



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DEL CAMBIO EN LA MICROBIOTA DEL
CONTENIDO INTESTINAL DE CAMARÓN SILVESTRE
(*Penaeus vannamei*) SOMETIDO A DIFERENTES
CONDICIONES DE CULTIVO.**

Por:

IBQ. Karen Enciso Ibarra

TESIS APROBADA POR:

UNIDAD MAZATLÁN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa

Diciembre, 2016

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Karen Enciso Ibarra, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Director de Tesis



Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Asesor



Dra. Crisantema Hernández González
Asesor



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante mi maestría en CIAD.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por permitirme la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de maestría en su programa de posgrado.

A mi director de tesis el Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala por la oportunidad y el apoyo en la realización de esta tesis, agradeciendo especialmente sus consejos y enseñanzas para lograr esta meta.

A la Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez por su tiempo y las aportaciones de su parte para la realización de esta investigación.

A la Dra. Crisantema Hernández González por su confianza y todos sus consejos durante la elaboración de mi tesis.

Al Dr. Raúl Antonio Llera Herrera Silvia Alejandra García Gasca por las enseñanzas, el tiempo y los consejos dedicados a este trabajo

A la M. en C. Ma. del Carmen Bolán por su apoyo, amistad y enseñanzas durante este trayecto.

A mi hermana Juli por su apoyo, amistad y paciencia brindado en este trabajo y en todo.

A la M en C. Erick Navarro por sus consejos en bioinformática.

Dedicatoria

A mis padres y hermana.

Contenido

Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Camarón <i>Penaeus vannamei</i> en la acuicultura	3
2.2 Hábitos y fisiología intestinal de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	4
2.3 Composición de la microbiota intestinal de camarón.....	6
2.4 Interacciones de las bacterias con sus organismos hospederos.....	10
2.5 Técnicas moleculares en la identificación microbiana	10
2.6 Índices de diversidad	12
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
V. METODOLOGÍA.....	16
5.1 Colecta de organismos silvestres y sedimento	16
5.2 Mantenimiento de organismos.....	17
5.3 Colecta de muestras.....	20
5.4 Extracción de ADN	20
5.4.1 Heces, agua y alimento	20
5.4.2 Sedimento	21
5.5 Concentración y pureza de ADN	21
5.6 Amplificación del gen 16s por PCR	22
5.7 Productos de amplificación 16s	22
5.8 Secuenciación masiva	23

5.9 Análisis bioinformática y estadístico	23
VI. RESULTADOS	26
6.1 Extracción de ADN metagenómico	27
6.2 Secuenciación masiva	28
6.2.1 Amplificación y purificación del gen 16s	28
6.2.2 Cargado del chip 316	28
6.2.3 Reporte de secuencias	29
6.3 Análisis bioinformático	30
6.3.1 Limpieza de secuencias	30
6.3.2 Rarefacción	32
6.3.3 Asignación de OTUs.....	40
6.3.4 Estructura taxonómica de la microbiota y diversidad alfa de los contenidos intestinales de camarón por grupo	49
6.3.5 Diversidad beta.....	73
VII. DISCUSIÓN.....	75
VIII. CONCLUSIÓN.....	81
IX. RECOMENDACIONES.....	83
X. BIBLIOGRAFÍA.....	84
XI. ANEXOS.....	93
Anexo I. Purificación de sedimento.....	93
Anexo II. Primers	94
Anexo III. Cuantificación de las librerías por Qubit™.....	96
Anexo IV. Secuenciación masiva.....	97
Anexo V. Pureza y concentración de ADN	99
Anexo VI. Concentración de ADN purificado	101

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomía interna y externa de un camarón (Ceccaldi, 1989).....	5
Figura 2. Localización del sitio de colecta de camarones silvestres y sedimento, correspondiente a la zona sur de Sinaloa.	16
Figura 3. Diseño experimental del bioensayo.....	19
Figura 4. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico.....	25
Figura 5. Cargado de chip 316.	29
Figura 6. Lecturas útiles, y las eliminadas por limpieza y descontaminación obtenidas por muestra. a) secuencias de los contenidos intestinales de camarón. b) secuencias de las muestras de agua, sedimento y alimento. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera; C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera; S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera; C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera; A0 agua del sitio de muestreo; ASS1 agua sin sedimento; ACS1 agua con sedimento; S1 sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.	31
Figura 7. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones silvestres. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias mayores a 50,000; c) contenidos intestinales con número de secuencias superiores a 100,000.	35
Figura 8. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones provenientes de la variante del bioensayo condiciones experimentales. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias	

mayores a 50,000; c) contenidos intestinales con número de secuencias superiores a 100,000.....	36
Figura 9. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones provenientes de la variante del bioensayo cambio de dieta. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias mayores a 50,000.	37
Figura 10. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones provenientes de la variante del bioensayo cambio de sustrato. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias mayores a 50,000; c) contenidos intestinales con número de secuencias superiores a 100,000.....	38
Figura 11. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de agua, sedimento y alimento. ASS agua sin sedimento; ACS agua con sedimento; S sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.....	39
Figura 12. Estructura bacteriana del contenido intestinal (heces) de camarón <i>P. vannamei</i> de origen silvestre a nivel filo. En negrita se muestran los taxas más representativos.	42
Figura 13. Estructura bacteriana del contenido intestinal (heces) de camarón <i>P. vannamei</i> a nivel filo, de las muestras del bioensayo. En negrita se muestran los taxas más representativos. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera; C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera; S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera; C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera.....	43

Figura 14. Estructura bacteriana de camarón <i>P. vannamei</i> de origen silvestre a nivel familia. En negrita se muestran los taxas más representativos.	46
Figura 15. Estructura bacteriana del contenido intestinal (heces) de camarón <i>P. vannamei</i> a nivel familia, de las muestras del bioensayo. En negrita se muestran los taxas más representativos. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera; C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera; S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera; C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera.	47
Figura 16. Estructura bacteriana de camarón <i>P. vannamei</i> desde filo hasta familia.	48
Figura 17. Estructura bacteriana a nivel familia de las muestras de agua (con y sin sedimento), sedimento y alimento. ASS agua sin sedimento; ACS agua con sedimento; S sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.	48
Figura 18. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando camarones silvestres se sometieron al tratamiento sin sedimento alimentado con calamar fresco (S/S CF), posteriormente se hizo un cambio de dieta: sin sedimento alimento balanceado (S/S AB) y por último un cambio de sustrato: sin sedimento a una pecera con sedimento. Flecha azul camarón 23; flecha verde camarón 8; flecha naranja camarón 2.	50
Figura 19. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de sin sedimento en la pecera y alimentados con calamar fresco (azul), a nivel familia.	51
Figura 20. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que se encontraban sin sedimento en la pecera y alimentados	

con calamar fresco (azul) y cuando se realizó el cambio de dieta de calamar fresco a alimento balanceado (rosa), a nivel familia.	52
Figura 21. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que se encontraban sin sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (rosa) y cuando se realizó el cambio de sustrato de sin sedimento a con sedimento (lila), a nivel familia.	53
Figura 22. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 1 (silvestre n=3; S/S CF n=3; S/S AB n=2; C/S AB n=3). a) índice de equitatividad Shannon. b) índice de riqueza Chao 1. c) Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF Calamar fresco; AB alimento balanceado.	55
Figura 23. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando camarones silvestres se sometieron al tratamiento con sedimento alimentado con calamar fresco (S/S CF), posteriormente se hizo un cambio de dieta: con sedimento alimento balanceado (S/S AB) y por último un cambio de sustrato: con sedimento a una pecera sin sedimento. Flecha azul camarón 12; flecha verde camarón 17; flecha naranja camarón 24.	56
Figura 24. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de con sedimento en la pecera y alimentados con calamar fresco (naranja), a nivel familia. a) disminución significativa en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales. b) aumento significativo en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales.	58
Figura 25. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones cuando se sometieron a las condiciones experimentales de con	

sedimento en la pecera y alimentados con calamar fresco (naranja) y el cambio de alimentación de calamar fresco a alimento balanceado (azul), a nivel familia.....	59
Figura 25. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que estaban en peceras con sedimento y alimentados con alimento balanceado (azul), a cambio de sustrato de con sedimento a sin sedimento (negro), a nivel familia.....	59
Figura 27. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 2 (silvestre n=2; C/S CF n=3; C/S CF n=3; S/S AB n=2). a) índice de equitatividad Shannon. b) índice de riqueza Chao 1. c) Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF Calamar fresco; AB alimento balanceado.....	61
Figura 28. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando camarones silvestres se sometieron al tratamiento sin sedimento alimentados con alimento balanceado (S/S AB), posteriormente, se hizo un cambio de dieta: con sedimento calamar fresco (S/S CF) y por último, un cambio de sustrato: sin sedimento a una pecera con sedimento. Flecha azul camarón 1; flecha verde camarón 16; flecha naranja camarón 25.	62
Figura 29. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de sin sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (verde), a nivel familia.	63
Figura 30. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones cuando se sometieron sin sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (verde) y el cambio de alimentación de alimento balanceado a calamar fresco (gris), a nivel familia.....	64

Figura 31. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que estaban en peceras sin sedimento y alimentados con calamar fresco (gris), a cambio de sustrato de sin sedimento a con sedimento (azul), a nivel familia.....	64
Figura 32. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 3 (silvestre n=2; S/S AB n=3; S/S CF n=3; C/S CF n=3). a) índice de equitatividad Shannon. b) índice de riqueza Chao 1. c) Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF Calamar fresco; AB alimento balanceado.....	66
Figura 33. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando camarones silvestres se sometieron al tratamiento con sedimento alimentados con alimento balanceado (C/S AB), posteriormente, se hizo un cambio de dieta: con sedimento calamar fresco (C/S CF) y por último, un cambio de sustrato: con sedimento a una pecera sin sedimento. Flecha azul camarón 6; flecha verde camarón 13; flecha naranja camarón 22.	67
Figura 34. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de con sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (azul), a nivel familia. a) disminución significativa en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales. b) aumento significativo en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales.	68
Figura 35. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones cuando las peceras contenian sedimento y alimentados con alimento balanceado (azul) y el cambio de alimentación de alimento balanceado a calamar fresco (rosa), a nivel familia.....	69

Figura 36. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que estaban en peceras con sedimento y alimentados con calamar fresco (rosa), a cambio de sustrato de con sedimento a sin sedimento (negro), a nivel familia.70

Figura 37. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 4 (silvestre n=2; S/S AB n=3; S/S CF n=3; C/S CF n=3). a) índice de equitatividad Shannon. b) índice de riqueza Chao 1. c) Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF Calamar fresco; AB alimento balanceado.72

Figura 38. Diversidad beta de la microbiota de los contenidos intestinales de camarón sin importar la variante del bioensayo. Cada grupo generado con el agrupamiento UPGMA de la distancia UniFrac con variantes no ponderadas, se representó con diferente color (verde, negro, naranja, rosa, amarillo, gris). Las muestras fueron codificadas con tres números, donde los dos primeros dígitos representan el número de camarón y el tercer número simboliza la variante del bioensayo, para silvestres (0), condiciones experimentales (1), cambio de dieta (2) y cambio de sustrato (3). Los tratamientos se representaron con diferente color, silvestres en verde oliva; S/S CF sin sedimento calamar fresco en color negro; C/S CF con sedimento calamar fresco en rojo; S/S AB sin sedimento alimento balanceado verde; C/S AB con sedimento alimento balanceado en azul.74

Lista de Tablas

Tabla 1. Índices para el estudio de la riqueza y diversidad alfa de las comunidades bacterianas de este trabajo.....	24
Tabla 2. Colecta de muestras del sitio de muestreo y bioensayo.	26
Tabla 3. Contenidos intestinales de camarón, muestras de agua, sedimento y alimento seleccionadas para secuenciación.	27
Tabla 4. Valores de secuenciación separadas por corrida.	30
Tabla 5. Pendientes de las curvas de rarefacción de las muestras de agua, sedimento y alimento.	33
Tabla 6. Pendientes de las curvas de rarefacción de los contenidos intestinales de camarones silvestres y de bioensayo.	34
Tabla 7. Taxas identificados, secuencias identificadas, no identificadas y no clasificadas de las muestras de heces de camarón <i>P. vannamei</i>	41
Tabla 8. Diseño experimental	49

RESUMEN

En México, la producción de camarón *Penaeus vannamei*, proviene principalmente de prácticas semi-intensivas, donde se usan estanques rústicos, estanques de concreto o de fibra de vidrio y el suministro de alimentación puede ser alimento natural o alimento balanceado. Debido a esto, el objetivo del presente estudio fue comparar la microbiota del contenido intestinal del camarón (*P. vannamei*) de origen silvestre al someterlos a condiciones experimentales de cultivo. Se colectaron camarones silvestres de un sistema lagunar y se sometieron a bioensayo, el cual consto de tres variantes, en la primer variante los camarones se dividieron de forma aleatoria en cuatro tratamientos: 1) alimentados con calamar fresco, 2) alimentados con calamar fresco y la pecera contaba con sedimento, 3) alimentados con alimento balanceado y 4) alimentados con alimento balanceado y la pecera contenía sedimento. En la segunda variante del bioensayo, se realizó un cambio de alimentación, es decir, los organismos alimentados con calamar fresco fueron alimentados con alimento balanceado y viceversa. Mientras que en la tercer variante se realizó un cambio de sustrato. Se secuenció la región V3 del gen 16S ribosomal mediante la plataforma Ion Torrent PGM, se obtuvieron un total de 1,541,248 secuencias. El análisis comparativo de las comunidades microbianas, se realizó con QIIME 1.9., el phylum *Proteobacteria* fue el más abundante, así como los taxa incluidos en este, además, la diversidad bacteriana del contenido intestinal disminuyó al someter camarones silvestres a condiciones experimentales, los camarones con sedimento y dieta balanceada mostraron mayor diversidad que los que mantuvieron sin sedimento y alimentados con calamar fresco.

