV e IHHNV.

Como se mencionó anteriormente, se desecharon 6 aislados β -hemolíticos y 2 con bajo conteo de UFC mL⁻¹, quedando un total de 12 aislados con potencial probiótico (Tabla 8). Primeramente, este grupo se dividió en dos, un aislado con actividad proteolítica extracelular y aislado sin dicha actividad. En el primer grupo se encuentran los aislados 28, 29, 34 y 37, correspondientes a la mezcla 1; en el segundo grupo se encuentran los 8 aislados restantes, de los cuales se seleccionaron los cuatro con conteo celular más alto (20, 33, 38 y 39) para formar la mezcla 2.

Tabla 8. Pruebas de caracterización de 12 aislados presuntivos de BAL (γ -hemolíticas) con potencial probiótico.

Cepa	Hemólisis	Hemólisis	Cuento UFC mL ⁻¹	Rojo congo	Caseína		Gelatina		Tween 80		Antagonismo contra <i>Vibrio</i>
	sangre humana	hemolinfa			pH ácido	pH neutro	pH ácido	pH neutro	pH ácido	pH neutro	
20	γ	γ	374.75 x 10 ⁶	(+)	0	0	0	0	0	0	0
21	γ	γ	219.5 x 10 ⁶	(+)	0	0	0	0	0	0	0
23	γ	γ	278.25 x 10 ⁶	(+)	0	0	0	0	0	0	0
28	γ	γ	383.25 x 10 ⁶	(+)	7 mm*	2 mm*	0	0	0	0	0
29	γ	γ	247.5 x 10 ⁶	(+)	7 mm*	1 mm*	0	0	0	0	0
32	γ	γ	246.5 x 10 ⁶	(+)	0	0	0	0	0	0	0
33	γ	γ	380 x 10 ⁶	(+)	0	0	0	0	0	0	0
34	γ	γ	403 x 10 ⁶	(+)	7 mm*	2 mm*	0	0	0	0	0
36	γ	γ	216 x 10 ⁶	(+)	7 mm*	0	0	0	0	0	0
37	γ	γ	261 x 10 ⁶	(+)	7 mm*	4 mm*	0	0	0	0	0
38	γ	γ	665 x 10 ⁶	(+)	0	0	0	0	0	0	0
39	γ	γ	480 x 10 ⁶	(+)	0	0	0	0	0	0	0

* Medida del diámetro del halo de lisis.

En gris se muestran los aislados que forman la mezcla 1 y en azul los aislados de la mezcla 2.

7.4 Experimento 1: Distintas concentraciones de inclusión de BAL presuntivas en el alimento y su efecto sobre la supervivencia y sistema inmune de organismos sanos de *L. vannamei*.

7.4.1 Adición de las BAL presuntivas al alimento

7.4.1.1 Estudio de viabilidad de las BAL presuntivas adicionadas al alimento

Las concentraciones iniciales de bacteria para cada tratamiento fueron las siguientes: II, 1 392 000 UFC g⁻¹; III, 2 022 000 UFC g⁻¹; IV, 1 581 000 UFC g⁻¹ y V, 2 313 000 UFC g⁻¹. En la figura 14 se muestra el comportamiento de las bacterias en el alimento. Se puede observar la pérdida de viabilidad registrada a los 5 días en cada tratamiento: II, 25.28%; III, 37.98%; IV, 30.74% y V, 12.23%.

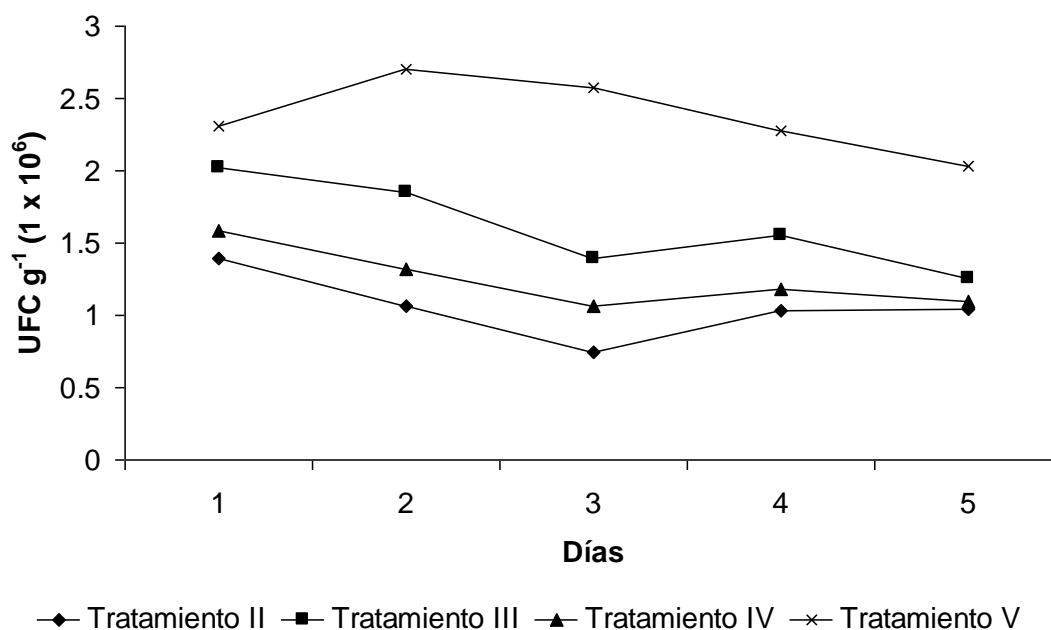


Figura 14. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas adicionadas al alimento en un periodo de 5 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C). II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1 x 10⁶); III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2 x 10⁶); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1 x 10⁶); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2 x 10⁶).

7.4.2 Mantenimiento y operación

Los organismos utilizados en este experimento eran portadores asintomáticos de WSSV e IHHNV. El peso promedio de los organismos en cada tratamiento al inicio del

experimento fue el siguiente: I (Control), 6.50 ± 1.49 ; II, 6.93 ± 1.66 ; III, 6.82 ± 1.56 ; IV, 7.11 ± 1.48 y V, 6.78 ± 1.16 .

Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de los intervalos óptimos para el cultivo del camarón blanco (excepto la salinidad) durante los 10 d del experimento, los cuales según Brock y Main (1994) son: oxígeno disuelto de 4.0 a 10.0 mg L⁻¹; pH de 8.1 a 9.0; temperatura de 23 a 30 °C; y salinidad de 15 a 35 ‰.

El oxígeno disuelto mostró valores entre 5 y 6 mg L⁻¹. El pH se mantuvo entre 7.9 y 8.1. La temperatura se mantuvo entre 26 y 27 °C. La salinidad sobrepasó el límite óptimo, registrando valores entre 35 y 45 (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos del sistema de cultivo en el experimento I. Se muestra la media y desviación estándar (DE).

Tratamientos	O ₂ (mg L ⁻¹)	T (°C)	pH	Salinidad
I (Control)	5.71 ± 0.35	26.6 ± 0.5	7.91 ± 0.07	38.16 ± 3.48
II	5.85 ± 0.34	26.73 ± 0.22	7.95 ± 0.05	38.66 ± 4.08
III	5.67 ± 0.24	26.86 ± 0.89	8.01 ± 0.07	39 ± 4.42
IV	5.7 ± 0.26	26.6 ± 0.38	8.01 ± 0.09	39.66 ± 5.12
V	5.49 ± 0.46	26.38 ± 0.11	7.95 ± 0.10	38.83 ± 4.30

7.4.3 Conteo total de hemocitos

Los promedios de células por mililitro para cada tratamiento fueron los siguientes: I (Control), 15.18×10^6 ; II, 17.5×10^6 ; III, 18.5×10^6 ; IV, 22.7×10^6 ; V, 15.5×10^6 (Fig. 15). El resultado del ANDEVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

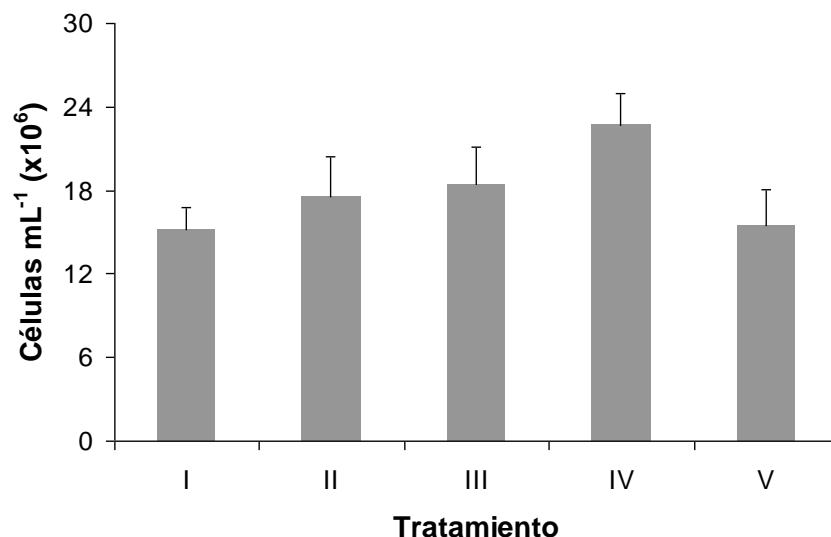


Figura 15. Experimento I. Número promedio de hemocitos en cada tratamiento. I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6). Se muestra la media y el error estándar ($p > 0.05$).

7.4.4 Supervivencia y prevalencia de camarones infectados con WSSV e IHHNV

Al finalizar este experimento, todos los tratamientos registraron una supervivencia del 100%. En cuanto a prevalencia de IHHNV, se registraron 10 organismos positivos en el control (83.3%) (organismos infectados desde la granja) y 12 organismos positivos en los demás tratamientos (100%) (Fig. 16). No hubo diferencias significativas con la prueba de Cochran ($p > 0.05$). Sin embargo, la prevalencia del virus WSSV fue diferente entre el tratamiento I (Control) y el resto de los tratamientos, detectando diferencias significativas con la prueba de Cochran ($p < 0.05$). El control presentó 11 organismos (91.6%) positivos para WSSV, mientras que los tratamientos II, III y IV presentaron dos organismos (16.6%) positivos y el tratamiento V sólo uno (8.3%) (Fig. 17).

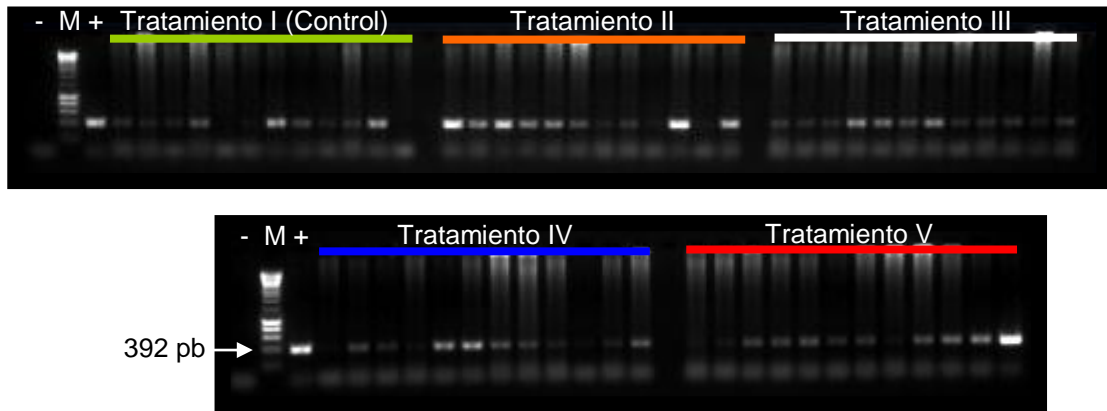


Figura 16. Experimento I. PCR para IHNV en cada tratamiento. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6).

