

Evaluación de microbiota de las costas de Sonora y Baja California contra cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*, agentes causales de la necrosis hepatopancreática en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

K.A. Soto-Marfileño¹, L. Galaviz-Silva¹ y Z.J. Molina-Garza¹

¹ Laboratorio de Patología experimental y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

*karla.soto.mrfl@gmail.com

RESUMEN

La acuicultura se enfrenta a grandes pérdidas económicas en cultivos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) debido a las enfermedades microbianas y virales. Una de estas enfermedades es la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), la cual emergió en China en el año 2009, reportándose en México hasta el año 2013. Los agentes causales de AHPND en el camarón blanco son *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*, los cuales provocaron el 80% de las pérdidas en cultivos en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, México. Por este motivo, los objetivos de este estudio se enfocaron en identificar bacterias marinas como probióticos, capaces de inhibir a los agentes causales de AHPND. Las bacterias se aislaron de almejas, cangrejos, algas y agua marina de ecosistemas de Sonora y Baja California. Se analizó su capacidad hemolítica, degradación de celulosa y amilasa de las cepas seleccionadas, y su capacidad de inhibir a los patógenos. La identificación de las cepas probióticas se realizó con ensayos bioquímicos usando el sistema API y se confirmó mediante la amplificación del gen 16S rRNA. Se obtuvo que 10 aislados presentaron capacidad antagonista contra *V. harveyi* y se identificaron como: H3 *Aeromonas hydrophila*, mientras que los aislados J1, G10, H3 M, H2, G2, G2.1, 14 2.1, G3.2 y E 2.1 como *Bacillus pumilus*. En el caso de *V. parahaemolyticus* fueron: G2.1, H2, J1, G3.2 y E2.1. Para los ensayos de actividad hemolítica los aislados J1, G10 y E2.1 (*B. pumilus*) presentaron β hemólisis. Los aislados identificados como *B. pumilus* y *A. hydrophila* demostraron tener actividad antagonista contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* por lo que pueden ser catalogados como probióticos potenciales en base a los resultados obtenidos, los cuales contribuyen a conocer nuevas cepas benéficas para el biocontrol de estos patógenos y su aplicación permitirá evitar el uso de antibióticos en la acuicultura, reduciendo la incidencia de resistencia a estos fármacos.

Palabras clave: Probióticos, camarón blanco, AHPND, *Vibrio*.

ABSTRACT

Aquaculture faces great economic losses in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming due to microbial and viral diseases. One of these diseases is Acute Hepatopancreatic Necrosis (AHPND), which emerged in China in 2009 and was reported in Mexico until 2013. The causal agents of AHPND in white shrimp are *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*, which caused 80% of crop losses in the states of Sonora, Sinaloa and Nayarit, Mexico. For this reason, the aim of this study focused on identifying marine bacteria as probiotics, capable of inhibiting the causal agents of AHPND. The bacteria were isolated from clams, crabs, algae, and marine water from ecosystems in Sonora and Baja California. Their hemolytic ability, cellulose and amylase degradation of the selected strains, and their ability to inhibit pathogens were analyzed. The identification of the probiotic strains was performed with biochemical assays using the API system and was confirmed by amplification of the 16S rRNA gene. We obtained 10 isolates presented antagonistic ability against *V. harveyi* and were identified as: H3 *Aeromonas hydrophila*, while isolates J1, G10, H3 M, H2, G2, G2.1, 14 2.1, G3.2 and E 2.1 as *Bacillus pumilus*. In the case of *V. parahaemolyticus* were: G2.1, H2, J1, G3.2 and E2.1. For the hemolytic activity assays, isolates J1, G10 and E2.1 (*B. pumilus*) presented β hemolysis. The isolates identified as *B. pumilus* and *A. hydrophila* showed antagonistic activity against *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*, so they can be classified as potential probiotics based on the results obtained, which contribute to the knowledge of new beneficial strains for biocontrol of these pathogens and their application will avoid the use of antibiotics in aquaculture, reducing the incidence of resistance to these drugs.