Palabras clave: *Penaeus vannamei*, microbiota del contenido intestinal, metagenómica

ABSTRACT

Mexico's shrimp production (*Penaeus vannamei*) mainly comes from semi-intensive practices, where rustic ponds, concrete or fiberglass ponds are used and the food supply can be natural food or balanced feed. Therefore, the objective of this thesis was to compare the microbiota of the intestinal contents of wild shrimps (*P. vannamei*) when they were subjected to experimental farming conditions. Wild shrimps were collected from an estuarine system and submitted to a bioassay, which was divided into three phases. In the first phase, shrimps were randomly divided into four treatments: 1) fed with fresh squid and no sediment in the aquarium, 2) fresh squid and sediment, 3) fed with balanced feed, no sediment, and 4) balanced feed, sediment. In the second phase of the bioassay a change of feed was done, organisms fed with fresh shrimp were fed now with balanced feed and vice versa. The third and last phase, a change of substrate was performed. The V3 region of 16S ribosomal gene was sequenced using the Ion Torrent platform PGM, a total of 1,541,248 sequences were obtained. The comparative analyses of microbial communities was done with QIIME 1.9. The most abundant phylum observed was Proteobacteria. The bacterial diversity of the intestinal content decreased when wild shrimps submitted to experimental conditions, shrimp with sediment and balanced feed showed higher diversity than those maintained without sediment and fresh squid.

Keywords: *Penaeus vannamei*, 16S rRNA, microbiota of intestinal contents, metagenomic.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en el estudio del tracto intestinal, el cual, es un ecosistema complejo que alberga una comunidad bacteriana diversa, a la cual se le conoce como microbiota intestinal (Guarner, 2007), mientras que al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos se le conoce como microbioma (Icaza, 2013). Dicha comunidad puede llegar a influir sobre la salud, el procesamiento de nutrientes y procesos de protección en el animal huésped (Rungrasamee *et al.*, 2013).

Gracias a diversos estudios con colonización intestinal controlada se ha podido determinar algunas de las funciones en las que está implicado el microbioma. Guarner (2007), menciona que la microbiota intestinal, cumple con tres funciones principales, la primera relacionada con la nutrición y metabolismo que se traduce en recuperación de energía y nutrientes, la segunda con protección al huésped frente a invasión por microorganismos con potencial patógeno, modulación del sistema inmune y por último funciones sobre la modulación del tracto gastrointestinal proliferación. Mientras que Yoon y colaboradores (2015) lo resumen en mantener la homeostasis del organismo.

El estudio de la microbiota intestinal principalmente se ha realizado en el humano, el cual ha sido objeto de múltiples investigaciones sobre diversidad (Huttenhower *et al.*, 2012; Muszer *et al.*, 2015), nutrición y desarrollo, enfermedades e inmunidad (Flint *et al.*, 2012; Colon *et al.*, 2014) así como la manipulación de la microbiota como una estrategia terapéutica (O'Hara y Shanahan, 2007; Ha, 2011). Mientras que en peces teleósteos con alguna importancia en la acuicultura, dicha investigación ha avanzado de forma relativamente lenta en comparación con la introducción de procedimientos de secuenciación, ya que está muy por detrás del estudio del microbioma de humanos y de organismos modelos como ratón, sin embargo, se ha avanzado en organismos modelos como

pez cebra (*Danio rerio*), definiendo su microbioma y describiendo su papel en el desarrollo (Llewellyn *et al.*, 2014).

La microbiota gastrointestinal en camarón se ha estudiado en especies como *Penaeus monodon* (Rungrassamee *et al.*, 2013; Rungrassamee *et al.*, 2014), *Penaeus vannamei* (Moss *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2007; Tzuc *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) y otras especies de interés comercial (Oxley *et al.*, 2002; Tzong *et al.*, 2015), con la finalidad de comprender la interacción del microbioma-camarón, ya que múltiples fenómenos que afectan la producción y rentabilidad, podrían ser dirigidos a través de la manipulación de la microbiota, como la digestión, síntesis y absorción de nutrientes, resistencia a patógenos, crecimiento, mayor supervivencia en organismos sembrados, entre otras (Llewellyn *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

En el presente trabajo, mediante la amplificación y secuenciación de la región variable V3 del gen 16s ARNr, se pretende caracterizar la estructura taxonómica y diversidad de la microbiota del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* de origen silvestre, además de realizar un bioensayo, sometiendo a estos mismos camarones silvestres, a diferentes condiciones experimentales (con y sin sedimento y alimentados con alimento balanceado y calamar fresco), con la finalidad de contrastar los cambios que ocurren en la estructura taxonómica y diversidad de la microbiota de los contenidos intestinales de camarón, para cada tratamiento.

II. ANTECEDENTES

2.1 Camarón *Penaeus vannamei* en la acuicultura

La producción acuícola mundial sigue creciendo, aunque a menor ritmo. En 2012 alcanzó un máximo histórico de 90,4 millones de toneladas equivalente en peso vivo (144,400 millones de USD), de los que 66,6 millones de toneladas correspondieron a peces comestibles (137,700 millones de USD), 23.8 millones de toneladas a plantas acuáticas, principalmente algas marinas (6,400 millones de USD) y algunos países notificaron la producción de 22,400 toneladas de productos no alimentarios (222,4 millones de USD), tales como perlas y conchas marinas para usos ornamentales y decorativos. Los crustáceos cultivados representaron el 9,7 % (6.4 millones de toneladas) de la producción acuícola de peces comestibles en volumen, pero el 22.4 % (30,900 millones de USD) en valor (FAO, 2014). Siendo el camarón blanco del Pacífico, es una de las especies más cultivables, con más del 70% en la producción mundial de camarón (Zhang, 2014).

En México la producción de camarón es la principal actividad de la acuicultura, contribuye con un 45.9% del volumen total de producción, la cual proviene principalmente de prácticas semi-intensivas, pero no fue significativo hasta finales de los años 1980's (Ponce-Palafox *et al.*, 2011), además, pueden ser extensivo, intensivo e hiper-intensivo, dicha clasificación está acorde a la densidad y niveles de tecnificación (porcentaje de recambio de agua, tamaño del área productiva, tipo de alimento y rendimientos acuícolas obtenidos), empleados en la producción. Se usan estanques rústicos de tierra o semi-rústicos forrados con geo-membrana de alta densidad (conocida como liner), estanques de concreto, estanques de fibra de vidrio o estanques de corriente rápida (FAO, 2005). En 2013, la producción acuícola llegó a 245,761 toneladas en peso vivo, del cual el 23% (60,292 toneladas en peso vivo) corresponde a la

camaronicultura, siendo Sinaloa el estado más productivo con 15.5 % (38, 118 toneladas en peso vivo) (CONAPESCA, 2013).

El rápido crecimiento del cultivo de camarón dio lugar a un auge económico, pero también se enfrenta al problema del alto costo de la proteína en la dieta, así como a la aparición y diseminación de organismos patógenos causantes de enfermedades los cuales han ocasionado serias pérdidas en este sector. La Alianza Global de Acuicultura (GAA, por sus siglas en inglés) ha estimado que aproximadamente, 60% de dichas pérdidas puede ser atribuido a enfermedades virales, 20% a enfermedades bacterianas y el restante 20% a una variedad de otros agentes patógenos (Flegel, 2008). En las últimas décadas, la creciente demanda de productos de la acuicultura ha llevado a la investigación de la composición bacteriana en el tracto intestinal y su interacción huésped con la finalidad de mejorar el crecimiento y la resistencia a enfermedades.

2.2 Hábitos y fisiología intestinal del camarón *Penaeus vannamei*

Penaeus vannamei (Boone, 1931) también conocido como camarón blanco del Pacífico, se distribuye desde el Golfo de California México, a Tumbes al norte de Perú. Se encuentra en hábitats marinos con temperatura media anual de 20 °C, son capaces de tolerar un amplio intervalo de salinidad (2-40 unidades prácticas de salinidad, ups) (Li *et al.*, 2015). Sus hábitos alimenticios difieren a lo largo de su ciclo de vida, en etapas de protozoa, mysis y postlarva temprana es de origen plantónico, al llegar a postlarva se vuelven carroñeros bentónicos y su dieta se compone de crustáceos, moluscos, oligoquetos, poliquetos, copépodos, pericáridos, entre otros (Marte, 1980; Rader, 1984; Flegel, 1985; Hill y Wassenberg, 1987; Wassenberg, 1987; Wassenberg y Hill, 1987).

El sistema digestivo (Figura 1), consta de estructuras relacionadas con reducción mecánica de partículas de alimentos y actividad enzimática, el intestino se puede dividir en tres partes: anterior, medio y posterior. El intestino anterior incluye el esófago y proventrículo, conformado por una cámara anterior y una posterior,

también llamados, estómago cardiaco y estómago pilórico, respectivamente. El intestino medio inicia en el hepatopáncreas y se une al trato principal, no cuenta con cubierta cuticular y sus células están en contacto con el lumen. El intestino posterior está ubicado en la mitad posterior del sexto segmento abdominal e incluye el recto y el ano (Felgenhauer y Abelle, 1989; Brown *et al.*, 2010).

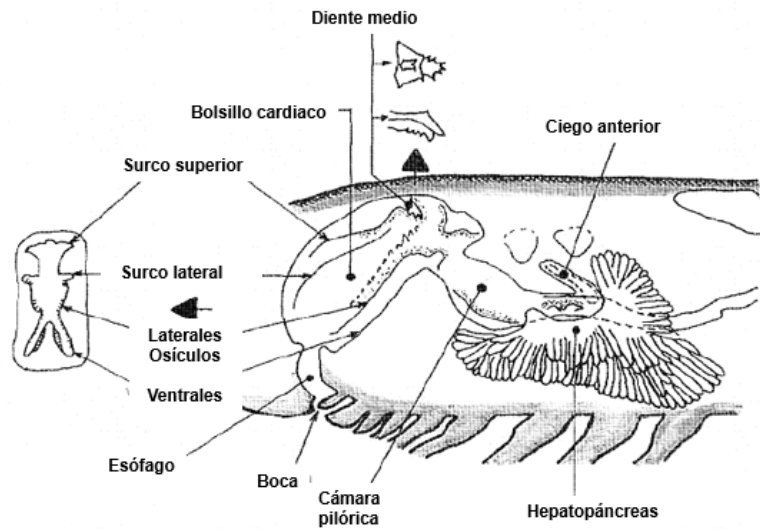
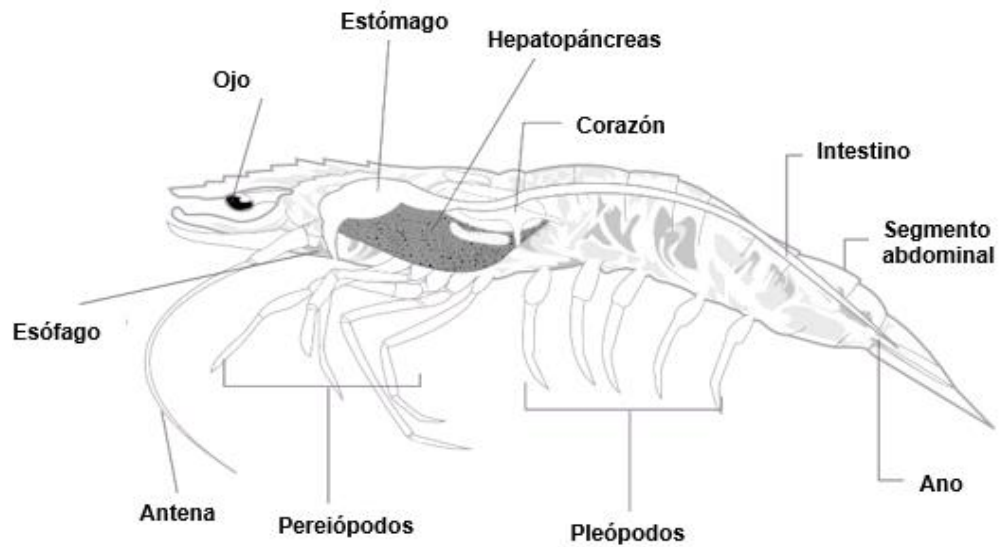


Figura 1. Anatomía interna y externa de un camarón (Tomado de Ceccaldi, 1989).

Los alimentos se desplazan por el tubo digestivo, las partículas de gran tamaño son tratadas por el molino gástrico, las que son suficientemente pequeñas pasan al saco pilórico y aquellas de menos de 1 nm entran al hepatopáncreas. Las partículas más gruesas son retenidas por un filtro a la entrada de la glándula y son dirigidas posteriormente hacia el intestino, donde son cubiertas por la membrana peritrófica, dando lugar a las heces. En el estómago los alimentos son transformados en una papilla líquida y se inicia la digestión química, la cual se realiza gracias a la acción de enzimas digestivas procedentes principalmente del hepatopáncreas (Ceccaldi, 1989).

2.3 Composición de la microbiota intestinal de camarón.

En organismos acuáticos, existe una estrecha interacción entre microorganismos y los organismos debido a que tienen el agua como un entorno compartido (Vadstein *et al.*, 2004). La colonización de la microbiota intestinal está influenciada por diversos factores como el tipo de hábitat, dieta y condiciones fisiológicas del organismo (Tzuc *et al.*, 2014). En especies de invertebrados acuáticos los factores que afectan la presencia de bacterias intestinales, son la estructura y revestimiento del intestino, el tipo de dieta, condiciones físicas y químicas como temperatura, pH y salinidad, la fisiología del huésped y estacionalidad (Harris, 1993).

Otra indicación de que las condiciones ambientales afectan significativamente la microbiota intestinal en invertebrados marinos es que los animales capturados en la naturaleza y los criados en sistemas de cultivo de la misma especie pueden tener diferentes comunidades de bacterias intestinales (Harris, 1993), ya que dentro del entorno natural, las condiciones pueden conducir al desarrollo de las poblaciones estables de la microbiota intestinal, que pueden representar la microbiota natural o normal del animal huésped. Por el contrario, el carácter "artificial" de los sistemas de cultivo, donde los parámetros de la calidad de agua, la dieta, la densidad de población y la estructura del hábitat son diferentes al entorno natural, puede conducir a la creación de una microbiota intestinal

diferente (Oxley *et al.*, 2002), propiciando que el control de la proliferación de patógenos sea extremadamente difícil (Vadstein *et al.*, 2004).

La microbiota gastrointestinal en camarón se ha estudiado en especies como *Penaeus monodon* (Rungrassamee *et al.*, 2013; Rungrassamee *et al.*, 2014), *Penaeus vannamei* (Moss *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2007; Tzuc *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) y otras especies de interés comercial, con la finalidad de comprender la interacción del microbioma-camarón y como podría conducir a una mayor producción y rentabilidad para los productores a través del desarrollo de alimentos más rentables y estrategias de control de enfermedades.