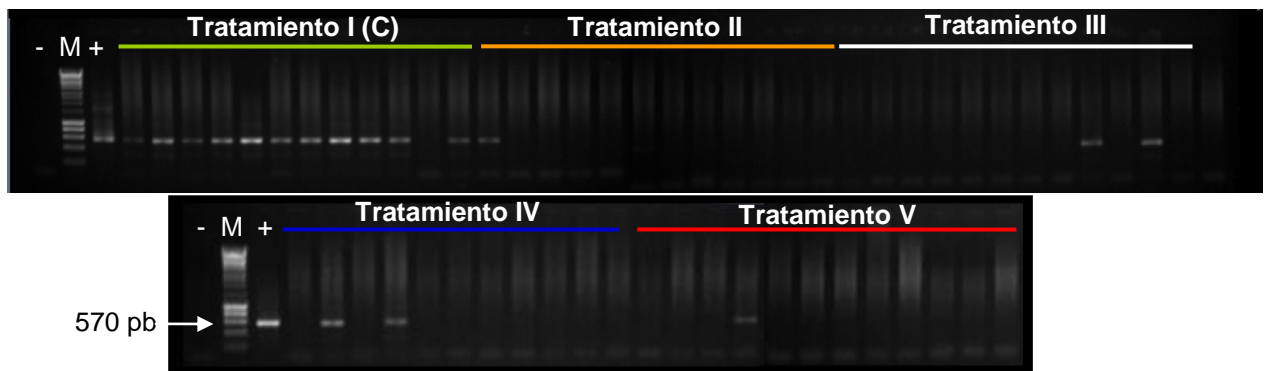


Figura 17. Experimento I. PCR anidado para WSSV en cada tratamiento. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 2 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6).

7.4.5 PCR para el gen GAPDH

La amplificación del gen GAPDH en las extracciones de ADN de los organismos negativos para WSSV e IHNV demostró que la calidad y cantidad del ácido nucleico de los organismos analizados era suficiente para detectar la presencia de los virus antes mencionados (Fig. 18).

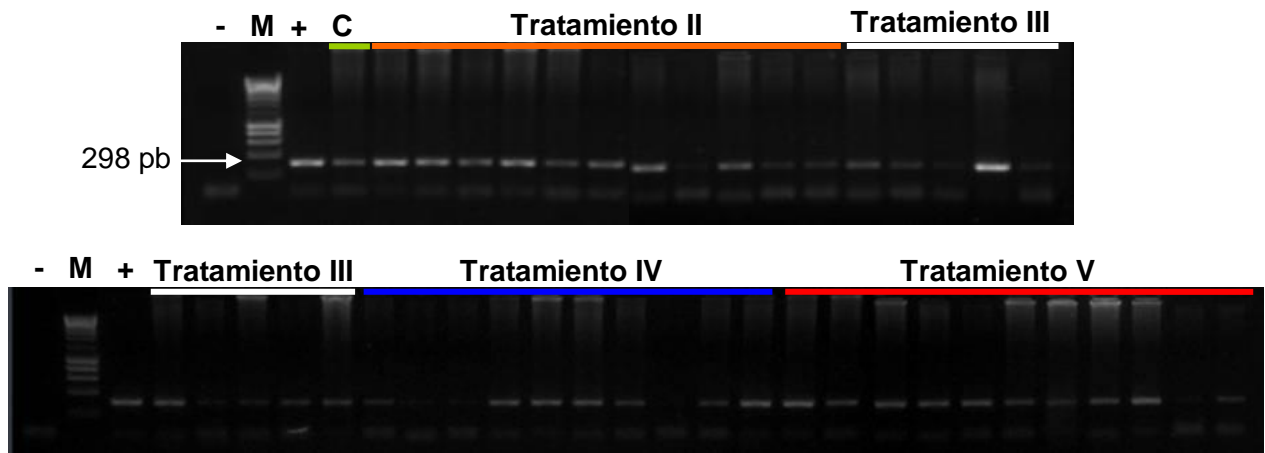


Figura 18. Experimento I. PCR del gen GAPDH de los organismos negativos para WSSV e IHNV. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; C, Grupo control; II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (2×10^6); IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6); V, Camaronina + DO + Mezcla 2 (2×10^6).

7.5 Experimento 2: Efecto de la frecuencia de aplicación de BAL presuntivas en la supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHNV en *L. vannamei*.

7.5.1 Mantenimiento y operación

Todos los organismos eran portadores de ambos virus (antes del inicio del experimento), registrando una prevalencia del 100% para WSSV y 26.6% para IHNV (Figs. 19 y 20).

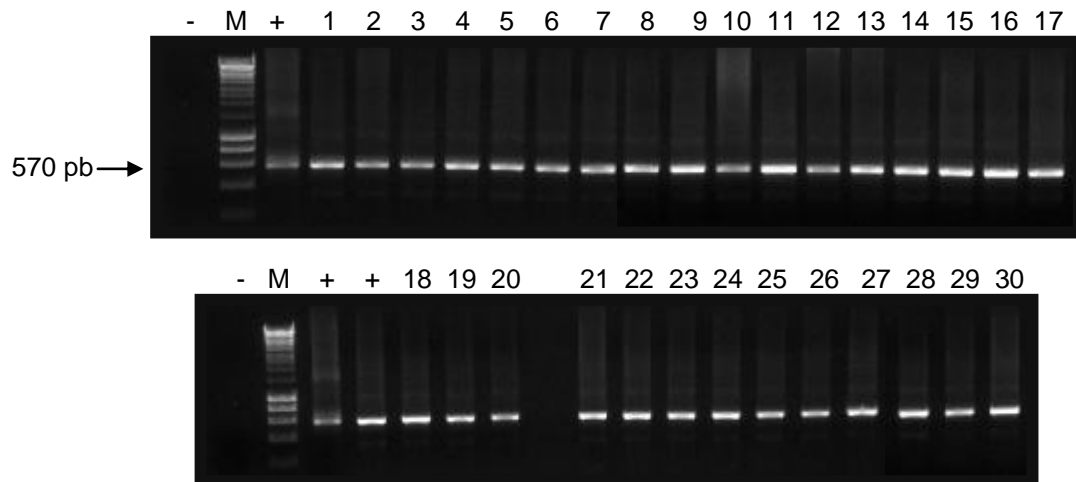


Figura 19. PCR anidada para WSSV realizado a 30 camarones de un lote de 150, antes de iniciar el experimento II.

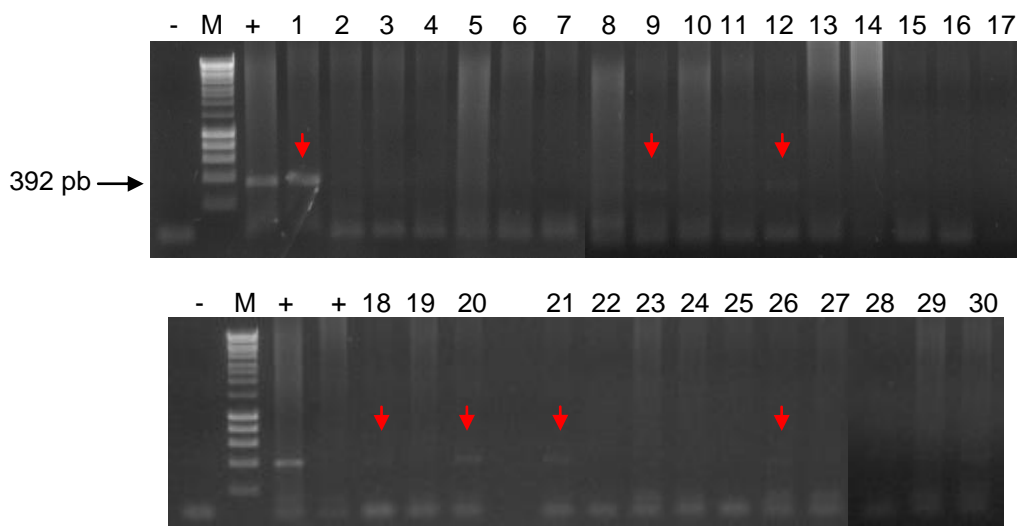


Figura 20. PCR para IHHNV realizado a 30 camarones de un lote de 150, antes de iniciar el experimento II. Las flechas rojas indican las muestras positivas para el virus.

El peso promedio de los organismos al inicio del experimento fue el siguiente: Tratamiento I (Control), 17.96 ± 3.04 g; tratamiento II, 16.43 ± 2.63 g; tratamiento III, 17.36 ± 3.35 g y tratamiento IV, 17.56 ± 3.80 g.

Durante el período de cultivo (20 días) los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de los rangos óptimos para el cultivo del camarón blanco (excepto la salinidad), los cuales, según Brock y Main (1994), son: oxígeno disuelto de 4.0 a 10.0 mg L⁻¹; pH de 8.1 a 9.0; temperatura de 23 a 30 °C y salinidad 15 a 35 ‰ (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos del sistema de cultivo en el experimento II. Se muestra la media y desviación estándar (DE).

Tratamientos	O ₂ (mg L ⁻¹)	T (°C)	pH	Salinidad
I (Control)	6.40 ± 0.50	25.09 ± 1.50	7.87 ± 0.13	37.9 ± 1.73
II	6.49 ± 0.26	26.45 ± 2.00	8.04 ± 0.14	38.27 ± 1.58
III	6.38 ± 0.65	26.46 ± 1.81	7.71 ± 0.37	37.80 ± 2.48
IV	5.94 ± 0.52	25.35 ± 1.61	7.74 ± 0.27	38.40 ± 2.29

7.5.2 Conteo total de hemocitos

La figura 21 muestra los promedios del número de células por mililitro para cada tratamiento: Tratamiento I (Control), 18.78×10^6 ; tratamiento II, 14.82×10^6 ; tratamiento

III, 18.33×10^6 ; tratamiento IV, 16.08×10^6 El resultado del ANDEVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

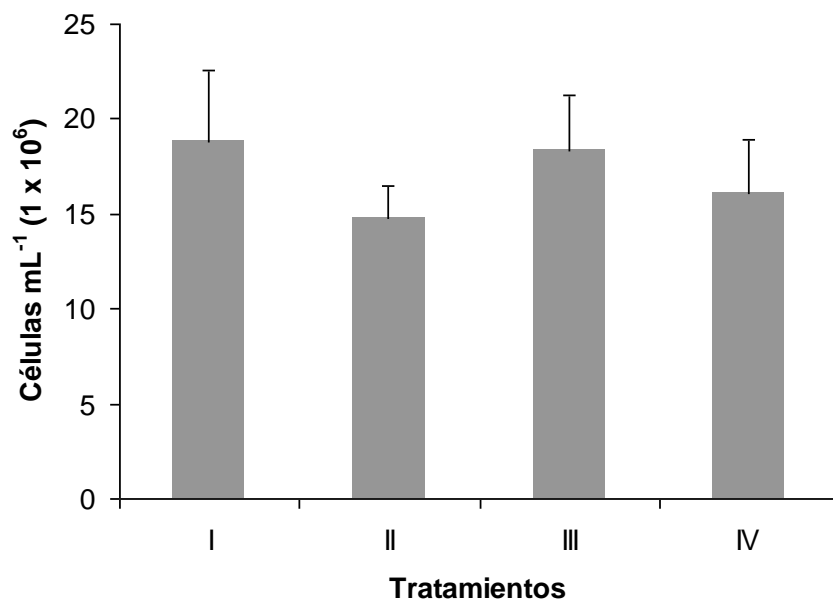


Figura 21. Experimento II. Número promedio de hemocitos en cada tratamiento. I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días. Se muestra la media y el error estándar ($p > 0.05$).

7.5.3 Supervivencia y prevalencia de camarones infectados con WSSV e IHHNV

Al finalizar el experimento se registraron supervivencias altas en todos los tratamientos: 94.44% en el tratamiento I (control); 97.2% en el tratamiento II; 97.2% en el tratamiento III y 91.63% en el tratamiento IV. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (Fig. 22). En cuanto a prevalencia de los virus, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos con la prueba de Cochran ($p > 0.05$). De hecho, se presentó una disminución de la prevalencia inicial en todos los tratamientos, incluido el control. El tratamiento I control, presentó dos organismos positivos para WSSV (16.6%) y uno para IHHNV (8.3%). El tratamiento II presentó un organismo positivo para ambos virus (8.3%), el tratamiento III presentó cuatro organismos positivo para WSSV (25%) y dos para IHHNV (16.6%) y finalmente el tratamiento IV presentó tres organismos positivos para WSSV (25%) y ninguno para IHHNV (Fig. 23 y 24).