Keywords: Probiotics, White shrimp, AHPND, *Vibrio*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la extensión de los ecosistemas marinos se ha reducido por las diferentes actividades que realiza el hombre (Rodríguez *et al.*, 2010). Una de ellas es la acuicultura del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, adaptándose a un buen crecimiento en cautiverio por su fácil reproducción y manejo por lo cual se ha logrado una alta producción en países asiáticos y americanos (FAO, 2018).

La camaronicultura es una actividad en México que ha adquirido un gran valor en los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Chiapas (Ramos, 1987), esta es una actividad complementaria a la pesca y no una competencia, ya que los sistemas de cultivo extensivos realizan la siembra de postlarvas y juveniles (Grijalva *et al.*, 1992).

Uno de los obstáculos más grandes para que la producción sea exitosa son las enfermedades infecciosas causadas por bacterias en cultivos del camarón blanco, una muy importante es la AHPND (Necrosis Hepatopancreática Aguda) o EMS (Síndrome de Mortalidad Temprana) ambas por sus siglas en inglés: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease/Early Mortality Syndrome; la cual es causada por dos cepas nuevas de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. harveyi*, sin embargo en los últimos años se ha tratado de investigar cómo evitar esta epizootia (Goarant *et al.*, 2006). En nuestro país esta enfermedad ha afectado a los principales estados de producción en camarón desde el 2013 (López *et al.*, 2016). La AHPND se presenta con un aumento en la mortalidad el cual se observa dentro de los 30 a 40 días de su cultivo, puede llegar a eliminar hasta el 100% de toda la población de camarones de los estanques afectados; el mecanismo de infección de la bacteria empieza con la colonización del hepatopáncreas donde se liberan toxinas que afectan este órgano (Mejías *et al.*, 2014). Desde su aparición en 2009 hasta la actualidad se han buscado diferentes formas de combatir a *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, utilizando antibióticos derivados por microorganismos los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de esta bacteria (Varela-Mejías, Peña-Navarro y Aranguren-Caro, 2017), para así también evitar el uso extensivo de antibióticos y prevenir la resistencia a estos (Santiago *et al.*, 2009). En este presente trabajo, el principal objetivo fue encontrar microorganismos provenientes de medio marino los cuales podrían presentar efecto antagónico *in vitro* contra cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras en los estados de Sonora y Baja California, México.

En el estado de Sonora fueron dos municipios: Bahía de Yavaros (26°42'17"N, 109°31'07"O) y de Guaymas (27°54'50" N, 110°54'7" O) donde los muestreos se realizaron en diferentes estaciones del año las cuales fueron verano e invierno. En el estado de Baja California se colectó en los municipios de Rosarito (32°21' 0" N, 117°3'0" O), Playas de Rosarito (32°21'N, 117°03'O) y Ensenada (31°51'28"N, 116°36'21"O), en la estación de invierno. En cada localidad se realizaron muestreos para obtener los aislados de la microbiota de ambiente acuático. La colecta se realizó de manera aleatoria de macroalgas, guano, sedimento, agua marina, organismos acuáticos. Se recolectaron en bolsas de plástico estéril Whirl-pak (Nasco, Fort Atkinson, WI) las cuales se transportaron en hielo al laboratorio para su procesamiento (Quiroz, 2005).

Caracterización morfológica, bioquímica de los aislados microbianos y ensayo de hemolisis.

De los organismos colectados de las localidades se aislaron e identificaron los distintos morfotipos de las colonias en TSA y AM al 2% de NaCl y se incubaron a 28°C por 24 horas para seleccionar las colonias de bacterias de la microbiota marina. De las colonias que se observaron crecimiento se les

realizó un aislado y caracterización en base a tinción de Gram (Babuselvan *et al.*, 2016). Las pruebas bioquímicas realizadas fueron de oxidasa (Sigma-Aldrich, Toluca, Estado de Mexico, Mexico) y catalasa con peróxido de hidrogeno al 3% (Jalmek, Monterrey, N.L., México). Se utilizó agar sangre (DIBICO, Cd. de México, México) al 5% con sangre de cordero, en las placas se sembró una colonia aislada y fresca por estría cruzada. Las placas se incubaron durante 24 h a 28 – 30°C y se registraron los patrones de hemolisis (Baron *et al.*, 1994).