Rungrassamee y colaboradores (2013), caracterizaron la población de bacterias intestinales en el camarón tigre (*P. monodon*) en diferentes etapas de crecimiento (desde post-larva hasta juveniles de uno, dos y tres meses) usando técnicas de pirosecuenciación en la plataforma Genome Sequencer Junior. Donde encontraron los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* (clase: *Alfa*, *Beta* y *Gammaproteobacteria*). Los filos que estuvieron presentes en todas las etapas fueron *Bacteroides*, *Firmicutes* y *Proteobacterias*, además encontraron que la clase *Gammaproteobacteria* fue dominante en los intestinos de los camarones juveniles. En *P. vannamei* se ha estudiado la microbiota intestinal desde la etapa de zoea hasta post-larva (Zheng *et al.*, 2016) y postlarvas (14 días) hasta juveniles de uno, dos y tres meses de edad (Huang *et al.*, 2014), donde se ha observado que *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Bacteroidetes* fueron las más abundantes en los contenidos intestinales.

Se han realizado diversos estudios para entender la influencia que tiene el alimento en la composición de la microbiota intestinal de camarones, Li K y colaboradores (2007), estudiaron la composición de la comunidad bacteriana en el intestino de camarón blanco, *P. vannamei* bajo condiciones de cultivo de laboratorio alimentados con dieta comercial, donde usando la biblioteca clon 16S

rDNA. Los resultados mostraron que el grupo de los Firmicutes y las Gamaproteobacterias son un componente dominante (con 75.4% y 24.6 respectivamente) en la microflora intestinal de camarón. Zhang y colaboradores (2014), mediante secuenciación de alto rendimiento (plataforma Illumina) analizaron la composición y biodiversidad de la microbiota intestinal en *P. vannamei* alimentados con dietas con diferente composición de ácidos grasos y la diferencia en la composición bacteriana entre el agua de cultivo y el intestino de los organismos. Encontraron que los filos dominantes fueron *Proteobacteria* y *Tenericutes*. Las principales familias entre los grupos fueron *Mycoplasmataceae* y *Rhodobacteraceae*, esta última la proponen como un posible probiótico ya que pertenece a bacterias fotosintéticas que contienen abundantes nutrientes y tiene una alta capacidad de tolerancia del tránsito gastrointestinal. Además, sugieren que el ambiente intestinal podría ejercer una presión selectiva sobre el establecimiento de la comunidad microbiana ya que ciertos géneros que presentaron prevalencia en las muestras de agua no se encontraban en los intestinos o bien la abundancia de ciertos géneros fue mayor en los intestinos que en las muestras de agua. Esto último concuerda con Meziti (2012), quien reportado que la mayoría de las bacterias intestinales no están relacionados con el medio ambiente.

Otro factor que esta siendo motivo de investigación es la influencia del tipo de hábitat en la composición de la microbiota intestinal, el estudio realizado por Rungrassamee y colaboradores (2014), mediante análisis de pirosecuenciación, compararon las comunidades de bacterias intestinales en camarones *P. monodon* silvestres y domesticados. Identificaron para ambas condiciones los filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Y de acuerdo a la unidades taxonómicas operacionales (OTUs), en los intestinos tanto de camarones silvestres como cultivados se encontraron presentes los filos: i) *Proteobacteria* (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, y *Sphingomonas Undibacterium*), ii) Firmicutes (*Fusibacter*) y, iii) Bacteroidetes (*Cloacibacterium*, debido a las similitudes entre los dos grupos, los

investigadores sugieren que el establecimiento de bacterias selectivas se debe a las condiciones intestinales. En otro estudio con *P. monodon*, se ha comparado las diferencias en las comunidades bacterianas de la microbiota en diversas granjas de cultivo, donde las gamaproteobacterias fueron el único grupo de bacterias comunes que se encontraron en las vías intestinales de camarón de todas las granjas (Chaiyapechara *et al.*, 2012). En otro estudio realizado en langostino de río *Macrobrachium nipponense*, se evaluaron las diferencias en dos hábitat distintos (río y lago), donde se observó que el filo Proteobacteria fue el dominante, además demostraron el efecto de los hábitats en la divergencia de microbioma intestinal (Tzeng *et al.*, 2015).

Gómez y colaboradores (1988), realizó un estudio donde se describieron las especies de *Vibrio* presentes en estómago, intestino, hepatopáncreas y hemolinfa de camarones sanos, en intestino encontraron que un 48.3% de los aislados tenía la capacidad de utilizar la sacarosa, utilizando técnicas tradicionales de cultivo. En la actualidad, se han comenzado a desarrollar investigaciones para determinar funcionalidad, como la realizada por Tzuc y colaboradores (2014), quienes aislaron las bacterias capaces de producir diferentes enzimas extracelulares de potencial relevancia en los procesos digestivos a partir de estómago, hepatopáncreas e intestinos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), se utilizaron los métodos moleculares (amplificación del gen 16S rRNA y secuenciación) y criterios fenotípicos (tinción de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa y morfología de las colonias), donde identificaron las cepas que correspondía a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio*. De las cepas de *Vibrio* aisladas de intestino se obtuvieron dos cepas con actividad amilasa (una de ellas con actividad baja), mientras que para la actividad quitinasa para ambos géneros la actividad fue relativamente baja, por último, se estudió la actividad lipasa/esterasa donde se encontró que dos cepas aisladas del intestino tenían actividad baja o casi nula y las otras dos si presentaron dicha actividad enzimática.

2.4 Interacciones de las bacterias con sus organismos hospederos

Los microorganismos pueden formar colonias compuestas por individuos de la misma especie o bien comunidades. Entre las especies que forman una comunidad aparecen interacciones de mutualismo, parasitismo o comensalismo según como afecta a cada uno de los componentes de la interacción. Estas interacciones provocan que la comunidad posea propiedades complejas debido a las diversas características de los componentes que la forman (Gross *et al.*, 2003).

Durante mucho tiempo se ha sugerido que la diversidad de especies juega un papel crítico en la función del ecosistema (Hodgson *et al.*, 2002); existe evidencia ecológica, de una relación positiva entre la diversidad y funcionamiento de los ecosistema, debido a que las comunidades más diversas, ocuparán más nichos por lo que excluirá la mayoría de las especies invasoras y optimizar el uso de recursos, además, tiene mayor probabilidad de un efecto protector contra el crecimiento o invasión de otros microorganismos (Hodgson *et al.*, 2002; Schryver, 2014). En la mayoría de los casos las funciones benéficas de la microbiota superan los efectos secundarios potencialmente dañinos, por lo tanto, la manipulación de la microbiota por la introducción o eliminación selectiva de las bacterias pertinentes podría representar futuras vías de curación o prevención. (Stecher, 2011). En camarón *P. vannamei*, se ha demostrado que algunas bacterias (tales como *Bacillus*) podrían regular la microbiota intestinal y aumentar la resistencia del huésped a bacterias patógenas (Luis-Villaseñor *et al.*, 2013; Sha *et al.*, 2016).

2.5 Técnicas moleculares en la identificación microbiana

Se estima que sólo el 0.1-1.0% de las bacterias que están presentes en los suelos puede ser cultivadas bajo condiciones estándar, mientras que la fracción de bacterias cultivables de ambientes acuáticos es de diez a mil veces menor (Handelsman *et al.*, 2007). Esto implica que la gran mayoría de las bacterias son

no cultivables y, por lo tanto, desconocidas. No obstante, con el advenimiento de los métodos independientes de cultivo, se está descubriendo la composición y diversidad del microbioma en diferentes ambientes (Di Bella *et al.*, 2013).

Las técnicas basadas en ácidos nucleicos se han vuelto cada vez más importantes en la ecología microbiana ya que han contribuido al entendimiento de la estructura de las comunidades microbianas, analizándolas en su totalidad, incluyendo a los organismos que no han sido cultivados en laboratorio (Escalante, 2008). Actualmente una de las técnicas más útiles y ampliamente utilizadas para estudiar y caracterizar la composición de las comunidades bacterianas de una gran variedad de nichos ecológicos, es la amplificación del gen ribosomal que codifica para la subunidad pequeña 16S rRNA (aproximadamente 1500 pb), la cual es conocida como el cronómetro universal, y esto debido a que es una molécula con regiones ampliamente conservadas ya que su estructura despliega cambios mínimos durante largos periodos de tiempo (Rodicio *et al.*, 2004), también cuenta con nueve regiones hipervariables (V1-V9), que se encuentran en zonas específicas, debido a esto, dicha región se puede utilizar como marcadores en taxonomía molecular, además de que puede amplificarse fácilmente por PCR (Escalante, 2008; Mizrahi-Man *et al.*, 2013).

Desde 2010, los avances de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (454 GS Junior, Ion Personal Genome Machine (PGM) y, MiSeq de Illumina) y herramientas computacionales han reducido el costo de secuenciación y ampliado la cobertura (Di Bella *et al.*, 2013), logrando abrir nuevas fronteras en el análisis de la comunidad microbiana, proporcionando un medio rentable de la identificación de los genotipos microbianos que están presentes en las muestras (Caporaso *et al.*, 2011). Con esto surge una nueva rama de la microbiología, denominada metagenómica, la cual es capaz de estudiar el genoma completo o simplemente estar dirigida a un gen (Witheley, 2012).

2.6 Índices de diversidad

La biodiversidad incluye la riqueza o abundancia, que es el número total de especies presentes, y la equitatividad, que es la distribución de individuos entre esas especies (Kirk *et al.*, 2004). El empleo de un índice depende básicamente de la información a evaluar. Se han definido tres niveles de diversidad para el estudio de comunidades. La diversidad alfa, se refiere a la diversidad de un sitio o un hábitat, la diversidad beta se refiere a la diversidad entre hábitats o sitios, es decir, la tasa de recambio entre especies que se produce entre un hábitat y otro adyacente y la diversidad gamma la cual se encarga de la diversidad a grandes escalas y combina componentes de la diversidad alfa y beta (Whittaker, 1972; Robinson *et al.*, 2010).

Los estudios de diversidad bacteriana se basan aún en índices y modelos de diversidad diseñados para el estudio ecológico de comunidades de macroorganismos (Hill, 2003). Los métodos para evaluar la diversidad dentro de las comunidades (alfa), se divide en dos, el método basado en la cuantificación de especies presentes (riqueza específica) y los métodos basados en la estructura de la comunidad (dominancia, equidad, o riqueza y equidad en conjunto) (Moreno, 2001). La diversidad beta está basada en proporciones o diferencias, pueden evaluarse con base en índices o coeficientes de similitud, de disimilitud o de distancia entre las muestras a partir de datos cualitativos (presencia ausencia de especies) o cuantitativos (abundancia proporcional de cada especie medida como número de individuos, biomasa, densidad, cobertura, etc.), o bien con índices de diversidad beta propiamente dichos (Magurran, 1988; Moreno, 2001). Lande (1996), deriva tres fórmulas para la diversidad gamma, estas fórmulas dividen el valor de la diversidad gamma en dos componentes diversidad dentro de las comunidades (alfa) y diversidad entre comunidades (beta) (Moreno, 2001).

En diversos estudios donde se caracteriza cambios en la microbiota de camarón (Moss *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2007; Rungrasamee *et al.*, 2013; Rungrasamee

et al., 2014; Tzuc *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), miden la diversidad alfa y para analizar la riqueza bacteriana usan el índice de Chao1, que es un estimador del número de especies en comunidad basado en el número de especies raras en la muestra (Chao, 1984). La diversidad bacteriana, frecuentemente es medida con el índice de Shannon-Wiener y el Índice de Simpson (Moreno, 2001). El índice de equidad de Shannon-Wiener (H), toma en cuenta los dos componentes de la diversidad: número de especies y equitatividad o uniformidad de la distribución del número de individuos en cada especie; de acuerdo con esto un mayor número de especies incrementa la diversidad (Franco, 1989). Este índice de abundancia proporcional relaciona la cantidad de especies presentes con el número de individuos de cada una. Expresa, por tanto, el grado promedio de incertidumbre en la predicción de la especie de un individuo escogido al azar desde una comunidad (Magurran, 1988). El índice de Simpson se basa en el hecho de que, en una comunidad muy diversa, la probabilidad de que dos organismos tomados al azar sean de la misma especie. Esta fuertemente influido por la importancia de las especies mas dominantes (Franco, 1989).

III. HIPÓTESIS

- La estructura de la comunidad bacteriana del contenido intestinal de camarón (*Penaeus vannamei*) de origen silvestre, se modificará por efecto de los tipos de sustrato (con y sin sedimento) y la alimentación (alimento balanceado y calamar fresco).
- Habrá mayor riqueza de la composición taxonómica bacteriana del contenido intestinal de camarón (*Penaeus vannamei*) en las condiciones con sedimento y que hayan sido alimentados con una dieta balanceada.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los cambios en la composición taxonómica bacteriana del contenido intestinal de camarones (*Penaeus vannamei*) de origen silvestre al ser sometidos a diferentes dietas y sustratos de cultivo.

4.2 Objetivos específicos

- I. Caracterizar la composición taxonómica bacteriana del contenido intestinal de camarones (*Penaeus vannamei*) de origen silvestre.
- II. Determinar el efecto del tipo de alimento en la composición taxonómica bacteriana del contenido intestinal de camarones (*Penaeus vannamei*).
- III. Determinar los cambios en la composición taxonómica bacteriana del contenido intestinal de camarones (*Penaeus vannamei*) cuando se mantienen con o sin sedimento.

V. METODOLOGÍA

5.1 Colecta de organismos silvestres y sedimento

Se colectaron camarones silvestres (peso $11.7\text{g} \pm 3\text{g}$) de la zona sur de Sinaloa correspondiente al municipio de Mazatlán, en el sistema lagunar Huizache Caimanero con ubicación geográfica $23^{\circ} 0'46.31''\text{N}$; $106^{\circ} 9'5.28''\text{O}$ (Figura 2).