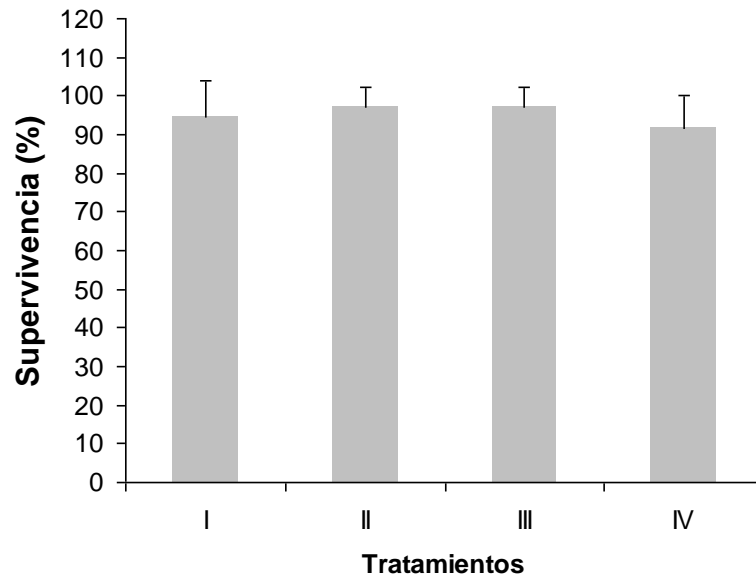


Figura 22. Experimento II. Supervivencia en cada uno de los tratamientos al finalizar el experimento. I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días. Se muestra la media y la desviación estándar ($p > 0.05$).

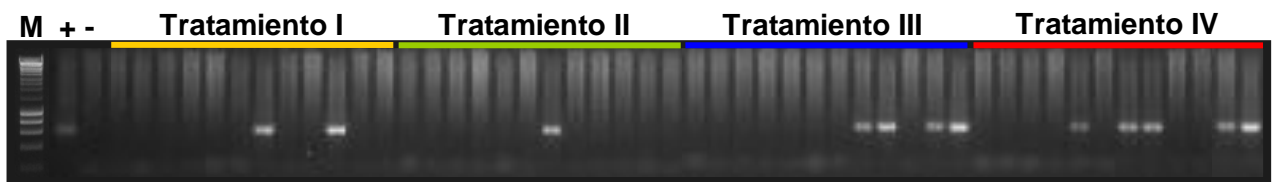


Figura 23. Experimento II. PCR anidada para WSSV en cada tratamiento. (M) Marcador de peso molecular; (-) Control negativo; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días.

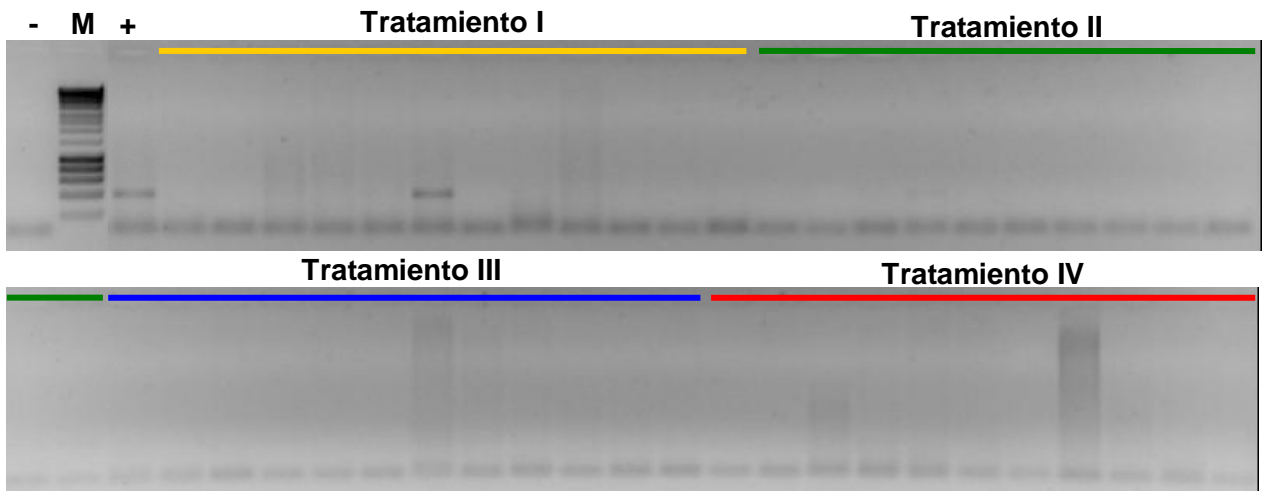


Figura 24. Experimento II. PCR para IHNV en cada tratamiento. (-) Control negativo; (M) Marcador de peso molecular; (+) Control positivo; I, Control (Camaronina + DO); II, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado diariamente; III, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada 3 días; IV, Camaronina + DO + Mezcla 1 (1×10^6), aplicado cada seis días.

VIII. DISCUSIÓN

El uso de bacterias ácido lácticas como probióticos en acuicultura se debe en gran parte a la disponibilidad, rapidez de producción y tecnología industrial desarrollada alrededor de ellas. Estas facilidades han permitido que bacterias útiles en la alimentación humana (elaboración de productos lácteos, yogurt, quesos) sean aplicadas en la producción ganadera, y en los últimos años, en acuicultura (Sotomayor, 2009). Sin embargo, en la selección de una bacteria probiótica sigue siendo importante el aislamiento de cepas de la región donde se empleará, y si fuera posible, aislarla del propio organismo al cual se le administrará o en su defecto de organismos estrechamente relacionados filogenéticamente (Verschuere, 2000). Este criterio se basa en razones ecológicas que toman en consideración el hábitat original de la cepa bacteriana seleccionada (Farzanfar, 2006). Lo anterior es importante porque las bacterias presentes en el medio acuático influyen la composición de la microbiota presente en el intestino y viceversa. Los géneros que pueden sobrevivir y multiplicarse en el tracto digestivo generalmente son aquellos presentes en el medio o en la dieta (Cahill, 1990). En este trabajo se realizó una caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas de camarón café para detectar aquellas con posible potencial probiótico, capaces de combatir la enfermedad de la mancha blanca y la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética en *L. vannamei*.

Los resultados de la prueba de hidrofobicidad muestran una diferencia en color de los aislados cultivados en medio MRS adicionado con rojo congo, todos los aislados resultaron ser positivos en la incorporación del colorante. Esto se debe a que el rojo congo, además de servir como un indicador de hidrofobicidad, también es un indicador de pH. Su rango de viraje va de un color azul-violeta ($\text{pH} < 3$), al color rojo ($\text{pH} > 5$), pasando por distintas tonalidades de azul, violeta y rosa (Dorland, 2005). Los aislados que formaron colonias rosas en el medio, son bacterias que lo acidifican a $\text{pH} 4.5$, lo que ocasiona un ligero vire en el color del indicador, a diferencia de los otros aislados, que mantienen el color rojo, ya que presentan pH por arriba de 5. De haber obtenido aislados rojo congo negativos, se hubieran observado colonias translúcidas o blancas, incapaces de incorporar el colorante (Surgalla y Beesley, 1969).

La hidrofobicidad detectada en los aislados presuntivos de BAL representa un indicio de la capacidad de adherencia de éstas. La adhesión y colonización transitoria o

permanente del tracto digestivo por un probiótico es necesaria para que éste pueda ejercer sus efectos favorables sobre el hospedero. Hasta el momento, con los resultados positivos para la prueba de rojo congo, las bacterias tienen lo necesario para unirse de manera inespecífica, débil y reversible al epitelio del intestino del camarón, mediante interacciones hidrofóbicas. De no existir moléculas hidrofóbicas en la superficie de las bacterias, éstas y el epitelio se repelerían puesto que ambos poseen carga negativa. De manera que dichas moléculas contrarrestan las fuerzas de repulsión, permitiendo que las bacterias se acerquen al epitelio y establezcan otro tipo de interacciones (adhesina-receptor) para una unión más fuerte, específica e irreversible (An y Friedman, 2000; Rinkinen, 2004).

El ácido láctico producido por las BAL al fermentar los azúcares es capaz de desnaturalizar la caseína (Ingraham e Ingraham, 1997). Esta proteína de la leche, se mantiene soluble gracias a la formación de micelas cargadas negativamente, que además de contener los cuatro tipos de caseína, contienen calcio, fosfato, citrato y magnesio. Al entrar en contacto con soluciones ácidas, por debajo de un pH 4.6, la carga negativa de la micela se neutraliza, y la proteína se precipita (Guo *et al.*, 2003; Macarulla y Goñi, 2008). Es por ello que al adicionar los sobrenadantes ácidos del cultivo de las BAL, al medio enriquecido con leche descremada, se forman halos de degradación que están dados por la acidez y no por la existencia de proteasas en el sobrenadante. Si observamos la tabla 3, podemos notar que los aislados que formaron halo de degradación son aquellas cuyo sobrenadante tenía un pH de 4.5, mientras que los aislados con pH 5.5, no formaron halo. Al neutralizar el pH de los sobrenadantes se elimina el efecto de éste sobre la proteína y es posible identificar los aislados que poseen actividad proteolítica extracelular.

Los resultados negativos en la prueba de hidrólisis de Tween 80 fueron los esperados ya que la literatura señala que la actividad lipolítica de las BAL es mínima o nula. Meyers *et al.* (1996) estudiaron la actividad lipolítica extracelular e intracelular de 100 diferentes BAL. Encontraron que ninguna cepa poseía actividad lipolítica extracelular y solo 29 cepas tenían actividad lipolítica intracelular, pero significativamente menor a la reportada para otros microorganismos como *Pseudomonas spp.* y *Candida spp.*

Los resultados de la identificación molecular utilizando la secuenciación del gen ribosomal 16S mostraron porcentajes de identidad entre 90 y 98% para el género

Pediococcus, mientras que con la secuenciación de los genes 23S y 5S, con el oligonucleótido interno KP23S-F1, cinco aislados mostraron porcentajes de identidad de 100% con la especie *Pediococcus pentosaceus*. La implementación de oligonucleótidos internos en la secuenciación presenta ventajas con respecto a los oligonucleótidos de PCR (extremos) como la eliminación de señales secundarias y aumento en la eficiencia de secuenciación (Forbes *et al.*, 2007). Utilizando el oligo KP23S-F1 se lograron obtener cinco secuencias legibles sin degradación en los extremos y se obtuvo la secuencia de la región espaciadora intergénica (ISR) la cual es una región altamente polimórfica con la cual se logra diferenciar entre especies de un mismo género e incluso cepas de una especie (Rumpf *et al.*, 1999).

P. pentosaceus ha sido utilizada exitosamente como probiótico en ratas (Jonganurakkun *et al.*, 2008), cerdos (Casey *et al.*, 2007), entre otros. En acuicultura se ha utilizado la especie *P. acidilactici*, obteniendo buenos resultados en cuanto a la supervivencia, respuesta antioxidante, estrés oxidativo, biomasa y resistencia a *Vibrio nigripulchritudo* (Castex *et al.*, 2008; Castex *et al.*, 2009).

Los aislados 37, 38 y 39 registraron alta homología con la especie *Staphylococcus haemolyticus* (99%), especie que a pesar de no estar considerada dentro del grupo de las BAL produce ácidos orgánicos como el ácido láctico, derivados de la fermentación de los azúcares (Schleifer y Kloos, 1975). Ésta y otras características del género como su morfología celular y colonial, carácter Gram y sobre todo su capacidad de crecer en medios selectivos para BAL permitieron que estos aislados se consideraran inicialmente como BAL.

El género *Staphylococcus* está representado por 37 especies de las cuales al menos 12 son comensales humanos que pueden volverse patógenos como *S. epidermidis* y *S. aureus* (Tow y Cowan, 2003). La especie *S. haemolyticus* no es considerada como una de las especies más patogénicas del género, sin embargo, existen reportes de septicemias nosocomiales provocadas por cepas de esta especie, facilitadas por la alteración de las barreras naturales, la invasión del torrente circulatorio o la inhibición de la inmunidad (Sloos *et al.*, 2000). Como el nombre de la especie lo indica, *S. haemolyticus* usualmente posee actividad hemolítica en menor medida y poco relacionada con el tipo de hemólisis producida por las especies patógenas del género (*S. aureus*) (Schleifer y Kloos, 1975).