Evaluación de la actividad antagonica *in vitro*

Método de estría cruzada. Se realizó a partir de un cultivo de Agar Marino y TSA de 24 h en placas de Mueller Hinton (2% NaCl) se tomó una muestra con un hisopo estéril y se sembró una estría central con la cepa a evaluar y se incubo por 24 h a 28 – 30°C. Del mismo modo se preparó una suspensión con la cepa patógena (*V. parahaemolyticus* MC32 y B25 y *V. harveyi*, Vh) y se sembraron por separado en un ángulo de 90° atravesando la zona de la bacteria candidata cuando la estría presentaba un buen crecimiento (3 a 5 mm de ancho). Posteriormente se observó la presencia o ausencia de zona de inhibición a las 24-48 h de incubación y se realizaron mediciones (Gibson *et al.*, 1998).

Identificación de las cepas con potencial antagonico por medio de biología molecular y pruebas bioquímicas.

Las cepas de bacterias fueron enviadas a la empresa Macrogen, Inc. ubicada en Korea para su secuenciación de la región 16S rRNA para su identificación de especie.

Se determinó por pruebas bioquímicas para Gram positivas con el Kit API 50 CH (Biomérieux, Francia) usando cultivos frescos de 24 horas con 1.5×10^8 UFC, 0.5 en la escala de McFarland (Molina-Garza y Galaviz-Silva, 2019).

Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas antagonicas se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas post-hoc de Tukey al 95% de confianza con el software estadístico SPSS Statistics 20 (IBM).

RESULTADOS

Identificación bioquímica y por medio de biología molecular

Las cepas con capacidad antagonica fueron enviadas a la empresa Macrogen, Inc. para su identificación por biología molecular, además se les realizó una identificación bioquímica por medio del kit API 50CH, en donde nueve de las cepas se identificó el género *Bacillus*. La cepa H3 (TSA) se identificó la especie *Aeromonas hydrophila* por el método de biología molecular, sin embargo, en el kit API 50CH no se logró reactivar la cepa por lo tanto no fue identificada como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Especies con actividad antagonista frente *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* identificadas por biología molecular y API 50CH.

| CEPA AISLADA | IDENTIFICACION POR BIOLOGIA MOLECULAR | IDENTIFICACION POR API 50CH |
|--------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| J1 | <i>Bacillus pumilus</i> | <i>B. firmus</i> |

| | | |
|-----------------|-----------------------------|-------------------|
| G10 | <i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> |
| H3 (TSA) | <i>Aeromonas hydrophila</i> | SI * |
| H3 (M) | <i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> |
| H2 | <i>B.pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> |
| G2 | <i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> |
| G 2.1 | <i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> |
| 14. 2.1 | <i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> |
| G 3.2 | <i>B. pumilus</i> | <i>B. pumilus</i> |
| E 2.1 | <i>B. alitudinis</i> | <i>B. firmus</i> |

*SI: Sin identificar.

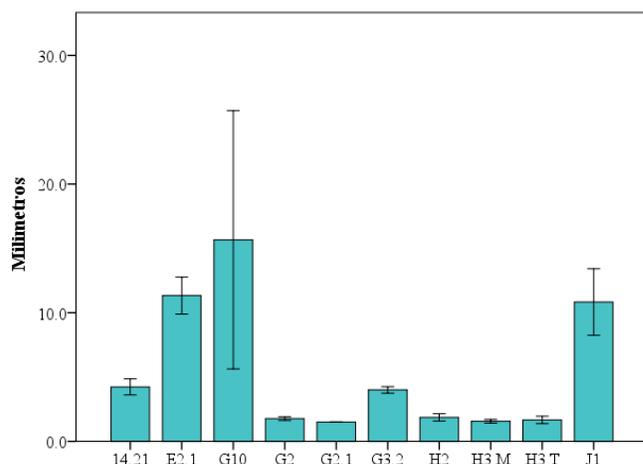


Figura 1. Resultados en mm de la actividad antagonística de las cepas aisladas de medio marino contra la cepa Vh.