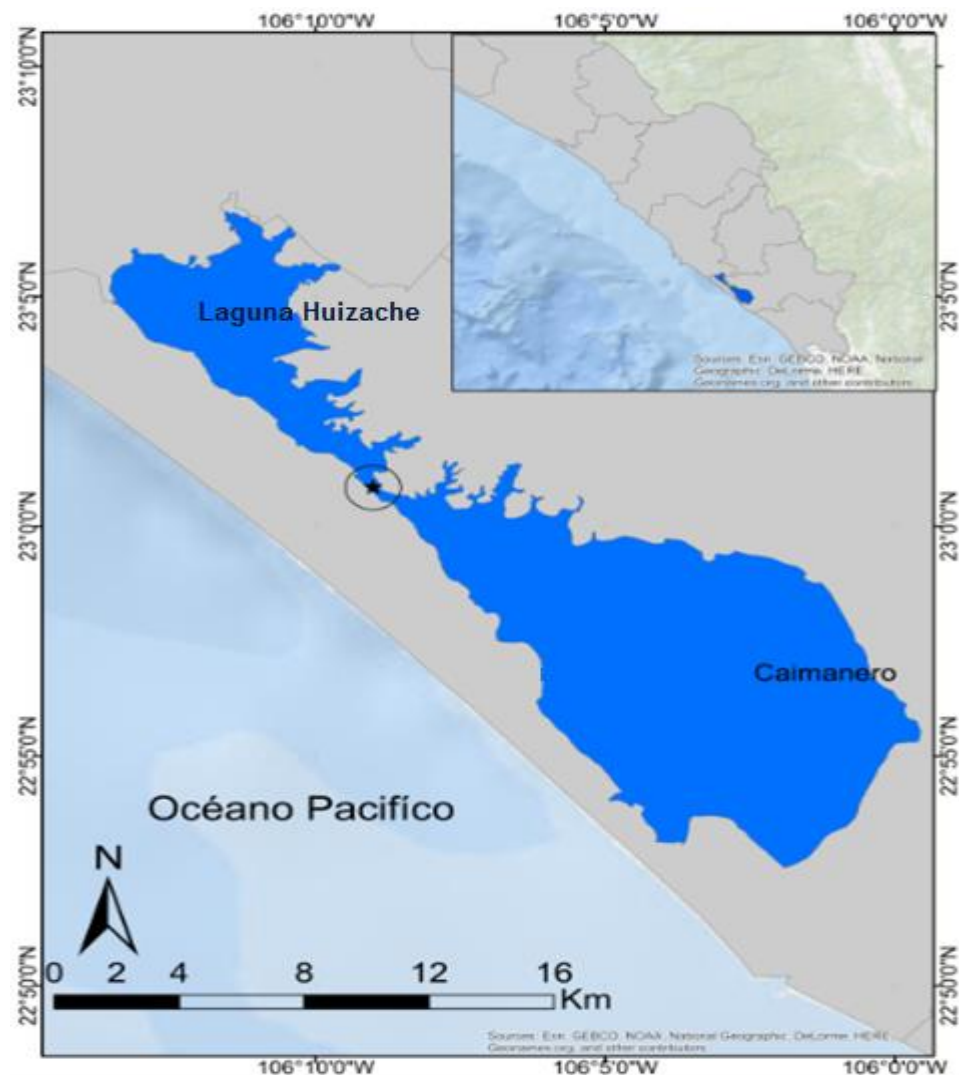


Figura 2. Localización del sitio de colecta de camarones silvestres y sedimento, correspondiente a la zona sur de Sinaloa.

Los camarones se pescaron con una atarraya convencional, cada uno se depositó en un recipiente individualmente, el cual estaba provisto de aireación y contaba con agua del mismo sitio de muestreo. En cuanto fue posible, se tomaron muestras de contenido intestinal (heces) y se conservaron en etanol al 96%. Los recipientes con los camarones, se depositaron en jabsas de plástico selladas de 40 litros y fueron trasladadas a las instalaciones de CIAD-Mazatlán.

El sedimento se colectó con una draga Ekman del mismo sitio de donde se tomaron los camarones. Se introdujo en bolsas estériles y se transportó en hieleras con abundante hielo a las instalaciones de CIAD-Mazatlán.

5.2 Mantenimiento de organismos

Los camarones silvestres se mantuvieron confinados individualmente, un periodo de cuatro semanas en recipientes de plástico con capacidad de 5 litros, los cuales se llenaron con 4 litros de agua de mar, contaron con flujo de agua abierto y sistema de aireación constante.

Se realizó un bioensayo con tres variantes.

1. La primera tuvo una duración de 15 días; al azar se asignaron cuatro grupos, cada grupo correspondía a una condición de cultivo.
 - a. El primer grupo fue alimentado con calamar fresco congelado,
 - b. el segundo grupo al igual que el anterior fue alimentado con calamar fresco congelado y la pecera contaba con sedimento propio del sitio de muestreo;
 - c. el tercer grupo fue alimentado con alimento balanceado (Camaronina TM 35% de proteína);
 - d. el último grupo fue alimentado con el alimento balanceado y la pecera contenía sedimento.
2. La segunda variante del bioensayo tuvo una duración de 7 días, se realizó un cambio de alimentación, es decir, los organismos alimentados con

calamar congelado fueron alimentados con alimento balanceado y viceversa.

3. La tercera variante, tuvo una duración de 7 días y se realizó un cambio de sustrato.

En cada recipiente se colocó un camarón, se tuvieron cinco replicas por tratamiento, con un total de 20 camarones (Figura 3), se alimentaron dos veces al día, a las 10:00 y 17:00 horas a saciedad aparente. Diariamente, el alimento no consumido se retiraba mediante sifoneo y el 50% del agua de la pecera era sustituida. Para el caso de los recipientes con sedimento se les colocó una malla plástica con luz de 0.5 x 0.5 cm sobre el sedimento para evitar que los camarones se enterraran.

Se mantuvo un fotoperiodo 12 horas luz y 12 de oscuridad, se llevó un registro de temperatura y en el agua se midieron los parámetros de nitratos, nitritos, pH, salinidad, alcalinidad y dureza mediante el uso de kits comerciales (Test Strip Kit Lifegard test strips aquatics 6 way all purpose).

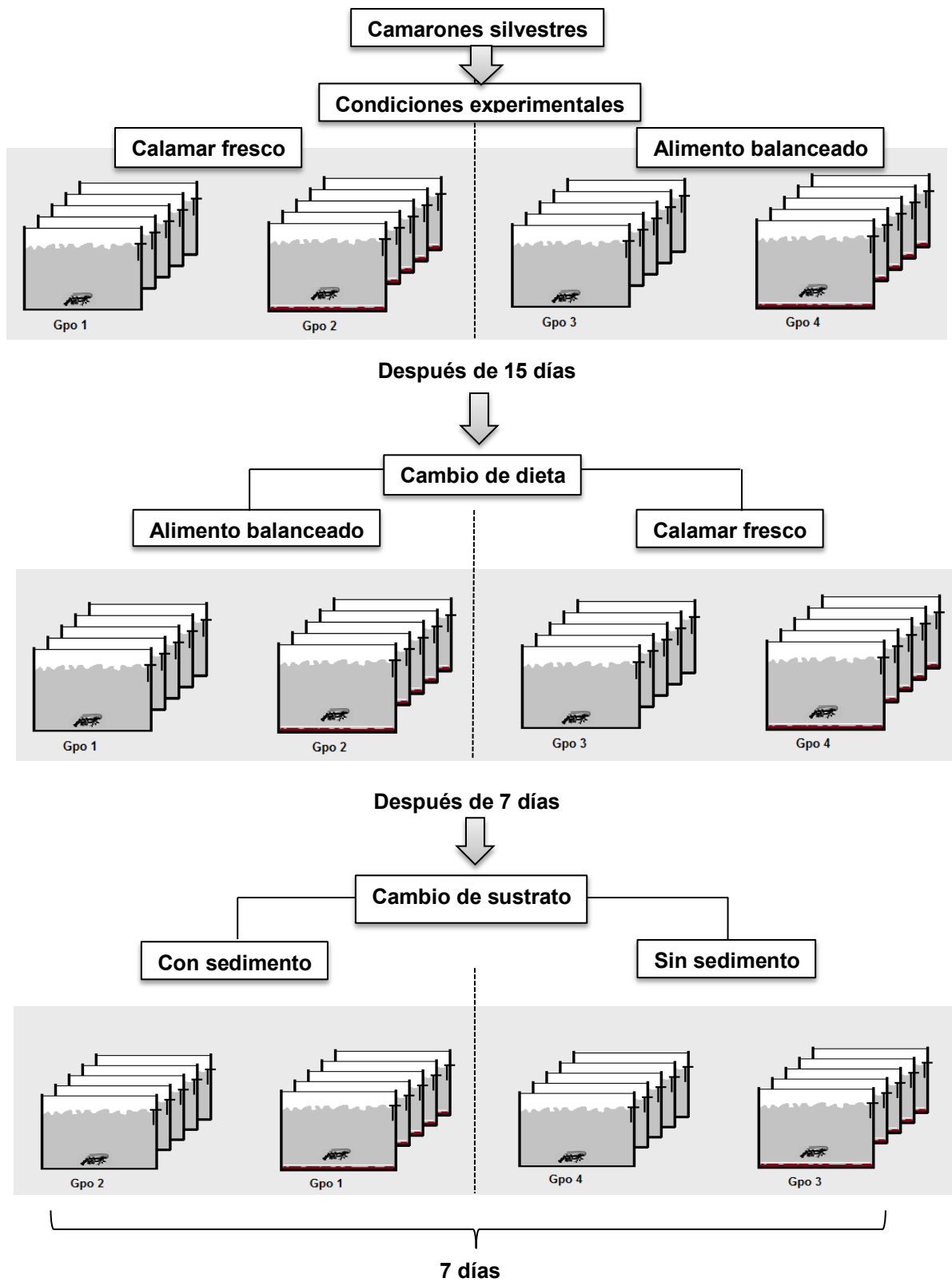


Figura 3. Diseño experimental del bioensayo.

5.3 Colecta de muestras

La toma de muestras de heces se realizó una vez al día, siguiendo la metodología propuesta por Córdova-Murueta *et al.* (2003), la cual consistía en alimentar y con ayuda de pinzas de disección se colectaban las heces inmediatamente de que salían, posteriormente las muestras se colocaron en tubos Eppendorf con capacidad de 1.5 mL con 1 mL de etanol 96 para su conservación.

Adicionalmente se tomaron muestras de agua, sedimento y alimento las cuales se depositaron en tubos Eppendorf (1.5 mL).

5.4 Extracción de ADN

5.4.1 Heces, agua y alimento

La extracción del ADN genómico (ADNg) bacteriano de las heces de *P. vannamei*, agua y alimento se obtuvo a partir del método de buffer Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB):

1. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.
2. Se agregaron 480 μ L de EDTA 0.5 M y 120 μ L de lisozima, se incubó a 37°C por 30 min, posteriormente se centrifugó por 2 min a 15,000 rpm, una vez realizado lo anterior se tiró el sobrenadante.
3. Se agregó 350 μ L de buffer CTAB a cada tubo, después, se agregaron 20 μ L de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL y se agitó brevemente.
4. Se colocaron los tubos en un termoblock a 55°C hasta que el tejido estuvo lo suficientemente digerido.
5. Se agregaron 300 μ L de LiCl 5M, 5 μ L de RNAsa y se agitó por un minuto; posteriormente, se agregó 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó brevemente.
6. La mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.

7. Se extrajeron 500 μL de la capa acuosa (parte superior) del centrifugado y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
8. Se añadió 50 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 mL de Etanol 100% frío; se agitó y colocó a -20°C por 1 hora aproximadamente.
9. Se centrifugó durante 20 min a 13,000 rpm a 4°C y se retiró el sobrenadante cuidadosamente para no perder el ADN sedimentado.
10. Se agregaron 750 μL de etanol al 70%, se agitó por 15 min a temperatura ambiente, enseguida se centrifugó a máxima velocidad (14,000 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante por decantación.
11. Se dejó secar el pellet de ADN en campana de flujo laminar, una vez seco, se añadieron 20 μL de agua de 18Ω estéril para resuspender el pellet.
12. Se guardaron las muestras a -20°C .

5.4.2 Sedimento

1. Se tomó 1 gramo de sedimento y se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.
2. Se agregaron 10 mL de buffer de lisis, 2 mL de fenol cloroformo isoamílico (25:24:1) y se maceró durante 2 min en mortero.
3. Se tomó el macerado y se colocó en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL, se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min.
4. El sobrenadante se mezcló con 600 μL de isopropanol y se colocó en hielo durante 20 min, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min.
5. Se corrió gel de agarosa al 2%, se cortó la banda y se purificó usando el kit AxygenPrep-PCR column (Anexo I).

5.5 Concentración y pureza de ADN

Para determinar la concentración y pureza del ADN se usó el espectrofotómetro DeNovix DS-11, donde se colocó 1 μL de la muestra en el orificio lector y se registró la concentración (ng/mL) y relación 260/280 nm. Posteriormente se realizó una dilución de 1:10.

5.6 Amplificación del gen 16s por PCR

Se amplificó por PCR una región de ≈ 200 pb correspondiente a la región V3 del gen 16S ARNr (Huse *et al.*, 2008). Para esto se utilizó un primer distinto (barcode) en cada muestra para organizar las secuencias obtenidas con su muestra correspondiente; la descripción de los primers, incluyendo el nombre y secuencia de nucleótidos se detallan en el Anexo II.

El protocolo de PCR utilizado para la amplificación fue el siguiente: etapa inicial (desnaturalización) en 95°C durante 5 min, seguido por 45 ciclos de amplificación donde se intercalarán 3 temperaturas (unión, alineación y extensión) en 3 periodos de tiempo ($95^{\circ}\text{C}/35$ s, $56^{\circ}\text{C}/35$ s, y $72^{\circ}\text{C}/1:30$ min) además de la extensión final a $72^{\circ}\text{C}/10$ min. Todas las reacciones de amplificación de PCR se realizaron en el equipo BIO-RAD S1000™ Thermal Cycler.

Para la preparación de la mezcla maestra se utilizó la Taq Clontech Advantage® 2 Polymerase Mix. Cada reacción (muestra) fue de 23 μL más 2 μL de DNA (en total 25 μL de rx. por tubo). Por cada mezcla maestra se incluyó un control negativo y un positivo. Para verificar que solo existía un amplicón, se corrió un gel de agarosa al 1% a 100 V durante 30 minutos.