En acuicultura se utilizan como probióticos bacterias de géneros que agrupan algunas especies patógenas tanto para el organismo en cultivo (peces, camarones, etc.) como para el hombre, sin conocerse reportes negativos en cuanto a producción o repercusiones en la salud humana. Algunos de estos géneros son *Pseudomonas* (Gram *et al.*, 1999; Chythanya *et al.*, 2002; Alavandi *et al.*, 2004), *Vibrio* (Austin *et al.*, 1995; Gatesoupe, 1997; Alavandi *et al.*, 2004), *Aeromonas* (Gibson *et al.*, 1998; y *Streptococcus* (Lara- Flores *et al.*, 2003).

Los aislados de *S. haemolyticus* aquí reportados presentaron actividad gamma hemolítica lo que reduce sus factores de virulencia. Sin embargo, su utilización como probióticos en un futuro en el grupo de trabajo deberá considerarse.

Si bien las especies reportadas en esta investigación no son consideradas netamente marinas, éstas han sido aisladas de sedimentos y agua de origen estuarino y marino, así como de organismos costeros. *Pediococcus pentosaceus* es una especie que generalmente habita en material vegetal, quesos y carne, sin embargo, se ha reportado su aislamiento de intestino de camarón tigre (*Penaeus monodon*), pez damisela (*Dascyllus aruanus*), salmonete rojo (*Parupeneus cinnabarinus*), langostino o camarón resbaloso (*Metapenaeus ensis*), mejillón verde (*Perna viridis*), entre otros (Bundin *et al.*, 2008).

Así mismo *Staphylococcus haemolyticus* es una bacteria presente en la piel del hombre y otros animales de sangre caliente. Sin embargo, ésta y otras especies del género como *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. hominis* y *S. epidermidis*, han sido aisladas de ambientes y animales costeros en todo el mundo (Gunn y Colwell, 1983; Harakeh *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009). Ferguson-Wood (1952) afirma que los estafilococos son abundantes en estuarios pero no en agua marina (mar abierto). Lee *et al.* (2006) explican esta relación con la cercanía de estas aguas a la costa lo cual puede influenciar la presencia de bacterias halotolerantes o halofílicas facultativas en el mar, que son transportadas por el viento, agua, animales, desechos, etc. Por otro lado, estudios como el realizado por Tolba *et al.* (2008) reportan que *Staphylococcus aureus* puede sobrevivir por más de 14 días en cuerpos de agua marina y dulceacuícola. Harakeh *et al.* (2006) aislaron diferentes especies de estafilococos principalmente *S. aureus* y *S. saprophyticus* de agua marina (7.4×10^3 UFC por cada 100 mL), agua dulce (6.3×10^3 UFC por cada 100 mL) y cangrejos costeros (3.1×10^3 UFC por cada 100 mL). Sus resultados los llevaron a concluir que los altos niveles de estas especies en

las zonas analizadas comprueban su capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales severas y resaltaron la interacción de los organismos costeros con estos microorganismos, especialmente los organismos filtradores. Lee *et al.* (2009) realizaron un estudio de diversidad bacteriana en las aguas costeras de Malasia donde encontraron tres especies del género *Staphylococcus*; *S. haemolyticus*, *S. cohnii* y *S. pasteurii*, así como otras especies de origen terrestre.

A pesar de la falta de estudios bacteriológicos en las zonas costeras del estado de Sinaloa, se sabe que estas están altamente influenciadas por la actividad antropogénica por lo cual es posible la presencia de bacterias terrestres como *Pediococcus pentosaceus* y *Staphylococcus haemolyticus* en las aguas costeras del estado, que sirven como sitios de alimentación para juveniles de camarón blanco. La flora intestinal de los animales acuáticos es un reflejo de la flora presente en el ambiente (Shakila *et al.*, 2006), de tal manera que si ambas especies bacterianas cohabitan con el camarón es muy probable encontrarlas en su intestino. Los géneros más comúnmente reportados en la microflora intestinal de invertebrados acuáticos como crustáceos, moluscos y equinodermos son *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Aeromonas* (Harris, 1992). Otros géneros se reportan en menor medida como *Plesiomonas*, *Hafnia*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus* (Shakila *et al.*, 2006). Sugita *et al.* (1987), reportaron la presencia de *Staphylococcus* sp. en la microflora intestinal de los cangrejos *Atergatis floridus*, *Pachygrapsus crassipes*, *Thalamita prynna*, *Plagusia dentipes* y *Tiarinia cornigera*, así como en la langosta espinosa japonesa (*Panulirus japonicus*). Shakila *et al.* (2006), reportaron el aislamiento de *Staphylococcus* sp. del intestino de camarón tigre (*Penaeus monodon*), representando el 16% de la flora total.

Los criterios de selección de las bacterias con potencial probiótico varían dependiendo del autor del cual se hable. Algunos autores aseguran que la producción extracelular de enzimas como proteasas y lipasas ayudan a la nutrición del hospedero (Moriarty, 1999; Farzanfar, 2006; Balcazar *et al.*, 2006), mientras que otros consideran que la producción excesiva de estas enzimas es un factor de patogenicidad puesto que las cepas patógenas presentan una alta actividad proteolítica, lipolítica y hemolítica extracelular (Quesada *et al.*, 2004). Es por ello que se decidió probar dos grupos de cuatro aislados de BAL presuntivas, uno de ellos con baja actividad proteolítica y otro sin dicha actividad en camarones coinfectados con WSSV e IHHNV.

La adición de las bacterias al alimento es uno de los pasos más importantes en la evaluación de un aislado con potencial probiótico ya que la adhesión y viabilidad del mismo pueden verse afectados. Las BAL, a diferencia de *Bacillus*, no resisten altas temperaturas por lo que su adición al alimento debe ser posterior al procesamiento del mismo y a temperatura ambiente (Apún-Molina *et al.*, 2009). En este estudio, la adhesión se llevó a cabo por aspersion utilizando el aditivo y adhesivo Dry Oil (DO), consiguiendo una buena adhesión de las bacterias al alimento como lo indican los conteos de células viables. La viabilidad de los aislados se analizó durante 5 días, obteniendo pérdidas del 12.23% al 37.98%, bajo condiciones de refrigeración (4 °C). Resultados similares han sido reportados con distintos géneros bacterianos y adherentes en distintos organismos de cultivo. BAL adheridas con DO al alimento para la tilapia *Oreochromis niloticus* (Apún-Molina *et al.*, 2009), *Bacillus* adheridos con agua destilada estéril al alimento para langostino *Macrobrachium rosenbergii* (Deeseenthum *et al.*, 2007) y BAL adheridas con aceite de sardina al alimento para el camarón *Penaeus indicus* (Ajitha *et al.*, 2004).

En un principio se pretendía trabajar con organismos libres de patógenos; sin embargo, la ubicación de un lote con estas características no fue posible. El trabajar con postlarvas libres de WSSV e IHHNV en el laboratorio es prácticamente imposible ya que no existen instalaciones adecuadas, además los organismos crecen muy lento. Khadijah *et al.* (2003) mencionan que debido a la naturaleza altamente infectiva de WSSV es muy difícil establecer poblaciones de camarones libres de patógenos. En su estudio comprobaron la latencia de WSSV en organismos de *Litopenaeus vannamei* que se creían libres de patógenos e identificaron 3 genes relacionados con este fenómeno. Estos organismos cargan ADN viral en bajas cantidades solo detectables por técnicas moleculares sensibles y no desarrollan signos de la enfermedad cuando las condiciones de cultivo son óptimas, situación que cambia ante cualquier estrés. Fenómenos similares se han observado con el virus IHHNV en *L. vannamei* (Kalagayan *et al.*, 1991; Boada *et al.*, 2007). Por lo antes mencionado, se decidió trabajar con organismos asintomáticos para ambos virus y con baja carga viral para WSSV, es decir positivos solo en PCR anidado. Si bien el PCR no es una técnica cuantitativa, provee una idea de la magnitud de la carga viral en una muestra, por ejemplo, una muestra positiva en PCR anidado indica una baja carga viral y usualmente los organismos son asintomáticos, mientras que una muestra positiva en PCR sencillo indica alta carga

viral, normalmente relacionada con los síntomas de la enfermedad (Peinado-Guevara y López-Meyer, 2006).

Debido a que WSSV e IHHNV son dos de los virus más importantes que afectan la camaronicultura en el mundo, se han realizado diversas investigaciones para encontrar la manera de contrarrestar el efecto de estos patógenos en el cultivo de camarón. Algunas de las estrategias propuestas son la manipulación de la temperatura del agua (Rodríguez, 2005), el uso de inmunoestimulantes (Rodríguez, 2005), vacunas con el virus inactivado y proteínas virales (VP19 y VP28) (Vaseeharan *et al.*, 2006; Johnson, 2008), ARN de interferencia (Xu *et al.*, 2007) y probióticos (Li, 2009; Peraza-Gómez *et al.*, 2009; Aguayo *et al.*, 2009).

En el primer experimento del presente trabajo se encontró que las bacterias probadas disminuyen la prevalencia de WSSV en camarones portadores. Sin embargo, a pesar del resultado positivo para WSSV, la prevalencia de IHHNV en los camarones del grupo control fue igual que en los tratados con las BAL presuntivas al final del experimento. Estos resultados sugieren que ambas mezclas bacterianas a las diferentes dosis utilizadas (1×10^6 UFC g^{-1} y 2×10^6 UFC g^{-1}) actúan disminuyendo la prevalencia de WSSV en camarones blancos asintomáticos, no así para IHHNV. Aún no se conoce el mecanismo exacto que utilizan las bacterias probadas para prevenir y/o combatir infecciones virales; sin embargo, se tienen reportes de su efectividad en diversos organismos entre ellos el hombre. Maragkoudakis *et al.* (2010) demostraron un efecto protector de *Lactobacillus rhamnosus* y *L. casei* Shirota contra rotavirus y el virus de la gastroenteritis transmisible y una notable actividad antiviral de *Enterococcus faecium*, *L. fermentum*, *L. pentosus* y *L. plantarum* contra estos virus en líneas celulares intestinales y de macrófagos de cerdos, cabras, ovejas y del hombre. Ellos sugieren que parte de este efecto antiviral se debe a un incremento en la producción de peróxido de hidrógeno y la capacidad de adhesión de las BAL; sin embargo, no descartan que existan otros mecanismos involucrados. Estudios de la microflora vaginal sugieren que la producción de ácido láctico por parte de las BAL afecta la supervivencia y adhesión de algunos virus tales como el virus del papiloma humano y el virus de la inmunodeficiencia humana (Misic *et al.*, 2005). Li *et al.* (2009) demostraron que la cepa probiótica *Bacillus* OJ utiliza la inmunoestimulación y exclusión competitiva en el combate de WSSV en camarón blanco. Peraza-Gómez (2008) sugiere que la disminución en la prevalencia de WSSV puede deberse a una inmunoestimulación

manifestada con un aumento en el número de hemocitos. Es posible que algunos de los mecanismos mencionados hayan intervenido en la infección de WSSV en camarones; sin embargo, se requieren más estudios para elucidar los mecanismos que utilizan las BAL para contrarrestar esta infección y proponer una explicación del porque éstas fueron efectivas contra WSSV y no contra IHHNV.

La amplificación del gen GAPDH valida los resultados negativos en la detección de ambos virus. Este gen ya ha sido usado previamente con el mismo propósito que se usó en esta investigación, obteniendo los mismos resultados aquí mencionados (Esparza-Leal, 2009).

En los camarones, como en otros invertebrados, los hemocitos son un parámetro inmunológico no específico importante y puede ser utilizado como un marcador de salud ya que sus cambios están correlacionados con infecciones y variaciones ambientales. La infección con WSSV provoca una disminución en el número de hemocitos circulantes, puesto que son células blanco para el virus (Van de Braak *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009). Respaldando lo mencionado anteriormente, Le Moullac *et al.* (1998) mencionan que los individuos que tengan en circulación una alta cantidad de hemocitos resistirán mejor la presencia de un patógeno. En este experimento el número de hemocitos en los organismos de los tratamientos con BAL fue mayor con respecto al control, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas.. Resultados similares han sido reportados con *Halomonas* sp. en *Fenneropenaeus chinensis* (Zhang *et al.*, 2009), *Vibrio alginolyticus* en *L. vannamei* (Espinosa-Ortega, 2003) y lactococos y levaduras en *L. vannamei* (Peraza-Gómez *et al.*, 2009).