Evaluación de la actividad antagonística *in vitro*

En la Figura 1 se pueden observar estas tres cepas las cuales presentaron mayor inhibición contra *V. parahaemolyticus*, la cepa G10 obtuvo un promedio de 15.6 mm, la cepa E 2.1 inhibió 11.3 mm y la cepa J1 su promedio fue 10.8 mm.

Actividad hemolítica y enzimática. Los resultados de las pruebas de actividad hemolítica y enzimática se les realizó a las cepas con mayor promedio de actividad antagonística (J1, G10 y E 2.1) como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad hemolítica y enzimática de las cepas antagonísticas.

| CEPA AISLADA | ACTIVIDAD HEMOLITICA | PROTEASAS | AMILASAS | QUITINASA | CELULOSA |
|--------------|----------------------|-----------|----------|-----------|----------|
| J1 | β | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| G10 | β | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| E 2.1 | β | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |

DISCUSIÓN

Las bacterias aisladas de esta investigación provinieron de sedimento y agua marina, además de organismos como cangrejos ermitaños (*Clibanarius paramensis*) y algas verdes (*Enteromorpha* sp. y *Rhizoclonium* sp.). Se ha reportado el uso de microorganismos con potencial antagonico contra *V. parahaemolyticus* aislados de *Enteromorpha* sp. (Sánchez, 2018; Iracheta, 2018). En una investigación realizada por León y colaboradores en 2010 se aislaron cuatro cepas marinas con actividad antagonica a partir de organismos invertebrados, las cuales pertenecen al género *Bacillus* y *Micrococcus*.

La identificación de las cepas por biología molecular y el kit 50CH mostro en su totalidad especies del género *Bacillus* a excepción de la cepa H3 TSA la cual se idéntico como *Aeromonas hydrophila*. En el caso del género *Aeromonas* se ha reportado un gran potencial como patógeno en humanos y organismos acuáticos (Yano *et al.*, 2015). En un estudio realizado por Zou y colaboradores en 2019 demostraron que *A. hydrophila* ha desarrollado una resistencia a los antibióticos, por lo que se pretende utilizar microorganismos probióticos para evitar su desarrollo de igual forma que con *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, no se han realizado investigaciones por su potencial antagonico contra *Vibrio* sp.

El género *Bacillus* es de los más importantes en el ambiente marino, este ha sido asilado de intestino de crustáceos, peces marinos, y bivalvos (Rengpipat *et al.*, 2000), su efecto inhibitorio in vitro contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* ha sido reportado anteriormente (Gullian, 2001).

Este microorganismo posee actividad antagonica debido a que el bacilo forma parte del microbiota del tracto intestinal de los camarones. Las esporas de bacilo se han utilizado como probióticos para reducir a *Vibrio* sp. (Sharmila *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 2009), ya que no ha sido asociado a patologías de organismos acuáticos.

En esta investigación las bacterias con potencial antagonico resultaron con actividad hemolítica tipo beta, y se ha reportado que *Bacillus subtilis* produce un lipopéptido llamado surfactina, la cual tiene compuestos antibacterianos y antitumoral (Dehghan-Noude *et al.*, 2005). A demás, se han realizado estudios donde demuestran que *B. subtilis* productor de surfactina e iterina, incrementan la inhibición de patógenos con la combinación de estos lipopéptidos (Hiraoka *et al.*, 1992).

En este trabajo las bacterias aisladas resultaron con buena actividad antagonica por lo tanto se tendrán que realizar estudios posteriores en bioensayos para su utilización como probióticos en camarón blanco.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen D. (1963). Shrimp farming. American's Department of Natural Resources 166, Estados Unidos de America
- Babuselvam, M., Panneerselvam, A., Kanimozhi, K & Kabitha, G. (2016). Antibacterial potential of actinomycetes from Seagrass against human and aquaculture pathogens. *J. Microbiol. Biotech. Res* 6, 32-38
- Baron E.J., Peterson L.R., Finegold S.M. (1994). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, MO. 9th ed., p. 415.