5.7 Productos de amplificación 16s

Una vez obtenidos los productos de PCR se realizó su purificación utilizando el kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

1. Se cortó banda y se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, se agregó 10 μL de membrana binding solution por cada 10 mg de gel, se dio vortex y se incubó a 55°C hasta que se disolvió por completo el gel.
2. El gel disuelto fue transferido a la columna y se incubó por 1 min.
3. Se centrifugó a 13,600 rpm por 1 min, y se descartó el precipitado.
4. Se agregó 700 μL de membrana wash solution y se centrifugó a 13,600 rpm por 1 min, se descartó el precipitado.

5. Se agregó 500 μL de membrana wash solution y se centrifugó a 13,600 rpm por 5 min.
6. Se dejó secar la columna en campana de flujo laminar por 30 min.
7. La columna se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL, y se le agregaron 30 μL de agua de 18Ω estéril, se incubó por 1 min, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min.

Al finalizar el procedimiento se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% a 100 V por 45 min para verificar el resultado, al mismo tiempo que se cuantificó el ADN, utilizando el equipo Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Anexo III), y se realizó una mezcla equimolar para cada muestra.

5.8 Secuenciación masiva

Se preparó el templado en el equipo Ion One Touch (2 T) system, las muestras fueron ajustadas a una misma concentración equimolar, este paso previo a la secuenciación inmoviliza los fragmentos a secuenciar sobre un sustrato específico (ISP's), que permite su amplificación clonal (ePCR) y su posterior enriquecimiento. El enriquecimiento se dio a través del equipo Ion One Touch ES que separa las esferas positivas de las totales. Se lavó el secuenciador de acuerdo a las especificaciones del fabricante, y por último se cargó el templado en el chip 316 y se secuenció; la metodología completa se muestra en el Anexo IV.

5.9 Análisis bioinformática y estadístico

Una vez obtenidos los archivos de secuenciación en formato FASTQ, se procedió con la limpieza de los datos (Figura 4), haciendo uso de scripts propios (metag_cleaner.sh), el cual se encarga de eliminar las bases de calidad inferior a Q20 (1 error cada 100), secuencias inferiores a 130 pb, elimina primers, recorta las secuencias a no más de 180 pb (del extremo 3'), convierte el archivo fastq a fasta y por último renombra cada una de las lecturas con el código establecido y

la terminación .clean.fna., los archivos generados en el paso anterior se someten a una descontaminación de quimeras, mediante el uso del script chimera.sh, el cual elimina quimeras de un archivo multifasta, con base a un archivo de secuencias de referencia del 16s ribosomal (RDP train set), una vez libre de quimeras, mediante el script Eukaryota.sh se separaron las secuencias del gen 18s ribosomal de eucariontes, 16s de mitocondrias o cloroplastos haciendo un blast a la base de datos de SILVA.

Para el procesamiento y análisis de los datos de secuenciación se utilizó el programa QIIME 1.9 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), el cual consideró, que las lecturas de más de 97% de similitud correspondían a la misma unidad taxonómica operacional (OTUs, por sus siglas en inglés), la asignación taxonómica se realizó usando el clasificador uclust y como base de referencia Greengenes, además, genera el microbioma nucleo, curvas de rarefacción, Tablas para el análisis de abundancia relativa y calcula la diversidad alfa y beta.

Se midió el índice Chao 1 el cual es un indicativo de riqueza y el índice de equidad Shannon-Wiener (Tabla 1), a través de una serie de comandos ya establecidos en una terminal.

Tabla 1. Indices para el estudio de la riqueza y diversidad alfa de las comunidades bacterianas de este trabajo.

Chao 1

$$chao1 = S_{obs} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2(F_2 + 1)}$$

F1=OTUs observdas una vez; F2= OTUs observadas dos veces

Shannon-Wiener

$$H = - \sum_{i=1}^s (p_i \log_2 p_i)$$

pi=abundancia proporcional del OTU i, es decir, número de bacterias del OTU i entre el total de bacterias de la muestra.

El cálculo de diversidad beta, se realizó con el método UniFrac, el cual generó matrices de distancia con variantes ponderadas (cuantitativas) y no ponderadas (cualitativas), donde la primera toma en cuenta la abundancia relativa de taxones, mientras que la segunda sólo considera su presencia o ausencia. Para estimar el agrupamiento jerárquico de las comunidades microbianas, se usó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), se realizó un análisis Jackknife para determinar la robustez de los resultados a la profundidad de secuenciación, en el que al azar se elige un número menor de secuencias de cada muestra y se compara el árbol UPGMA resultante de este subconjunto de datos con el árbol que representa todos los datos en conjunto. Este proceso se repite con muchos subconjuntos aleatorios de datos y los nodos de árbol que resultan más consistentes en los conjuntos de datos jackknifed se consideran más robustos.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles), el cual realiza pruebas estadísticas para datos metagenómicos (paramétricos y no paramétricos) de acuerdo a su clasificación taxonómica con un nivel de confianza 95%. La validación estadística del análisis de las comunidades microbianas, se realizó, usando el Test de Welch ($p < 0.05$).

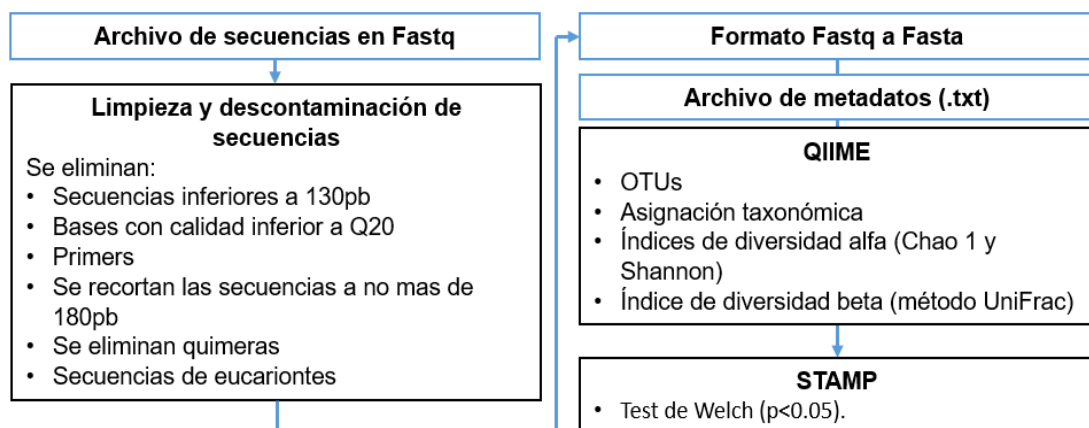


Figura 4. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico.

VI. RESULTADOS

Se obtuvieron 512 muestras (heces, agua, sedimento y alimento), las cuales se desglosan en la Tabla 2.

Tabla 2. Colecta de muestras del sitio de muestreo y bioensayo.

	Heces	Agua	Sedimento
Sitio de muestreo	20	1	1
Bioensayo			
Condiciones experimentales	232	10	5
Cambio de dieta	119	2	1
Cambio de sustrato	98	4	2
Alimento balanceado y calamar fresco	16		

Para los análisis, se tomaron 58 muestras (Tabla 3), 48 de heces de camarón *P. vannamei*, 12 de silvestres y 36 del último día de cada variante del bioensayo, 3 de agua sin sedimento, 2 de agua que contenía sedimento, 3 de sedimento, 1 de alimento balanceado (Camaronina TM 35% de proteína) y 1 de alimento fresco (calamar congelado).

Sin embargo, los contenidos intestinales de los camarones silvestres 22, 24 y 25, del camarón 8 de la variante cambio de dieta, del camarón 12 de la variante cambio de sustrato y de la muestra de sedimento tomada del sitio de muestreo, fueron secuenciadas sin obtener lecturas suficientes para realizar los análisis, quedando un total de 52 muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Código asignado a contenidos intestinales de camarón con su respectivo tratamiento, muestras de agua, sedimento y alimento seleccionadas para secuenciación.

No. De camarón Silvestre	Bioensayo		
	Variante 1 Condiciones experimentales	Variante 2 Cambio de dieta	Variante 3 Cambio de sustrato
2	2 S/S CF	2 S/S AB	2 C/S AB
8	8 S/S CF	-	8 C/S AB
23	23 S/S CF	23 S/S AB	23 C/S AB
12	12 C/S CF	12 C/S AB	-
17	17 C/S CF	17 C/S AB	17 S/S AB
-	24 C/S CF	24 C/S AB	24 S/S AB
1	1 S/S AB	1 S/S CF	1 C/S CF
16	16 S/S AB	16 S/S CF	16 C/S CF
-	25 S/S AB	25 S/S CF	25 C/S CF
6	6 C/S AB	6 C/S CF	6 S/S CF
13	13 C/S AB	13 C/S CF	13 S/S CF
-	22 C/S AB	22 C/S CF	22 S/S CF

Tipo de muestra	Código de muestra	No. de muestra analizada
Calamar fresco	CF	1
Alimento balanceado	AB	1
Sedimento sitio de muestreo	S	-
Agua sitio de muestreo	ASM	1
Agua con sedimento de la variante condiciones experimentales	ACS	1
Agua sin sedimento de la variante condiciones experimentales	ASS	1
Sedimento de la variante condiciones experimentales	S	1
Agua con sedimento de la variante cambio de sustrato	ACS	1
Agua sin sedimento de la variante cambio de sustrato	ASS	1
Sedimento de la variante cambio de sustrato	S	1

S/S: Sin sedimento; C/S: Con sedimento; AB: Alimento balanceado; CF: Calamar fresco; - muestra que no se obtuvieron secuencias suficientes para análisis posteriores.

6.1 Extracción de ADN metagenómico

Se considera como ADN de buena calidad cuando la proporción entre ambos es de 1.7-1.9. El valor promedio de pureza de ADN que se obtuvo de las muestras de heces de camarón *P. vannamei* fue de 2.12 (1.57-3.05), mientras que la concentración promedio fue de 155.43 ng/μL (48.5-686.65 ng/μL). Las muestras obtenidas de agua registraron una pureza promedio de 2.00 (1.08-2.37) y una concentración promedio de 64.70 ng/μL (10.65-112.3 ng/μL), para las muestras de sedimento el valor promedio de pureza fue de 1.41 (1.40-1.45) y el promedio

de concentración fue de 1033.13 ng/ μ L (376.1-2112.9 ng/ μ L), para la muestra de alimento comercial el promedio de pureza y concentración fue de 1.31 y 6054.05 ng/ μ L respectivamente y para la muestra de alimento fresco se registró un promedio de pureza y concentración de 1.50 y 342.6 respectivamente (Anexo V).

6.2 Secuenciación masiva

6.2.1 Amplificación y purificación del gen 16s

Se amplificó la región V3 del gen 16S utilizando los primers diseñados (Huse *et al.* 2008) que amplifican un tamaño cercano a 200pb. Posteriormente se purificaron las muestras y se procedió a cuantificarlas con el equipo Qubit® dsDNA HS Assay Kit, el promedio obtenido fue de 37,070.18 ng/mL (10,300-280,000 ng/mL) (Anexo VI).

6.2.2 Cargado del chip 316

Una vez que todas las muestras estuvieron cuantificadas y diluidas a la misma concentración equimolar (20 pM/L), se realizó el enriquecimiento. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en diferentes chips de secuenciación, alcanzando un cargado de 53% (Fig. 5 a), 22% (Fig. 5 b), 42% (Fig. 5 c) y 64% (Fig. 5 d) mientras que la moda del tamaño de las lecturas fue de 198 pb (a y b) y 196 pb (c y d). El cargado es un punto clave, ya que repercute en una secuenciación de alta calidad y una mayor cantidad de lecturas.

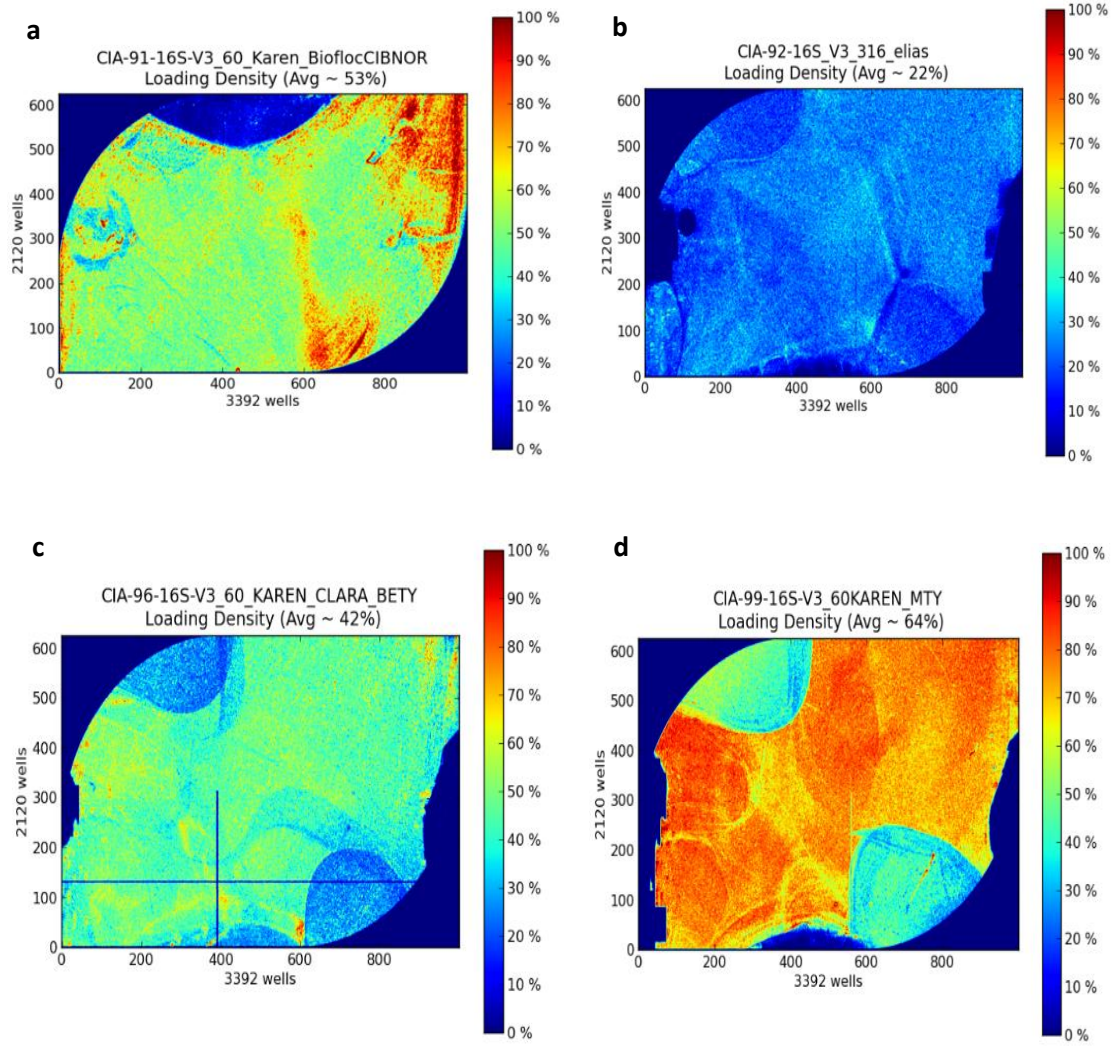


Figura 5. Cargado de chip 316.