El propósito del segundo experimento era determinar la frecuencia de aplicación del alimento adicionado con las bacterias en la supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV e IHHNV. Se sabe que la eficacia de un probiótico no depende solamente de su mecanismo de acción sino de otros factores como el uso de cepas probióticas compatibles a la especie, dosis y frecuencia de administración (Bomba *et al.*, 2002). Es indispensable manejar la dosis y frecuencia de aplicación ya que una excesiva inmunoestimulación del organismo podría causar un desgaste del sistema inmune reduciendo la actividad fenoloxidasa, actividad antibacteriana, número de hemocitos circulantes y proteínas plasmáticas encargadas de la defensa del organismo (Aguayo *et al.*, 2009; Sajeevan *et al.*, 2009).

El experimento se inició con un lote de camarones de granja con un 100% de prevalencia para WSSV y 26.6% de prevalencia para IHHNV. Sin embargo, al final del mismo, todos los tratamientos registraron una baja en la prevalencia de ambos virus. El tratamiento 1 (Control) registró una prevalencia de 16.6% para WSSV y 8.3% para IHHNV, mientras que los tratamientos 2, 3 y 4 registraron prevalencias de 3.3% y 3.3%, 33.3% y 16.6%, 25% y para WSSV e IHHNV, respectivamente. Casos como estos han sido reportados en otros cultivos de *L. vannamei* en el laboratorio. Peraza-Gómez *et al.* (2009) reportaron una disminución considerable en la prevalencia de WSSV en todos los tratamientos, los cuales registraron una prevalencia de 50% al iniciar experimento y 0% al final del mismo. Esta situación puede ser explicada por las condiciones ambientales adversas (excesiva precipitación) registradas los días anteriores a la llegada del lote de organismos a las instalaciones del laboratorio. Es bien sabido que condiciones ambientales estresantes conllevan a un decremento en la inmunocompetencia de los camarones, generando una situación donde el virus puede replicarse rápidamente (Walker, 2007; Souto-Cavalli *et al.*, 2008). Las respuestas del estrés frente a las fluctuaciones ambientales se ven reflejadas en la composición de la hemolinfa, principal componente que participa en el mecanismo de defensa de los crustáceos. Por lo tanto, el estrés ambiental afecta la habilidad inmune y el desempeño metabólico de camarones haciéndolos más susceptibles a infecciones (Joseph y Philip, 2007). Decrementos abruptos de la salinidad del agua, ocasionados principalmente por lluvias, pueden desencadenar una infección viral o la aparición de signos clínicos, los cuales desaparecen junto con el estrés (Souto-Cavalli *et al.*, 2008). En este caso, las lluvias registradas los días anteriores a la llegada de los organismos al laboratorio generaron estrés en los organismos, lo que desencadenó la replicación viral dando resultados positivos en la PCR para ambos virus.

Los parámetros fisicoquímicos como temperatura, salinidad y oxígeno disuelto juegan un papel importante en la biología de los crustáceos (Allan *et al.*, 2006). En 1994 Brock y Main establecieron los parámetros fisicoquímicos óptimos para el cultivo de camarón, los cuales son: oxígeno disuelto de 4.0 a 10.0 mg/L; pH de 8.1 a 9.0; temperatura de 23 a 30 °C y salinidad 15 a 35 ‰. Tomando como referencia lo anterior, durante ambos experimentos, los parámetros fisicoquímicos, con excepción de la salinidad, se mantuvieron dentro de los rangos óptimos para el cultivo de camarón. Los factores ambientales también repercuten en las infecciones virales. Se sabe que la

temperatura juega un rol importante en la replicación viral de WSSV (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2006, 2007; Du *et al.*, 2008) e IHHNV (Montgomery-Brock *et al.*, 2006). Rahman *et al.* (2007) probaron que mantener el cultivo de camarón a 33 °C es efectivo para prevenir WSSV, reducir la mortalidad y bloquear la replicación de WSSV en *L. vannamei*. Otros estudios reportan que la replicación de WSSV también se ve afectada a bajas temperaturas. Jiravanichpaisal *et al.* (2006) demostraron que la replicación de WSSV en células hematopoyéticas de *Pacifastacus leniusculus* se ve afectada a temperaturas por debajo de los 16 °C y sugieren que el virus se replica eficientemente a temperaturas por arriba de 16 °C, pero menores de 32° C. Du *et al.* (2008) midieron la replicación de WSSV en el langostino *Procambarus clarkii*, cultivado a dos temperaturas (10 °C y 24 °C), y observaron que la replicación fue mayor en los organismos cultivados a 24 °C, mientras que a 10 °C sólo se observó una atenuación del proceso. Al igual que en WSSV, la replicación de IHHNV en *L. vannamei* disminuye a temperaturas altas (32 °C) (Montgomery-Brock *et al.*, 2006). La temperatura promedio obtenida en el experimento I fue de 26.63 ± 0.49 °C y en el experimento II fue de 25.35 ± 1.97 °C. Estos valores se encuentran dentro de las temperaturas de replicación eficiente reportadas para ambos virus, por lo que la disminución de la prevalencia en el experimento II se atribuye a factores estresantes previamente discutidos y no al efecto de las bajas temperaturas alcanzadas (23-24 °C).

IX. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 40 aislados presuntivos de BAL del intestino de camarón café silvestre (*Farfantepenaeus californiensis*). Sólo se caracterizaron 20 aislados, de los cuales 12 presentaron potencial probiótico.
- Se determinó que cinco de los ocho aislados evaluados pertenecían a la especie *Pediococcus pentosaceus* y tres a la especie *Staphylococcus haemolyticus*.
- Las mezclas de BAL (*Pediococcus pentosaceus*) y *Staphylococcus haemolyticus* evaluadas no causaron inmunoestimulación, respecto al número de hemocitos, en los camarones tratados.
- Las dos mezclas de BAL (*Pediococcus pentosaceus*) y *Staphylococcus haemolyticus*, en las concentraciones evaluadas, disminuyeron la prevalencia de WSSV en camarones cultivados en laboratorio. No se observó el mismo efecto para IHHNV.
- No se logró determinar la frecuencia de aplicación del alimento adicionado con la mezcla bacteriana para disminuir la prevalencia de WSSV e IHHNV.

X. ANEXOS

Secuencias obtenidas del gen 16S ADNr

Aislado 28

Oligonucleótido de secuenciación; 27f

TGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTA CT TGTACTGATTGAGATTTTAAACACG
AAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGG
AAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCT
ATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTG
ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACC
CAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTG
AAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAG
TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCT
GNCTGGTCTGCAACTGACNCTGANTCTCCAAAGCATGGGTAGCNAACA

Aislado 28

Oligonucleótido de secuenciación; 1492r

GCTAGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGAC
TTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCTACAGTCCGAAGTGAAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTTAACCT
CGCGGTCTCGGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCAT
GATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAAC
TTAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCAATTCTGTCCCCGAAGGGAACCTCTAATCTCTTAGA
CTGTGAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTTCGCGTAGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCA
CCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTTGAAGTTTCAACCTTGCGGTCGTA

Aislado 29

Oligonucleótido de secuenciación; 27f

TGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTA CT TGTACTGATTGAGATTTTAAACACG
AAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGG
AAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCT
ATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTG
ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACC
CAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTG
AAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAG

TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
GTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCNGTGCTGCAGCTAAC
GCATTANGTAA

Aislado 29

Oligonucleótido de secuenciación; 1492r

GCTAGCTCCTAAAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGAC
TTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAACCTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTTAACCT
CGCGGTCTCGGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCAT
GATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAAC
TTAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACCTCTAATCTCTTAGA
CTGTCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCA
CCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCAGGCGGA
TTACTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACTTAGTAATCATCGTTT
ACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGT
TGCAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACA
CATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCATGCACTTCTTCGGTTGAG
CCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGAT
AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCGTGGCTTTCTGGTTAATA
CCGTCACTGGGTAAACAGTTACTCTTACCCACGTTCTTC

Secuencias obtenidas de los genes 23S y 5S ADNr

Aislado 20

Oligonucleótido de secuenciación; P23S_F1

GTTAAGTTATAGNGGGCGNGNGTGTNTTAAAGCGTNNATANGGGGATTTCCGAATGGGGCAACC
CAATATTTTTAATCGACTATTATCCGCATCTGAATACATAGGATGTGTGAAGGTAAACGTGGGGA
ACTGAAACATCTCAGTACCCGCAGGAACAGAAAGAAAATTCGATTCCCTGAGTAGCGGCGAGCGA
AACGGGAAGAGCCCAAACCAGGAAGCTTGCTTCCCTGGGGTTGTAGGACTGAACCTTGAGGTTACC
AAAGAACTTGATAGCTGAAGAATCTGGGAAGATTCCGAGAGAGGGTGATAGCCCCGTAAGTTAA
ATCAAGTTCTCTCAGTTCAGGATCCTGAGTACGGCGGAGCACGTGAAATTCGTCGGAATCCGGG
AGGACCATCTCCCAAGGCTAAATACTACCTAGTGACCGATAGTGAACCAGTACCGTGAGGGAAAG
GTGAAAAGCACCCCGGAAGGGGAGTGAAATAGTTCCCTGAAACCATGTGCCTACAAGAAGTCAGAG
CCCGTTAATGGGTAATGGCGTGCCTTTTGTAGAATGAACCGGCGAGTTACGTTTCGTATGCCAGGT
TAAGTTGAAGAGACGGAGCCGAAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATATAAGTATGCCGATGT
AGACCCGAAACCAAGTGACCTACCCATGTCCAGGTTGAAGGTGCAGTAAAATGCACTGGAGGACC
NAACTCGTGTACNTTGAAAAGTGCTGAGATGAGGTGTGGGTAGCGGTGAATTTCCAAACGAACTT
GGANATAGNTGGTTCTCTCCNAAATANCTTTAGGGCTANCCTCNAATTANGATCGTGGANGTAGA
GCCACTGTTTGGACTAGGGGCCCATCAAGGGTTACCNAAATCNAATAANCTCCNAAATGCCATCNN
TTATGTCCGGGAGTC

Aislado 20

Oligonucleótido de secuenciación; P5S_R

CTTTTGTTCCTCGCGGACTGAACAATATCTATTTTTTTCCTTCGGATTCAACCANTTCTACTTGGTT
AAGTCCTCGACCGATTAGTACTAGTCCGCTCCATGTATCACTACACTTCCACTTCTAGCCTATCT
ACCTGATCATCTTTCAGGGGTCTTACTTGCCCAAAGGCAATGGGAAATCTAATCTCGAGGTGAGT
TTCACACTTAGATGCTTTCAGCGTTTATCTCATCCACACATAGCTACCCAGCGATGCTCCTGGCG
GAACAACCTGGTACACCAGCGGTGTGTCCATCCCGGTCCTCTCGTACTAAGGACAGCGCCTCTCAA
ATTTTCCTACGCCCGCGACGGATAGGGACCGAACTGTCTCACGACGTTCTGAACCCAGCTCGCGTA
CCGCTTTAATGGGCGAACAGCCCAACCCTTGGGACCGACTACAGCCCCAGGATGCGATGAGCCGA
CATCGAGGTGCCAAACCTCCCCGTCGATGTGAACTCTTGGGGGAGATAAGCCTGTTATCCCCAGG
GTAGCTTTTATCCGTTGAGCGATGGCCCTTCCATACGGTACCACCGGATCACTAAGCCCGACTTT
CGTCCCTGCTCGACCTGTCTGTCTCGCAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTTTACACTCTACGAATGAT
TTCCAACCATTCTGAGGGAACTTTGGGCGCTCCGTTACTCTTTAGGAGGCGAGCGCCCCAGTC
AAACTGCCACCAGACACTGTCTCCCGCCACGATTAGTGGCGCGGGTTAGAGGGTTCATACAACG
AGGGTAGTATCCCACCATTGCCTCTCCGAAACTAGCGTTCGGATTCTACGGCTCCTACCTATCC
TGTACAGCTGTACAACACTCAAANNAGTNCAGTAAAGC