- Cetina, A., Matos, A., Garma, G., Barba, H., Vásquez, R., Zepeda-Rodríguez, A., López-A, R. (2010). Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. *Rev. peru. biol.*, 17(2), 231-236.
- Dehghan-Noude, Gholamreza & Housaindokht, Mohammad & Fazly Bazzaz, Bibi Sedigheh. (2005). Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Journal of Microbiology* (Seoul, Korea), 43, 272-6.
- Dykes, G & Hastings, J. (1997). Selection bacteriocin producing bacteria. *Proc. Royal Soc, London* 264, 683-687.
- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- FAO. (2018). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Roma. Recuperado de: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en
- Faye, T., Holo, H., Langsrud, T., Nes, I & Brede, D. (2011). The unconventional antimicrobial peptides of the classical propionibacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 549-554.
- Galaviz, L y Molina Z. (2014). Patógenos y parásitos, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México (p. 259-268). México.
- Galaviz, L., Molina, Z., González, J & Ibarra, J. (2007). Patógenos que disminuyen la calidad del camarón de cultivo. *Revista Salud Pública y Nutrición* 12, 419-425.
- Galaviz-Silva, L., J.M. Iracheta y Molina-Garza, Z. 2018. *Bacillus* and *Virgibacillus* strains isolated from three Mexican coasts antagonize *Staphylococcus aureus* and *Vibrio*
- Hiraoka, H.; Asaka, O.; Ano, T. and Shoda, M. (1992). Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38, 635-640
- Iracheta Villarreal, J. M. (2017). Actividad antagonista in vitro de microbiota de Bahía de Lobos y Bahía de Guasimas, Sonora y Playa del Carmen, Quintana Roo contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Janisiewicz, W.J., and Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40:411-441.
- Leila, Monteiro, Rosa de Lima, Ramos Mariano, y Ana Maria, Souto-Maior. (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (1), pp. 23-29, January 2005 ISSN 1516-8913
- Leyton, Y. & Riquelme, Y. (2010). Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of
- Leyton, Y., Borquez, J., Darias, J., Cueto, M., Días, A., & Riquelme, C. (2012). Diketopiperazines produced by an *Bacillus* species inhibits *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Aquacult Res. Dev.* 3, 144.

- López, P., Luna, A., Escamilla, R., Flores, M., Fierro, J., Álvarez, P & Diarte, G. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Lat. Am. J.*
- Martínez J. (2002). Epizootiología de enfermedades en camarón cultivado *Litopenaeus vannamei*, del parque acuícola "el tobari", Cajeme, Sonora, México (Tesis de maestro en ciencias). *Universidad Autónoma de Nuevo León*. (p. 1 – 3). México.
- Norzagaray, M., Muñoz, P., Sánchez, L., Capurro, L & Llanes, O. (2012). Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTIC* 37, 21.
- Páez, F. (2004). Retos y perspectivas de la camaronicultura en la zona costera. *Revista*
- Parrado, Y. (2012). Historia de la Acuicultura en Colombia. *Revista AquaTIC* 37, 60-77 Peña, N &
- Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, MéGraud F, Urdaci MC. (2001). La actividad anti- *Helicobacter pylori* in vitro de la cepa probiótica *Bacillus subtilis* 3 se debe a la secreción de antibióticos. *Agentes antimicrobianos Chemother* 45: 3156–3161.
- Rodríguez, J., Crespo, D & Lopez – Camacho M. (2010). La camaronicultura y la sustentabilidad del Golfo de California. *WWF-México, Programa Golfo de California* (p. 1 – 3). México.
- Roque, A., Molina, A., Bolan, C & Gomez, B. (2001). In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17, 383–387.
- Subsecretaría de Actividades Pesqueras y Desarrollo del Delta. (2007). Acuicultura. *Ministerio de Asuntos Agrarios* (p. 1 – 3). Argentina. Recuperado de <http://www.produccion-animal.com.ar/>
- Varela, A. (2015). Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agron. Mesoam* 26, 44 – 45
- Yano, Y, et.al. (2015). Ocurrencia, caracterización molecular y susceptibilidad antimicrobiana de *Aeromonas* spp. en especies marinas de camarones cultivados en estanques interiores de baja salinidad. *Microbiología alimentaria*, 47.