6.2.3 Reporte de secuencias

Cada chip Ion 316 cuenta con un aproximado de 6, 337,389 pozos donde en cada uno puede cargarse una esfera Ion (“Ion sphere”, ISP) para ser tomada como una lectura. Para el chip con 53% de cargado de total, se cargaron 3,357,407 celdas con ISPs, de las cuales el 99.80% fueron ISPs vivas, de las cuales se descartan las ISPs control, las de baja calidad, policlonales y dimeros de primer, quedando una librería final con 2,337,909 ISPs (Tabla 4), de igual manera para los demás chips.

Tabla 4. Valores de secuenciación separadas por corrida.

	Chip 53%		Chip 22%		Chip 42%		Chip 64%	
Celdas del chip	6,337,389		6,337,389		6,337,389		6,337,389	
Celdas con ISPs	3,364,766	53.10%	1,408,080	22.20%	2,676,922	42.20%	4,028,703	63.30%
ISPs vivas	3,357,407	99.80%	1,353,826	96.10%	2,655,109	99.20%	4,006,018	99.40%
ISPs control	43,574	1.30%	212,874	15.70%	140,316	5.30%	86,788	2.20%
Librería	3,313,833	98.70%	1,140,952	84.30%	2,514,793	94.70%	3,919,230	97.80%
Policlonales	677,13	20.40%	601,368	52.70%	783,262	31.10%	867,526	22.10%
Baja calidad	298,646	9.00%	150,915	13.20%	198,609	6.70%	77,382	2.00%
Dímeros	148	0%	40	0%	6,247	0.2%	3,849	0.1%
Secuencias obtenidas	2,337,909	70.50%	388,629	34.10%	1,556,675	61.90%	2,970,473	75.80%

Las librerías finales, aun contenían secuencias que no fueron asignadas a ningún código de barras y secuencias de muestras que no pertenecían a este estudio, por lo tanto, para proceder con el análisis bioinformático fue necesario descartarlas. De las 52 muestras secuenciadas se obtuvieron un total de 3,081,692 lecturas, para el chip 316 con un cargado del 53%, las secuencias útiles obtenidas fueron de 542,522, para el chip con 22%, se obtuvieron 294,234, del chip con un 42% 477,091 y para el de 64% 1,767,845 de secuencias útiles (Anexo I).

6.3 Análisis bioinformático

6.3.1 Limpieza de secuencias

Tras el filtrado de longitud y calidad, se obtuvieron 1,963,153 secuencias, con longitud mínima de 130 y una máxima de 180 bases, con un promedio de 171.89 bases. Posterior a la descontaminación de quimeras, quedo un total de 1,882,558 secuencias, además se asignaron 13,535 secuencias a eucariontes, dando un total de 1,864,496 secuencias para realizar el análisis en QIIME (Figura 6; Anexo 2).

Los contenidos intestinales de los camarones 23 y 25 de la variante condiciones experimentales, tuvieron el valor máximo (179,854 secuencias) y mínimo (10,583 secuencias) respectivamente.

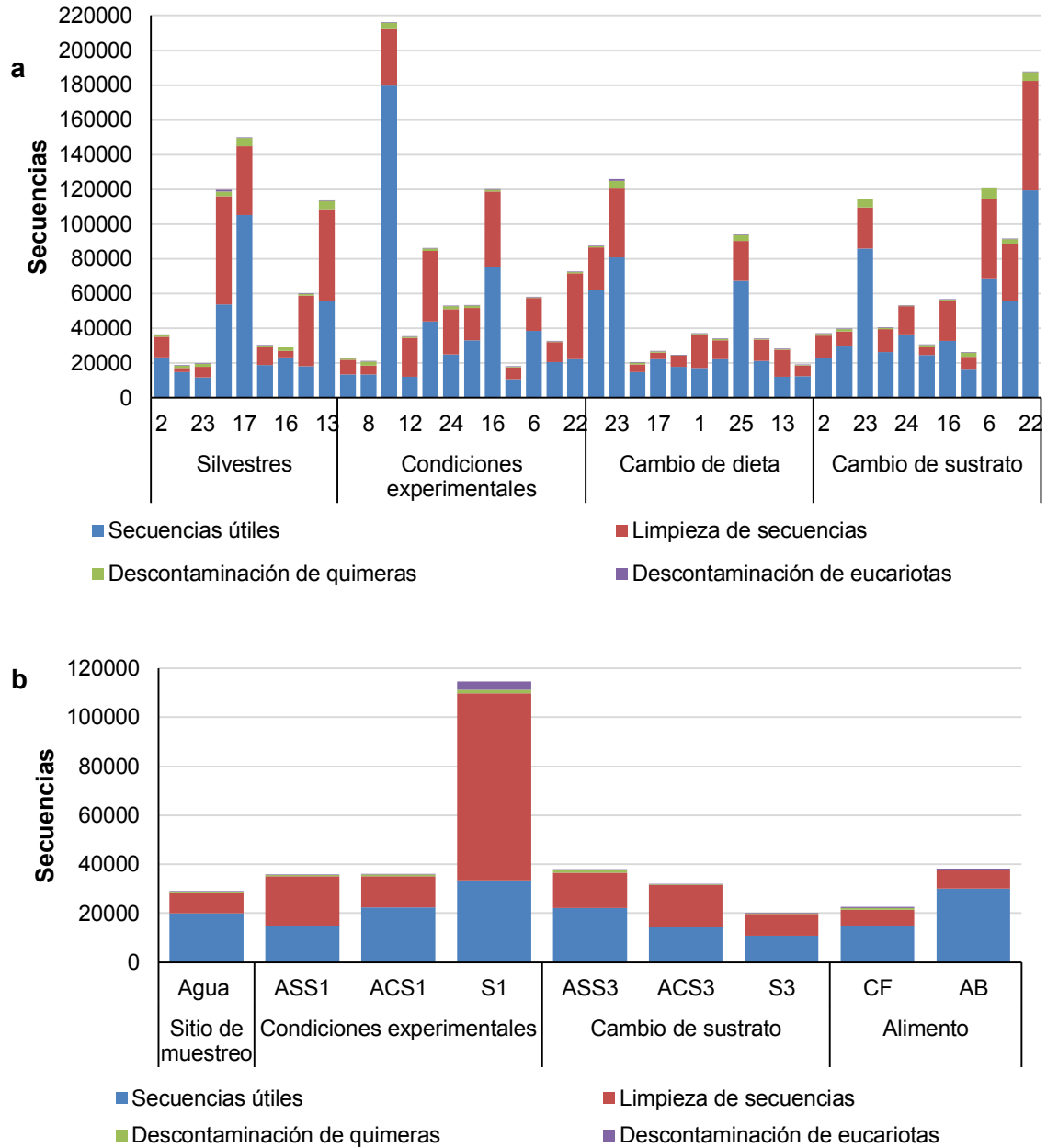


Figura 6. Lecturas útiles, y las eliminadas por limpieza y descontaminación obtenidas por muestra. a) secuencias de los contenidos intestinales de camarón. b) secuencias de las muestras de agua, sedimento y alimento. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera; C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera; S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera; C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera; A0 agua del sitio de muestreo; ASS1 agua sin sedimento; ACS1 agua con sedimento; S1 sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

6.3.2 Rarefacción

Para evaluar el esfuerzo de muestreo efectuado, se realizaron curvas de rarefacción para los contenidos intestinales de camarones silvestres y para cada una de las variantes del bioensayo, divididos de acuerdo al número de secuencias por muestra. Las curvas de rarefacción muestran el número de especies observadas (OTUs) con respecto al número de secuencias obtenidas por muestra (Figura 7-11). Mientras mayor es la profundidad de muestreo, mayor será el número de especies observadas, lo que provoca una mayor pendiente en la curva, sin embargo, llega un momento en el cual, aunque se incremente el esfuerzo de muestreo, el número de OTUs observados deja de incrementar lo que provoca una menor pendiente, es decir, alcanzará un máximo y se estabilizará en una asíntota (Espinosa, 2003).

Las muestras de contenido intestinal provenientes del medio silvestre fueron las que presentaron mayor cantidad de OTUs observadas con un promedio de 1,663 (1,093-2,448) y un promedio de 19,626 secuencias, seguido de las muestras provenientes de la variante del bioensayo cambio de sustrato con 1,335 (852-1,988) especies observadas y un promedio de 28,675 secuencias por muestra, la variante del bioensayo condiciones experimentales con un promedio de 860 (397-1241) y un promedio de 18,762 secuencias, por último la variante cambio de dieta con un promedio de especies observadas de 820 (447-992) y un promedio de 17,167 secuencias.

Tabla 5. Pendientes de las curvas de rerefacción de las muestras de agua, sedimento y alimento.

Tratamiento		No. de secuencias	Pendiente
Sitio de muestreo	Agua	19,857	0.0151
Condiciones experimentales	ASS	14,917	0.0242
	ACS	22,269	0.0290
	S	33,306	0.0696
Cambio de sustrato	ASS	22,068	0.0422
	ACS	14,117	0.0349
	S	10,921	0.1149
Alimento	CF	14,856	0.0279
	AB	30,084	0.0101

CF calamar fresco; AB alimento balanceado; ASS agua sin sedimento; ACS agua con sedimento; S sedimento.

Tabla 6. Pendientes de las curvas de rarefacción de los contenidos intestinales de camarones silvestres y de bioensayo.

Tratamiento	No de camarón	No. de secuencias	Pendiente	Tratamiento	No de camarón	No. de secuencias	Pendiente	
Silvestres	2	23,271	0.056	Cambio de dieta	S/S AB	2	62,253	0.013
	8	14,729	0.125		23	80,974	0.026	
	23	11,661	0.125		12	14,781	0.051	
	12	53,590	0.047		C/S AB	17	22,330	0.039
	17	105,283	0.028		24	17,997	0.032	
	1	18,710	0.071		1	17,273	0.026	
	16	23,258	0.097		S/S CF	16	22,327	0.039
	6	18,220	0.062		25	67,205	0.027	
	13	55,708	0.064		6	21,278	0.033	
					C/S CF	13	11,983	0.056
			22	12,423	0.043			
Condiciones experimentales	S/S CF	2	13,440	0.056	2	22,022	0.111	
		8	13,351	0.062	C/S AB	8	30,137	0.099
		23	179,854	0.014	23	86,074	0.033	
	C/S CF	12	12,152	0.059	S/S AB	17	26,264	0.053
		17	43,938	0.046	24	36,497	0.033	
		24	24,281	0.045	C/S CF	1	24,594	0.068
	S/S AB	1	33,201	0.048	16	32,790	0.046	
		16	75,075	0.020	25	16,336	0.123	
		25	10,583	0.041	S/S CF	6	68,236	0.036
	C/S AB	6	38,501	0.030	13	55,898	0.020	
		13	20,513	0.041	22	119,467	0.023	
		22	22,103	0.044				

S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

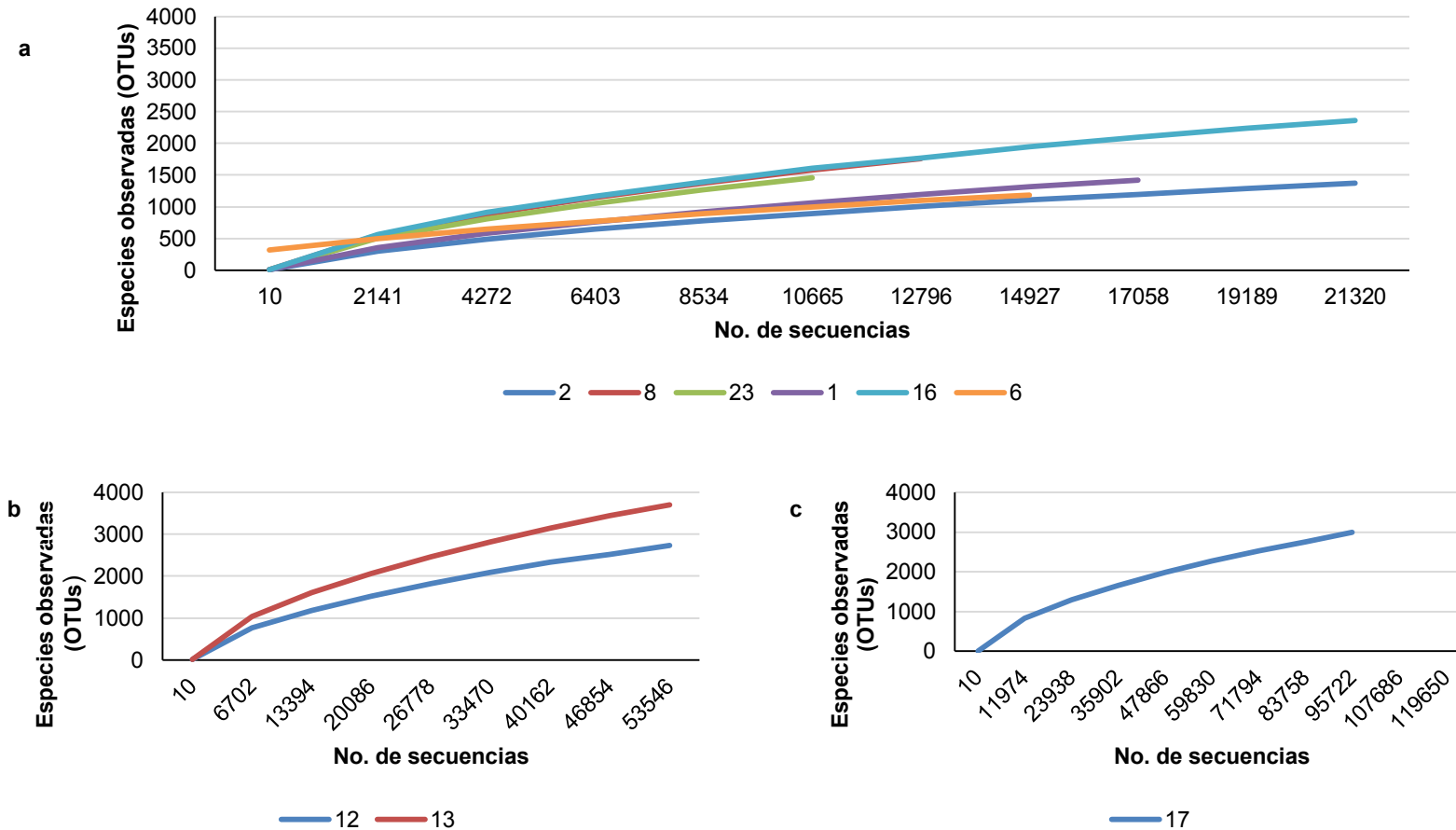


Figura 7. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones silvestres. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias mayores a 50,000; c) contenidos intestinales con número de secuencias superiores a 100,000.