Aislado 20

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGGCGCTGTCCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACACACCGCTGGTGTACCAGTT
GTTCCGCCAGGAGCATCGCTGGGTAGCTATGTGTGGATGAGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTG
TGAAACTCACCTCGAGATTAGATTTCCCATTCGCTTCGGGCAAGTAAGACCCCTGAAAGATGATC
AGGTAGATAGGCTAGAAGTGGAAAGTGTAGTGATACATGGAGCGGACTAGTACTAATCGGTGAGG
ACTTAACCAAGTAGAAGTGGTTGAATCTCGAAGGAAAAAATAGATATTGTTTCAGTTTTGAGAGAA
CAAAGTTTTTCTCAAGTGATAACGTAAGTTAGCACAGAGTGTGGTGACGATAGTGAGAAGGATAT
ACCTGTTCCCATGTGGAACACAGAAGTCAAGCTTCTTAACGCCGAGAGTAGTTGGGGGATCGCCC
CCTGCGAGGGTA

Aislado 28

Oligonucleótido de secuenciación; P23S_F1

TGACACCGATATGCCTCGGGGAGCTGTAAGTAAGCTTTGATCCGGGGATTTCCGAATGGGGCAAC
CCAATAGTTTTAATCGACTATTATCCGCATCTGAATACATAGGATGTGTGAAGGTAAACGTGGGG
AACTGAAACATCTCAGTACCCGCAGGAACAGAAAGAAAATTCGATTCCCTGAGTAGCGGCGAGCG
AAACGGGAAGAGCCCAAACCAGGAAGCTTGCTTCCCTGGGGTTGTAGGACGNTGCCATGCAGTTGC
CAAAGAACTTGATAGATGAAGAATCTGGGAAGATTCGCCAGAGAGGGTGATAGCCCCGTAAGTTA
AATCAAGTTCTCTCAGTTCAGGATCCTGAGTACGGCGGAGCACGTGAAATTCGTCGGAATCCGG
GAGGACCATCTCCAAGGCTAAATACTACCTAGTGACCGATAGTGAACCAGTACCCTGAGGGAAA
GGTGAAGAGCACCCCGAAGGGGAGTGAATAGTTCCCTGAAACCATGTGCCTACAAGAAGTCAGA
GCCCCGTTAATGGGTAATGGCGTGCCTTTTGTAGAATGAACCGGCGAGTTACGTTTCGTATGCCAGG
TTAAGTTGAAGAGACGGAGCCGAAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATATAAGTATGCCGATG
TAGACCCGAAACCAAGTGACCTACCCATGTCCAGGTTGAAGGTGCAGTAAAAATGCACTGGAGGA
CCGAACCTCGTGTACGTTGAAAAGTGTGAAATGAGGTGTGGGTAGCGGTGAAATTCNAACNAAC
TTGGANATANCTGTTCTCTCCGAAATANCTTTAGGGCTACCCCTCNAATTATGANCTGGAGGTA
GAANC

Aislado 28

Oligonucleótido de secuenciación; P5S_R

CGCTGCGCCGCTACTGCAGGGAATGCGAATTTTCTTTCTGTTCCCTGCGGGTACTGAGATGTTTCA
GTTCCCCACGTTTACCTTCACACATCCTATGTATTCAGATGCGGATAATAGTCGATTAAAACAT
TGGGTTGCCCCATTTCGAAATCCCCGGATCAAAGCTTACTTACAGCTCCCCGAGGCATATCGGTG
GTAGTCCCGTCC TTCATCGGCTCCTAGTACCAAGGGATTACCATGCGCCCTTTNNAACTTAACA
AAGGCAATGGGAAATCTAATCTCGAGGTGAGTTTACACACTTAGATGCTTTTCAGCGTTTATCTCAT
CCACACATAGCTACCCAGCGATGCTCCTGGCGGAACAACCTGGTACACCAGCGGTGTGTCCATCCC
GGTCCCTCTCGTACTAAGGACAGCGCCTCTCAAATTTCTACGCCCGCGACGGATAGGGACCGAAC
TGTCTCACGACGTTCTGAACCCAGCTCGCGTACCGCTTTAATGGGCGAACAGCCCAACCCTTGGG
ACCGACTACAGCCCCAGGATGCGATGAGCCGACATCGAGGTGCCAAACCTCCCCGTCGATGTGAA
CTCTTGGGGGAGATAAGCCTGTTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGAGCGATGGCCCTTCCA
TACGGTACCACCGGATCACTAAGCCCGACTTTTCGTCCCTGCTCGACCTGTCTGTCTCGCAGTCA
AGCTCCCTTCTGCCTTTACACTCTACGAATGATTTCCAACCATTTCTGAGGGAAACCTTTGGGCGCC
TCCGTTACTCTTTTAGGAGGGCGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCACCAGACACTGTCTCCCGGCCA
CGATTAGTGGCGCGGGTTAAAGGGTTCATACACCGAGGGTAGTATCCCACCATTGCCCTCTCGA
AAACTAGCGTTCCGGATCCTCGGGCTCCTANCTAATCCTGNNAAGCTGGACAA

Aislado 28

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGCGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACACACCGCTGGTGTACCAGTT
GTTCCGCCAGGAGCATCGCTGGGTAGCTATGTGTGGATGAGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTG
TGAAACTCACCTCGAGATTAGATTTCCCATTCGCTTCGGGCAAGTAAGACCCCTGAAAGATGATC
AGGTAGATAGGCTAGAAGTGGAAAGTGTAGTGATACATGGAGCGGACTAGTACTAATCGGTGAGG
ACTTAACCAAGTAGAAGTGGTTGAATCTCGAAGGAAAAAATAGATATTGTTTCAGTTTTGAGAGAA
CAAAGTTTTTCTCAAGTGATAACGTAAGTTAGCACAGAGTGTGGTGACGATAGTGAGAAGGATAT
ACCTGTTCCCATGTGCAACACAGAAGTCAAGCTTCTTAACGCCGAGAGTAGTTGGGGGATCGCCC
CCTGCGAGGGTA

Aislado 29

Oligonucleótido de secuenciación; P23S_F1

ACGATGAGGAGGGACTAACACCGATATGCCTCGGGGAGCTGTAAGTAAGCTTTGATCCGGGGATT
TCCGAATGGGGCAACCCAATAGTTTTAATCGACTATTATCCGCATCTGAATACATAGGATGTGTG
AAGGTAAACGTGGGGAACCTGAAACATCTCAGTACCCGCAGGAACAGAAAGAAAATTCGATTCCT
GAGTAGCGGCGAGCGAAACGGGAAGAGCCCAAACCAGGAAGCTTGCTTCCTGGGGTTGTAGGNGN
TNGCCATGCACCCNTNANAGAATTTGATAGCTGAAGAATCTGGGAAGATTCGCCAGAGAGGGTGA
TAGCCCCGTAAGTTAAATCAAGTTCTCTCAGTTCAGGATCCTGAGTACGGCGGANCACGTGAAAT
TCCGTCGGAATCCGGGAGGACCATCTCCAAGGCTAAATACTACCGAGTGACCGATAGTGAACCA
GTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAGCACCCCGGAAGGGGAGTGAAATAGTTCTGAAACCATGTGC
CTACAAGAAGTCAGAGCCCGTTAATGGGTAATGGCGTGCCTTTTGTAGAATGAACCGGCGAGTTA
CGTTCGTATGCCAGGTTAAGTTGAAGAGACGGAGCCGAAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGAT
ATAAGTATGCGGATGTAGACCCGAAACCAAGTGACCTACCCATGTCCAGGTTGAAGGTGCAGTAA
AATGCACTGGAGGACCGAACTCGTGTACGTTGAAAAGTGCTGANATGAGGTGTGGGTAAGCGGTG
AAATTCCAAACGAAACTTGGAGATAGCTGGTTCTCTCCNAAATAGCTTTAGGCTAGCCTCGGAAT

TAGGATCGTGGAGGTAGAGCCNCTGTTTGGAACTAGGGGCCCATCAAGGGTTACCGAANTCNGAT
AAACTNCCNAATGCCATCGATTTATGTCCGGGAGTC

Aislado 29

Oligonucleótido de secuenciación; P5S_R

CTGTTCCCTGCGGGTACTGAGATGTTTCAGTTCCCCACGTTTACCTTCACACATCCTATGTATTCA
GATGCGGATAATAGTCGATTAAAACCTATTGGGTTGCCCATTCGGAAATCCCCGGATCAAAGCTT
ACTTACAGCTCCCCGAGGCATATCGGTGTTAGTCCCGTCCTTCATCGGCTCCTAGTACCAAGGCA
TTCACCATGCGCCCTNNNNNACTTAANNNGGCAATGGGAAATCTAATCTCGAGGTGAGTTTCAC
ACTTAGATGCTTTCAGCGTTTTATCTCATCCACACATAGCTACCCAGCGATGCTCCTGGCGGAACA
ACTGGTACACCAGCGGTGTGTCCATCCCGGTCCTCTCGTACTAAGGACAGCGCCTCTCAAATTTT
CTACGCCCGCGACGGATAGGGACCGAACTGTCTCACGACGTTCTGAACCCAGCTCGCGTACCGCT
TTAATGGGCGAACAGCCCAACCCTTGGGACCGACTACAGCCCCAGGATGCGATGAGCCGACATCG
AGGTGCCAAACCTCCCCGTCGATGTGAACTCTTGGGGGAGATAAGCCTGTTATCCCCAGGGTAGC
TTTTATCCGTTGAGCGATGGCCCTTCCATACGGTACCACCGGATCACTAAGCCCGACTTTTCGTCC
CTGCTCGACCTGTCTGTCTCGCAGTCAAGCTCCCTTCTGCCTTTACACTCTACGAATGATTTCCA
ACCATTCTGAGGGAACCTTTGGGCGCCTCCGTTACTCTTTAGGAGGCGACCGCCCCAGTCAAAC
GCCACCAGACACTGTCTCCCGCCACGATTAGTGGCGCGGGTTAGAGGGTTCATACACGAGGGTA
GTATCCCACCATTGCTCCTCCGAAACTAGCGTTCCGGATTCTACGGCTCCTACCTATCCTGNAC
AGCTGTACAACACTCAATATCAAGTTACAGTAAAGCTCCATGGGGTCTTTC

Aislado 29

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGCGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACACACCGCTGGTGTACCAGTT
GTTCCGCCAGGAGCATCGCTGGGTAGCTATGTGTGGATGAGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTG
TGAAACTCACCTCGAGATTAGATTTCCCATTCGCTTCGGGCAAGTAAGACCCCTGAAAGATGATC
AGGTAGATAGGCTAGAAGTGAAGTGTAGTGATACATGGAGCGGACTAGTACTAATCGGTCGAGG
ACTTAACCAAGTAGAAGTGGTTGAATCTCGAAGGAAAAAATAGATATTGTTTCAGTTTTGAGAGAA
CAAAGTTTTTCTCAAGTGATAACGTAAGTTAGCACAGAGTGTGGTGACGATAGTGAGAAGGATAT
ACCTGTTCCCATGTGGAACACAGAAGTCAAGCTTCTTAACGCCGAGAGTAGTTGGGGGATCGCCC
CCTGCGAGGGTA

Aislado 33

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGCGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACACACCGCTGGTGTACCAGTT
GTTCCGCCAGGAGCATCGCTGGGTAGCTATGTGTGGATGAGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTG
TGAAACTCACCTCGAGATTAGATTTCCCATTCGCTTCGGGCAAGTAAGACCCCTGAAAGATGATC
AGGTAGATAGGCTAGAAGTGAAGTGTAGTGATACATGGAGCGGACTAGTACTAATCGGTCGAGG
ACTTAACCAAGTAGAAGTGGTTGAATCTCGAAGGAAAAAATAGATATTGTTTCAGTTTTGAGAGAA
CAAAGTTTTTCTCAAGTGATAACGTAAGTTAGCACAGAGTGTGGTGACGATAGTGAGAAGGATAT
ACCTGTTCCCATGTGGAACACAGAAGTCAAGCTTCTTAACGCCGAGAGTAGTTGGGGGATCGCCC
CCTGCGAGGGTA