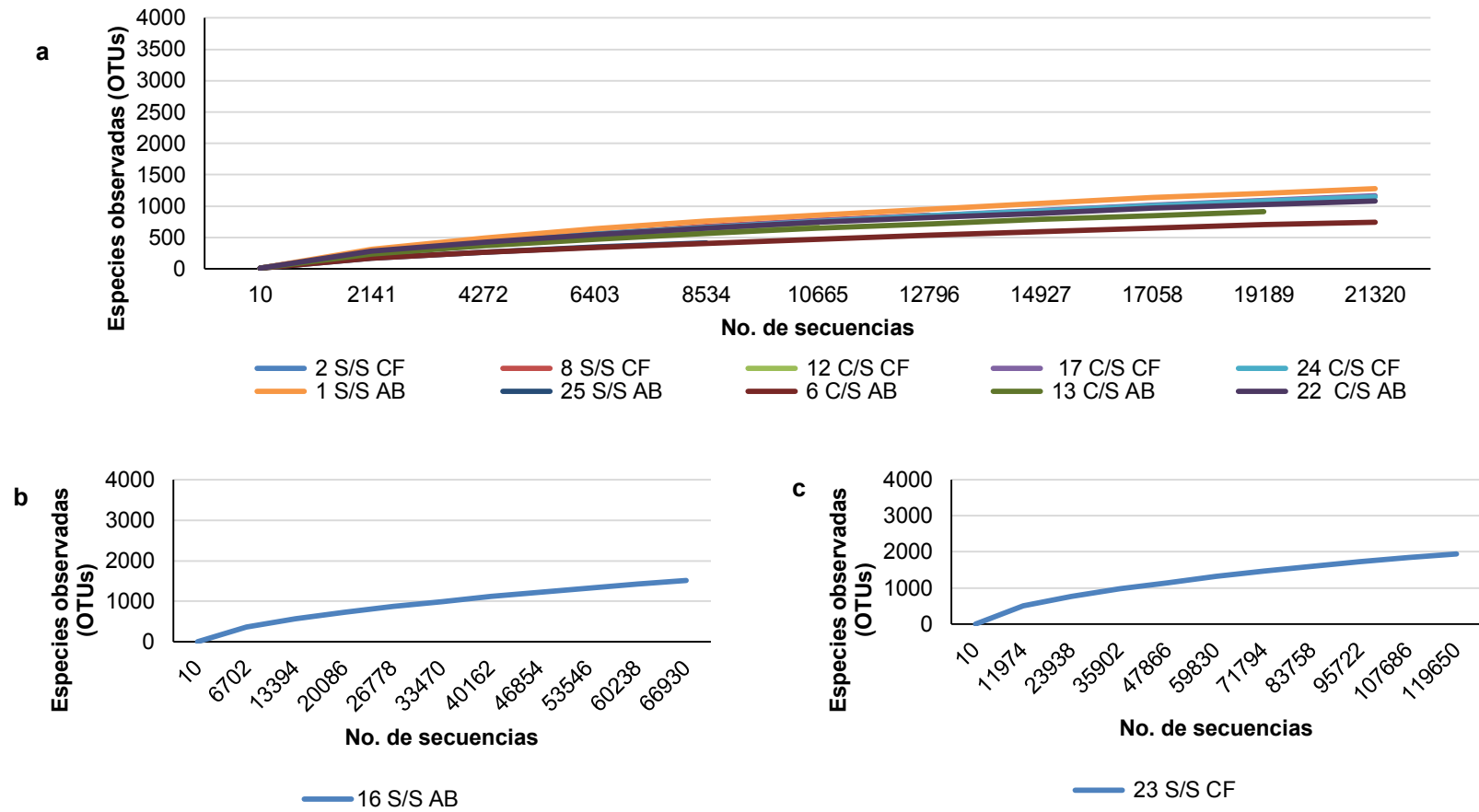


Figura 8. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones provenientes de la variante del bioensayo condiciones experimentales. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias mayores a 50,000; c) contenidos intestinales con número de secuencias superiores a 100,000.

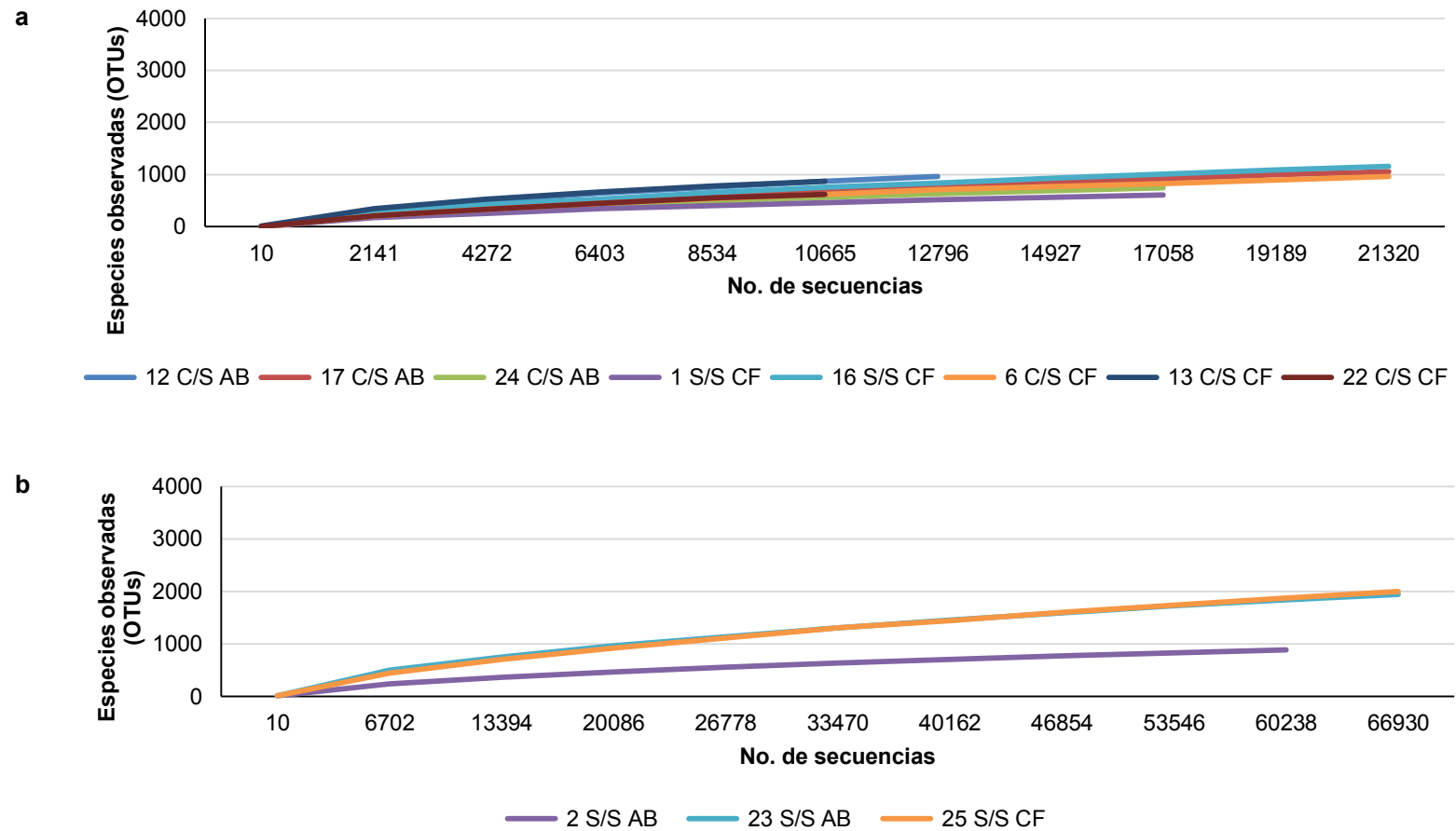


Figura 9. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones provenientes de la variante del bioensayo cambio de dieta. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias mayores a 50,000.

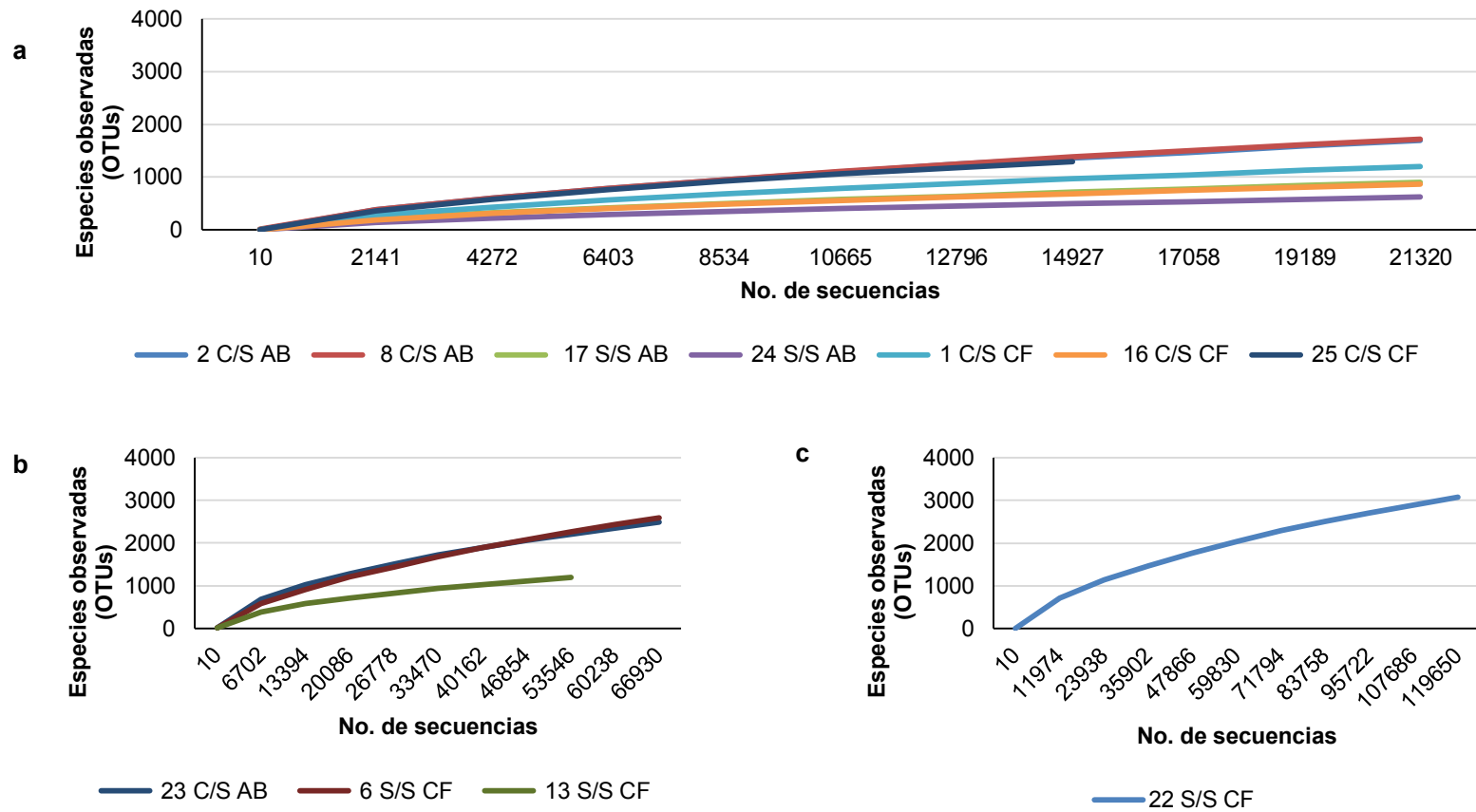


Figura 10. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en los contenidos intestinales de camarones provenientes de la variante del bioensayo cambio de sustrato. a) contenidos intestinales con número de secuencias menores a 50,000; b) contenidos intestinales con número de secuencias mayores a 50,000; c) contenidos intestinales con número de secuencias superiores a 100,000.