Aislado 34

Oligonucleótido de secuenciación; P5S_R

TTACGTTATCACTTGAGAAAANTTTTGTTCACTCANAACCTGAACAATATCTATTTTTTTCCTTNNN
GATTCAACCAATTCTACTTGNNTAAGTCCTCGACCGATTACTACTAGTCCGCTCCAGGTATCACT
ACACTTCCACTTCTAGCCTATCTACCGGATCATCTTTCAGGGTCTTACTTGCCCAAAGGCAATG
GGAAATCTAATCTCGAGGTGAGTTTTCACACTTAGATGCTTTCAGCGTTTATCTCATCCACACATA
GCTACCCAGCGATGCTCCTGGCGGAACAACCTGGTACACCAGCGGTGTGTCCATCCCGGTCTCTC
GTACTAAGGACAGCGCTCTCAAATTTCTACGCCCGCGACGGATAGGGACCGAACTGTCTCACG
ACGTTCTGAACCCAGCTCGCGTACCCTTTAATGGGCGAACAGCCCAACCCTTGGGACCGACTAC
AGCCCCAGGATGCGATGAGCCGACATCGAGGTGCCAAACCTCCCCGTGATGTGAACCTTTGGGG
GAGATAAGCCTGTTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGAGCGATGGCCCTTCCATACGGTACC
ACCGGATCACTAAGCCCGACTTTCGTCCCTGCTCGACCTGTCTGTCTCGCAGTCAAGCTCCCTTC
TGCCTTTACACTCTACGAATGATTTCCAACCATTCTGAGGGAAACCTTTGGGCGCCTCCGTTACTC
TTTAGGAGGCGACCGCCCCAGTCAAACCTGCCACCAGACACTGTCTCCCGCCACGATTAGTGGCG
CGGGTTANAGGGTTCATACACGAGGGTAGTATCCCACCATTGCCTCCTCCGAAACTAGCGTTCCG
GATTCTACGGCTCCTACCTATCCTGNACAAGCTGTACAAACACTCATATCAAGTTACAGTAAAGC
TCCATGGGG

Aislado 34

Oligonucleótido de secuenciación; P23S_F1

TGTNNTTAAAGCTTTGATCCGGGGATTTCCGAATGGGGCAACCCAATAGTTTTAATCGACTATTAT
CCGCATCTGAATACATAGGATGTGTGAAGGTAAACGTGGGGAACCTGAAACATCTCAGTACCCGCA
GGAACAGAAAGAAAATTCGATTCCCTGAGTAGCGGCGAGCGAAACGGGAAGAGCCCAAACCAGGA
AGCTTGCTTCCCTGGGGTTGTAGGACTGAACATTTGGAGTTACCAAAGAACCTTGATAGCTGAAGAAT
CTGGGAAGATTTCGCCAGAGAGGGTGTAGCCCCGTAAGTTAAATCAAGTTCTCTCAGTTCAGGAT
CCTGAGTACGGCGGAGCACGTGAAATTCCTGCGAATCCGGGAGGACCATCTCCCAAGGCTAAAT
ACTACCTAGTGACCGATAGTGAACCAGTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAGCACCCCGGAAGGGGA
GTGAAATAGTTCCCTGAAACCATGTGCCACAGAAGTCAGAGCCCGTTAATGGGTAATGGCGTGC
CTTTTGTAGAATGAACCGGCGAGTTACGTTCTGTATGCCAGGTAAAGTTGAAGAGACGGAGCCGAA
GCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATATAAGTATGCGGATGTAGACCCGAAACCAAGTGACCTAC
CCATGTCCAGGTTGAAGGTGCAGTAAAATGCACTGGAGGACCGAACTCGTGTACGTTGAAAAGTG
CTGAGATGAGGTGTGGGTAGCGGTGAAATTCCAACGAACCTTGAGATAGCTGGTTCTCTCCGAAA
TAGCTTTAGGGCTAGCCTCGGAATTAGGATCGTGGAGGTAGAGCCACTGTTTGGACTAGGGGCC
ATCAAGGGTTACCGAATTCAAATAAACTCCGAATGCCATCGATTTATGTCCGGGAGTCA

Aislado 34

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGGCGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACACACCGCTGGTGTACCAGTT
GTTCCGCCAGGAGCATCGCTGGGTAGCTATGTGTGGATGAGATAAACGCTGAAAGCATCTAAGTG
TGAAACTCACCTCGAGATTAGATTTCCATTGCCTTCGGGCAAGTAAGACCCCTGAAAGATGATC
AGGTAGATAGGCTAGAAGTGAAGTGTAGTGATACATGGAGCGGACTAGTACTAATCGGTCGAGG
ACTTAACCAAGTAGAAGTGGTTGAATCTCGAAGGAAAAAATAGATATTGTTTCAGTTTTGAGAGAA
CAAAGTTTTTCTCAAGTGATAACGTAAGTTAGCACAGAGTGTGGTGACGATAGTGAGAAGGATAT
ACCTGTTCCCATGTGCAACACAGAAGTCAAGCTTCTTAACGCCGAGAGTAGTTGGGGGATCGCCC
CCTGCGAGGGTA

Aislado 37

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACATACCTCTGGTGTACCAGTT
GTCGTGCCAACGGCATRGCTGGGTAGCTATGTATGGACGGGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCA
TGAAGCCCCCTCAAGATGAGATTTCCCAACTTCGGTTATAAGATCCCTCAGAGATGATGAGGTT
AATAGGTTTCGAGGTGGAAGCGTGGTGACACGTGGAGCTGACGAATACTAATCGATCGAAGACTTA
ATCAATTTTT

Aislado 38

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACATACCTCTGGTGTACCAGTT
GTCGTGCCAACGGCATRGCTGGGTAGCTATGTATGGACGGGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCA
TGAAGCCCCCTCAAGATGAGATTTCCCAACTTCGGTTATAAGATCCCTCAGAGATGATGAGGTT
AATAGGTTTCGAGGTGGAAGCGTGGTGACACGTGGAGCTGACGAATACTAATCGATCGAAGACTTA
ATCAATTTTT

Aislado 39

Oligonucleótido de secuenciación; KP23S-F1

GAATTTGAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACATACCTCTGGTGTACCAGTT
GTCGTGCCAACGGCATRGCTGGGTAGCTATGTATGGACGGGATAAGTGCTGAAAGCATCTAAGCA
TGAAGCCCCCTCAAGATGAGATTTCCCAACTTCGGTTATAAGATCCCTCAGAGATGATGAGGTT
AATAGGTTTCGAGGTGGAAGCGTGGTGACACGTGGAGCTGACGAATACTAATCGATCGAAGACTTA
ATCAATTTTT

XI. REFERENCIAS

- Aarnikunnas, J. 2006. Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Academic Dissertation. University of Helsinki, Department of Basic Veterinary Sciences. <https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/777/metaboli.pdf?sequence=1>
- Aguayo, D.; R. Cedeño; E. Donoso y J. Rodríguez. Uso de Probióticos y β -1,3/1,6-glucanos en la alimentación del camarón *Litopenaeus vannamei* como estrategia para incrementar la producción. 2009. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/1724/1/3407.pdf>
- Ajitha, S.; M. Sridhar; N. Sridhar; I.S.B. Singh y V. Varghese. 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus (Fenneropenaeus) indicus* (H. Milne Edwards). *Asian Fisheries Science* 17: 71-80.
- Allan, E.L.; P.W. Froneman y A.N. Hodgson. 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337(1): 103-108.
- Álvarez-Ruiz, P. 2006. Detección molecular del complejo viral WSSV, TSV e IHHNV y análisis de su coinfección en camarón blanco (*L. vannamei*) de granjas de Guasave, Sinaloa. Tesis de maestría. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.
- An, Y. y R.J. Friedman. 2000. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications. Editorial Humana. Totowa, New Jersey. XVI. 644 pp.
- Apún-Molina, J.P.; A. Santamaría- Miranda; A. Luna-González; S.F. Martínez-Díaz y M. Rojas-Contreras. 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research* 40: 887-894.
- Araya, J.; J. Ormeño y C. Díaz. 2000. Calidad hospedera de *Datura* spp. y otras solanáceas para *Lema bilineata* Germar. *Bol. San. Veg. Plagas* 26: 65-71.
- Audelo, J. y F. Montiel. 2005. Impacto económico de la presencia de TSV y WSSV en los cultivos de camarón del norte del estado de Sinaloa, México. *Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico* (PRONALSA) 3(31): 2-4.
- Austin, B.; F. Stuckey; P.A.W. Robertson; I. Effendi y D.R.W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas*

salmonicida, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18: 93-96.

- Balcázar, J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), 877-881.
- Balcázar, J.L.; I. de Blas; I. Ruiz-Zarzuela; D. Cunningham; D. Vendrell y J.L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173-186.
- Balcázar, J.L.; D. Vendrell; I. De Blas; I. Ruiz-Zarzuela; J.L. Muzquiz y O. Girones. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188–191.
- Bomba, A.; R. Nemcová; S. Gancarcíková; R. Herich; P. Guba y D. Mudronová. 2002. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition* 88: 95-99.
- Borrego, S.; M. Espinosa; M. Carballo; T. Moreira; E. Martí y A. Ramírez. 2001. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. *Biotechnología Aplicada* 18(2): 85-87.
- Brock, J. y K.L Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 242 pp.
- Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* 19: 21-41.
- Capy, P.; G. Gasperi; C. Biemont y C. Bazin. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* 85: 101-106.
- Casey, P.; G. Gardiner; N. Leonard; C. Stanton; P. Ross; G. Fitzgerald y C. Hill. 2007. Reduction of pathogen shedding and alleviation of disease signs in pigs challenged with *Salmonella typhimurium* by the application of a five-strain probiotic combination. *17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC*, Munich, Germany, 31 March - 04 April.
- Castex, M.; P. Lemairea; N. Wabetea y L. Chim. 2008. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture* 294: 305-313.
- Castex, M.; L. Chim; D. Pham; P. Lemaire; N. Wabete; J.L. Nicolas; P. Schmidely y C. Mariojous. 2009. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus*

- stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275: 182–193.
- Cedré, B.; M. Fariñas; A. Callicó; A. Moya; D. Díaz; E. Parajón; Y. Valdés; S. Sifontes; J. F. Infante; L. Izquierdo; L. García; A. Talavera; S.C. Esnard y R.L. Solís. 2007. Evaluación en animales del efecto protector de una inmunoglobulina anti *Pseudomonas aeruginosa* para uso terapéutico. *VacciMonitor* 6(1):13-16.
- CENAIM-ESPOL. 2001. Efectos combinados de las vitaminas C y E dietéticas en la inmunorespuesta del juvenil *Litopenaeus vannamei* antes y después de la suplementación con glucanos. Boletín Informativo Quincenal.
- Chang, C.I; W.Y., Liu y C.Z. Shyu. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43: 153-157.
- Chythanya, R.; I. Karunasagar e I. Karunasagar. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208: 1-10.
- CONAPESCA. 2008. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. México.
- Dorland, B. 2005. Dorland Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Medicina. 30ª Edición. Madrid, España. 2205 pp.
http://books.google.com/books?id=E3u7aczu1_cC&pg=RA2PA1716&lpg=RA2-PA1716&dq=rojo+congo+dorland+pH&source=bl&ots=R76UceYYp2&sig=ju1FI8OzfeD6T8kOA_kuH5fks&hl=es&ei=OR2bSYuQEKCeNfHAtYIM&sa=X&oi=bok_result&resnum=1&ct=result
- Du, H.; W. Dai; X. Han; W. Li; Y. Xu y Z. Xu. 2008. Effect of low water temperature on viral replication of white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Aquaculture* 277: 149-151.
- Dughetti, A. y D. De Carli. 1999. Utilización de distintos insecticidas y formulaciones en el control de *Delia spp.* en cebolla.
<http://www.inta.gov.ar/ascasubi/info/documentos/prveg/msyc/protec/utilinsectcontd elia.pdf>
- Escobedo-Bonilla, C.M.; V. Alday-Sanz; M. Wille; P. Sorgeloos; M.B. Pensaert y H.J. Nauwynck. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases* 31:1–18.

- Esparza-Leal, H.; C. Escobedo-Bonilla; R. Casillas-Hernández; P. Álvarez-Ruíz; G. Portillo-Clark; R. Valerio-García; J. Hernández-López; J. Méndez-Lozano; N. Vibanco-Pérez y F. Magallón-Barajas. 2009. Detection of white spot syndrome virus in filtered shrimp-farm water fractions and experimental evaluation of its infectivity in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 292: 16-22.
- FAO, 2002. Fishery information (year book of fishery statistics).
- Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 48: 149-158.
- Ferguson-Wood, E.J. 1952. The Micrococci in marine environment. *J. gen. Microbiol.* 6: 205-210.
- Flegel, T.W y T. Pasharawipas. 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. In: T.W Flegel (Ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 245-250.
- Forbes, A.; T.H.Q. Powell; N.F. Lobo y J.L. Feder. 2007. Resolving a DNA sequencing artifact associated with topoisomerase I generated clones in the plasmid pCR®2.1. *BioTechniques* 42: 458-462.
- Gatesoupe, F.J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquat. Living Resour.* 10(4): 239-246.
- Gram, L.; J. Melchiorson; B. Spanggaard; I. Huber y T. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 969-973.
- Gunn, B.A. y R.R. Colwell. 1983. Numerical Taxonomy of Staphylococci isolated from the marine environment. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33(4): 751-759.
- Guo, C.; B.E. Campbell; K. Chen; A.M. Lenhoff y O.D. Velev. 2003. Casein precipitation equilibria in the presence of calcium ions and phosphates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 29: 297-307.
- Harakeh, S.; H. Yassine; S. Hajjar y M. El-Fadel. 2006. Isolates of *Staphylococcus aureus* and *saprophyticus* resistant to antimicrobial isolated from the Lebanese aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* 52: 912-919.

- Harris, J.M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microb. Ecol.* 25: 195-231.
- Heng, L y W. Lei. 1998. On the ultrastructure and classification of the hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 16(4): 333-338.
- Hernández-López, J.; T. Gollas-Galván y F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113: 61-66.
- Ingraham, C.A. y J.L. Ingraham. 1997. Introducción a la microbiología. Barcelona. Editorial Reverté. 460 pp.
- Jensen, S.; O. Bergh; O. Enger; B. Hjeltnes. 2002. Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Can. J. Microbiol.* 5:379-386.
- Jiravanichpaisal, P.; Luel Lee B. y Söderhäll K. 2006 Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211(4): 213-236
- Jiravanichpaisal, P.; K. Soderhall e Irene Soderhall. 2006. Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of General Virology* 87: 847-854.
- Jonganurakkun, B.; Q. Wang; S. Hua Xu; Y. Tada; K. Minamida; D. Yasokawa; M. Sugi; H. Hara y K. Asano. 2008. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for Probiotic Use. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(1): 69–73.
- Johnson, K.; M. van Hulten y A. C. Barnes. 2008. “Vaccination” of shrimp against viral pathogens: Phenomenology and underlying mechanisms. *Vaccine* 26: 4885–4892.
- Kimura T.; K. Yamano; H. Nakano; K. Momoyama; M. Hiraoka y K. Inouye. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNAvirus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology* 31: 93-98.
- Khadijah, S.; S. Ying Neo; M.S. Hossain; L.D. Miller; S. Mathavan y J. Kwang. 2003. Identification of White Spot Syndrome Virus Latency-Related Genes in Specific Pathogen-Free Shrimps by Use of a Microarray. *Journal of Virology* 77(18): 10162–10167.

- Larkin, M.A.; G. Blackshields; N.P. Brown; R. Chenna; P.A. McGettigan; H. McWilliam; F. Valentin; I.M. Wallace; A. Wilm; R. Lopez; J.D. Thompson; T.J. Gibson y D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lee, C.W.; A. Ng; K. Narayanan; E. Sim y C.C. Ng. 2009. Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal Waters. *Ciencias Marinas* 35(2): 153-167.
- Lightner D. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV. *Journal of Applied Aquaculture* 9(2): 27-52.
- Li, J.; B. Tan y K. Mai. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 291: 35-40.
- Macarulla, J. y F. Goñi. 2008. Biomoléculas: Lecciones de bioquímica estructural. 3ra edición. Editorial Reverté. 294 pp.
http://books.google.com/books?id=WUzrV3z3NogC&pg=PA122&lpg=PA122&dq=precipitaci%C3%B3n+caseina+lecciones&source=bl&ots=tFsIYHA0BD&sig=S0GvrrC-EgHDPmZZM1A-lxMD-cU&hl=es&ei=ThubScWIO4TSMfr1tYQM&sa=X&oi=book_result&resnum=2&ct=result
- Maldonado M.; J. Rodríguez y I. de Blas. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista AquaTIC* (21): 78-91.
<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=160>
- Maragkoudakis, P.; W. Chingwaru; L. Gradisnik; E. Tsakalidou y A. Cencic. 2010. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *International Journal of Food Microbiology*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.02>
- Meyers, S.; S. Cuppett y R. Hutkins. 1996. Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology* 13(5): 383-389.
- Minor-Pérez, H. y I. Guerrero-Legarreta. 2003. Efecto de la fermentación láctica con *Staphylococcus carnosus* y *Lactobacillus alimentarius* sobre la fracción miofibrilar de proteínas de carne de cerdo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2:57-62.

- Misic, M.; G. Randelovic; B. Kocic; S. Antic; M. Stojanovic y V. Mladenovic. 2005. Complications associated with bacterial vaginosis. *Acta Fac. Med. Naiss* 22(4): 161-165.
- Montgomery-Brock, D.; A.G.J. Tacon; B. Poulos y D. Lightner. 2007. Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture* 265: 41–48.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.
- Mota, R.; J.L. Moreira; M. Souza; F. Horta; S. Teixeira; E. Neumann; J. Nicoli y A. Nunes. 2006. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnology* 6: 2.
- Page RDM. 1996. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 12: 357-358.
- Peinado-Guevara, L.I. y M. López-Meyer. 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. *Aquaculture* 251(1): 33-45.
- Peraza-Gómez, V.; A. Luna-González; A. Campa-Córdova; M. López-Meyer; J. Fierro-Coronado y P. Álvarez-Ruiz. 2009. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture Research* 40(13): 1481-1489.
- Pfannebecker, J. y J. Fröhlich. 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *International Journal of Food Microbiology* 128: 288–296.
- Quesada-Herrera A.; M. Pozo y J. Rosa-Placencia. 2004. Selección de probióticos bacterianos para su uso en el cultivo de camarón. III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Comunicación Técnica CIVA 2004 (<http://www.civa2004.org>): 97-100.
- Rabe, L. y S. Hillier. 2003. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *Journal of clinical microbiology* 41(7): 3260–3264.
- Rahman M.M.; M. Corteel; M. Wille; V. Alday-Sanz; M.B. Pensaert; P. Sorgeloos; H.J. Nauwynck. 2007. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus*

vannamei juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 272: 240–245.

Ramírez-Toro, C. 2005. Uso de bacterias lácticas probióticas en la alimentación de *Litopenaeus vannamei*, como inhibidoras de microorganismos patógenos y estimulantes del sistema inmune. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Paraná.

Rendón L. y J. L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC* (19): 27-33.

<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=158>

Rinkinen, M. 2004. Methods for assessing the adhesion of probiotic and canine gut-derived lactic acid producing bacteria to the canine intestinal mucosa in vitro and measuring mucosal secretory IgA. 97 pp.

Rodríguez, J. 2005. Efecto sobre la respuesta inmune y la supervivencia a desafíos con WSSV de la combinación temperatura inmunoestimulantes. CENAIM INFORMA. Boletín Informativo No 125.

Rodríguez J.; Y. Espinosa; F. Echeverría; G. Cárdenas; R. Román y S. Stern. 2007. Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273: 405–415.

Rodríguez-Gutiérrez M.; A. Cortés-García; D. Contreras-García; V. Ampudia-Rueda; M. L. Serrano-Islas y A. Rodríguez-Vicente. 2005. Determinación de regiones de baja y alta incidencia de enfermedades virales con problemas recurrentes en granjas camaronícolas del estado de Sinaloa. *Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico* (PRONALSA) 6(32): 1-4.

Rozen, S. y H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

Rumpf, R.; A. Griffen; B. Wen; E. Leys. 1999. Sequencing of the ribosomal intergenic spacer region for strain identification of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2723–2725.

- Sajeevan, T.P.; R. Philip y I.S. Bright Singh. 2009. Dose/frequency: A critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 287: 248–252.
- Sauer, P.; J. Gallo; M. Kesselová; M. Kolář y D. Koukalová. 2005. Universal primers for detection of common bacterial pathogens causing prosthetic joint infection. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic* 149(2): 285–8.
- Schleifer K. y W. Kloos. 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25(1): 50-61
- Serna-Cock, L. y A. Rodriguez de Stouvenel. 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5(1): 54-65.
- Sharma, K. K.; S. S. Soni y S. Meharchandani. 2006. Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Vet. Arhiv.* 76: 363-366.
- Sloos, J.H.; L. Dijkshoorn y C.P.A. van Boven. 2000. Septicaemias caused by a strain of *Staphylococcus haemolyticus* exhibiting intermediate susceptibility to teicoplanin in multiple intensive care unit patients. *J. Antimicrob Chemotherapy* 45: 410-411.
- Sotomayor, M. y J.L. Balcázar. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *Revista AquaTIC* 19: 9-15.
- Souto-Cavalli, L.; L. F. Marins; S. Netto y P. C. Abreu. 2008. Evaluation of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, Southern Brazil. *Atlântica* 30(1): 45-52.
- Spann, K.M.; R.A. Donaldson; J.A. Cowley y P.J. Walker. 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.* 42: 221– 225.
- Sugita, H.; R. Ueda; L.R. Berger y Y. Deguchi. 1987. Microflora in the gut of japanese coastal crustacea. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53(9): 1647-1655.
- Surgalla, M. y E.D. Beesley. 1969. Congo Red-Agar Plating Medium for Detecting Pigmentation in *Pasteurella pestis*. *Applied microbiology* 18(5): 834-837.

- Tang K. y D. V. Lightner. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Diseases of aquatic organisms* 44: 79–85.
- Tolba, O.; A. Loughrey; C.E. Goldsmith; B.C. Millar; P.J. Rooney y J.E. Moore. 2008. Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA) meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in river, sea and swimming pool water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211: 398-402.
- Tow, L. y D. Cowan. 2003. Non-specificity of *Staphylococcus* generic primers. *Microbiology* 149: 1605-1607.
- Van de Braak C. B. T.; M. H. A. Botterblom; E. A. Huisman; J. H. W. M. Rombout y W. P. W. van der Knaap. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 51: 149–155.
- Vaseeharan, B.; T. Prem Anand; T. Murugan y J.C. Chen. 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Letters in Applied Microbiology* 43(2): 137-142.
- Verschuere, L.; G. Rombaut; P. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 655-671.
- Vidal, O.M.; C.B. Granja; F. Aranguren; J.A. Brock y M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.* 32: 364–372.
- Vieira, F.; F. Santiago-Pedrotti; C. Buglione-Neto; J. L. Pedreira-Mouriño; E. Beltrame; M. Laterça-Martins; C. Ramirez y L. A. Vinatea-Arana. 2007. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Oceanography* 55(4): 251-255.
- Vlak, J.M.; J.R. Bonami; T. Flegel; G. Kou; D. Lightner; C. Lo; P. Loh y P. J. Walker. 2002. *Nimaviridae*: A new virus family infecting aquatic invertebrates. XIIth International Congress of Virology. Paris.
- Walker, P. 2007. Shrimp disease and health management: Key principles and current inadequacies. 8th Asian Fisheries Forum, Kochi, India. 22 de Noviembre de 2007.
- Wang, W. y X. Zhang. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 522-527.

- Xu J, F. Han y X. Zhang (2007) Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Res* 73:126–131.
- Zamora-Rodríguez, L.M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral. Universidad de Girona. Departamento de Ingeniería Química, Agraria y Tecnología Agroalimentaria. http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0711105-114345/TlZr.pdf
- Zhang, L.; K. Mai; B. Tan; Q. Ai; C. Qi; W. Xu; W. Zhang; Z. Liufu; X. Wang y H. Ma. 2009. Effects of Dietary Administration of Probiotic Halomonas sp. B12 on the Intestinal Microflora, Immunological Parameters, and Midgut Histological Structure of Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 40(1): 58-66.