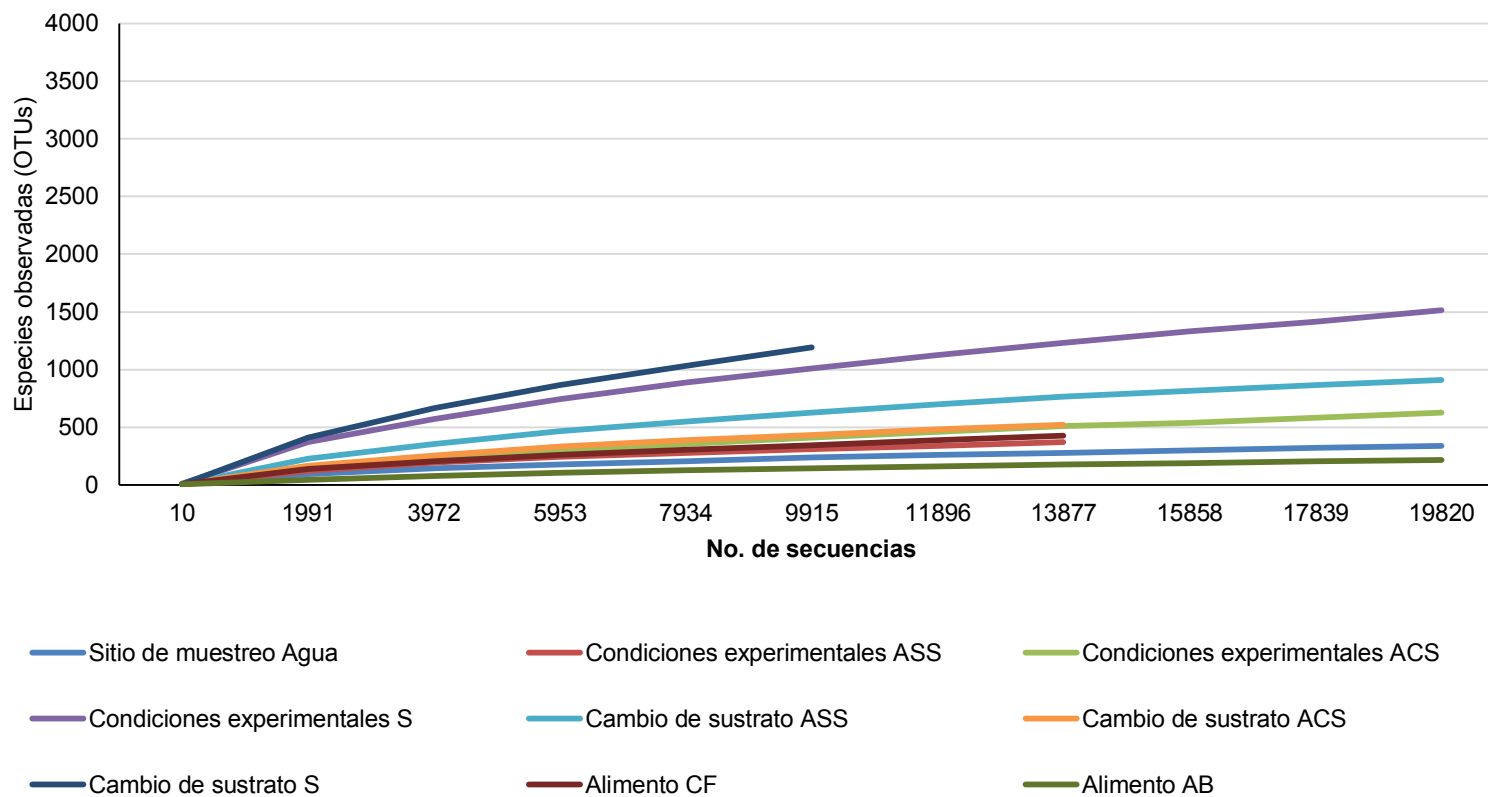


Figura 11. Curvas de rarefacción del número de OTUs identificadas con respecto al número de secuencias presentes en las muestras de agua, sedimento y alimento. ASS agua sin sedimento; ACS agua con sedimento; S sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

6.3.3 Asignación de OTUs

Con el programa QIIME 1.9, se asinó, que las lecturas de más de 97% de similitud correspondían a la misma unidad taxonómica operacional (OTUs, por sus siglas en ingles), que representan un grupo de lecturas que probablemente pertenezcan al mismo nivel jerárquico taxonómico ya sea dominio, filo, clase, orden, familia, género o especie (Sogin *et al.*, 2006).

El mayor número de taxas encontrados se presentó en los contenidos intestinales de los camarones silvestres, seguido por la variante de bioensayo cambio de sustrato, condiciones experimentales y por último la variante cambio de dieta (lista completa de taxas encontrados en Anexo 3).

Para cada jeraquia taxonómica se obtuvieron las secuencias identificadas, donde la variante cambio de dieta presentó el mayor número de secuencias identificadas y el menor los contenidos intestinales de camarones silvestres, lo cual pudo deberse a que este grupo tenia menos camarones que el resto, además, se obtuvieron las secuencias no identificadas debido a la poca resolución, las cuales aumentaron conforme se disminuía el nivel taxonómico y se obtuvieron aquellas secuencias que no pudieron ser clasificadas, las cuales no son catalogadas como bacterias (Tabla 7).

Tabla 7. Taxas identificados, secuencias identificadas, no identificadas y no clasificadas de las muestras de heces de camarón *P. vannamei*.

Silvestres	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Taxa identificado	55	148	215	262	343	73
Secuencias identificadas	322,335	322,169	305,614	282,234	155,765	6,061
Secuencias no clasificadas	2,172	2,172	2,172	2,172	2,172	2,172
Secuencias no identificadas	14	180	16,735	40,115	166,584	316,288
Bioensayo						
Condiciones experimentales						
Taxa identificado	40	107	158	207	262	60
Secuencias identificadas	485,323	485,204	465,734	296,408	166,768	12,539
Secuencias no identificadas	2,349	2,349	2,349	2,349	2,349	2,349
Secuencias no clasificadas	6	125	19,595	188,921	318,561	472,790
Cambio de dieta						
Taxa identificado	36	94	138	190	244	52
Secuencias identificadas	347,491	347,442	340,895	308,157	229,346	3,130
Secuencias no identificadas	1,587	1,587	1,587	1,587	1,587	1,587
Secuencias no clasificadas	5	54	6,601	39,339	118,150	344,366
Cambio de sustrato						
Taxa identificado	48	114	177	222	272	45
Secuencias identificadas	514,679	514,484	500,787	482,456	335,742	4,402
Secuencias no identificadas	3,828	3,828	3,828	3,828	3,828	3,828
Secuencias no clasificadas	9	204	13,901	32,232	178,946	510,286

Para representar la estructura bacteriana, se tomaron en cuenta aquellos taxas que superan el 1% de OTUs asignadas. Para las muestras de contenido intestinal de camarones *P. vannamei* de origen silvestre y de bioensayo, se encontró que el 99% de las secuencias fueron asignadas al dominio bacteria mientras que en solo el 1% fueron secuencias no asignadas (Anexo 4).

Las muestras de contenido intestinal de camarones silvestres presentaron los filos *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Cyanobacteria* (Figura 12). Los predominantes para todas las muestras de heces de origen silvestre fueron *Proteobacteria* (entre el 68-91%), *Cyanobacteria* (2-13%) y *Bacteroidetes* (2-12%). Mientras que los filos en el contenido intestinal de camarones de bioensayo fueron *Tenericutes*, *Acidobacteria*, *GN02*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* y *Proteobacteria*, siendo el predominante *Proteobacteria* donde

su presencia en la mayoría de las muestras fue mayor del 80% del total (Figura 13).

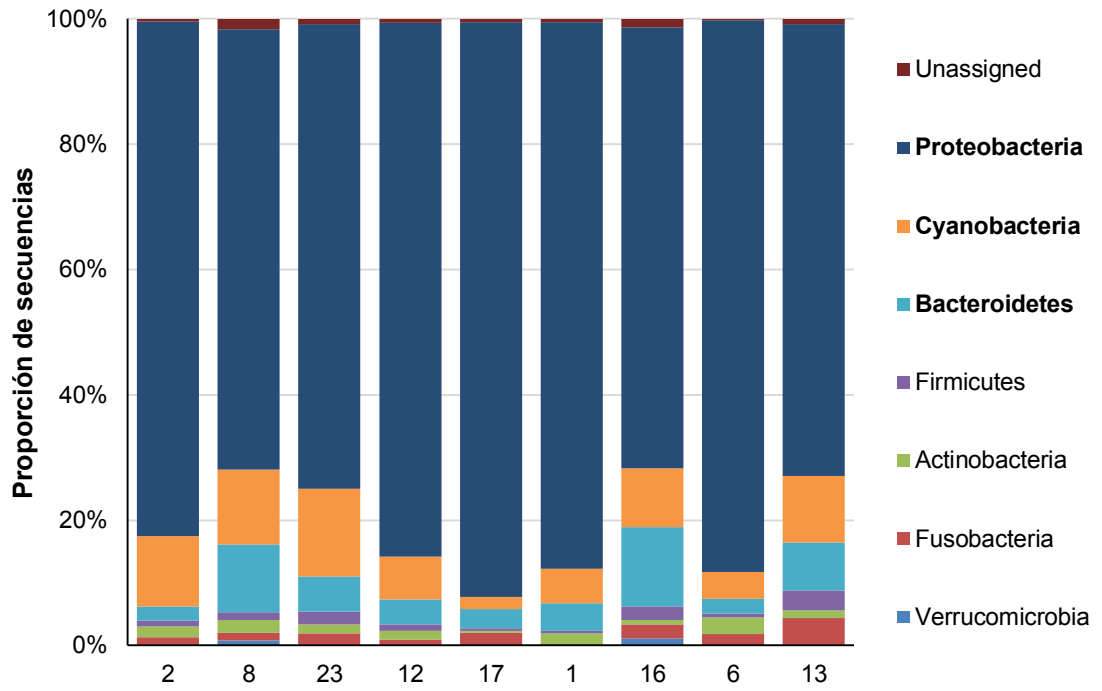
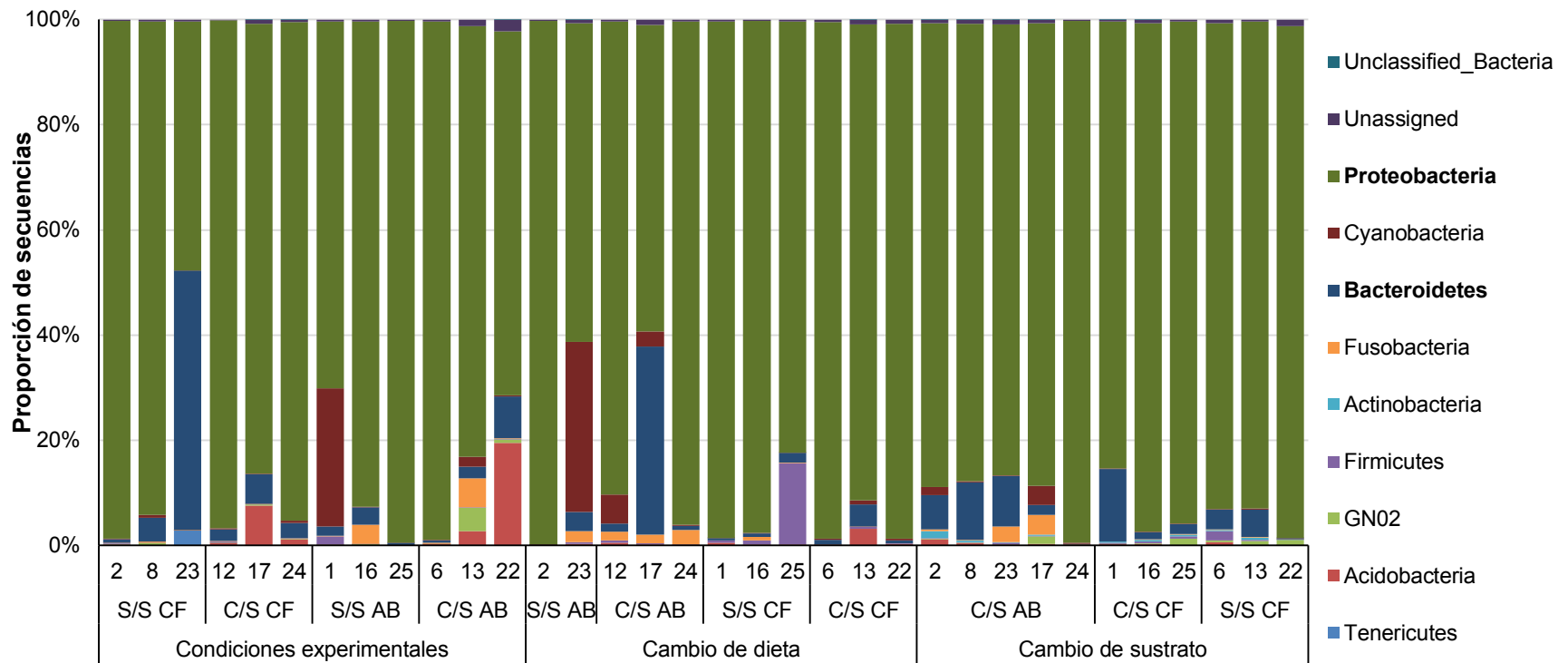


Figura 12. Estructura bacteriana del contenido intestinal (heces) de camarón *P. vannamei* de origen silvestre a nivel filo. En negrita se muestran los taxos más representativos.



Para el contenido intestinal de camarones silvestres, se encontraron 14 clases que superan el 1% de OTUs asignadas (Anexo 5), donde se observó, que las clases predominantes fueron *Gammaproteobacteria* (45-86%) y *Betaproteobacteria* (2.71-63%), seguido de *Alphaproteobacteria*, *Flavobacteriia*, *Synechococcophycideae* y *Fusobacteriia* (entre 1 al 7%), y por último, con una abundancia relativa entre 0.1 a 2.7% del total, las clases *Epsilonproteobacteria*, *Oscillatoriothymiceae*, *Deltaproteobacteria*, *Cytophagia*, *Clostridia*, *Actinobacteria* y [*Saprospirae*].

Para el caso de las muestras de contenido intestinal de camarones de bioensayo (Anexo 6), fueron 17 clases, siendo la más predominante *Gammaproteobacteria* (40-96%), a excepción de 6 camarones, los cuales 4 tuvieron predominancia de *Betaproteobacteria* (40-54%), 1 camarón presentó predominancia de la clase *Bacteroidia* con un 49% del total y 1 con *Alphaproteobacteria* con un 55% de abundancia relativa.

Los órdenes observados para los contenidos intestinales de camarones silvestres fueron 22, de forma general, lo predominantes fueron *Vibrionales* (4-75%), *Burkholderiales* (2.50-63%) y *Alteromonadales* (2.20 – 11%), siendo las muestras de heces de camarón silvestre 1 y 6 las que cuentan con mayor presencia de *Burkholderiales* en comparación con el resto de las muestras. Seguido por el orden *Flavobacteriales* (1.28-7.92%), *Stramenopiles* (0.50-5.91%), *Pseudomonadales* (0.79-4.35%), *Synechococcales* (0.90-4.46%), *Fusobacteriales* (0.11-4.16%) y *Oceanospirillales* (0.36-3.34%), mientras que el resto están en un intervalo de 0.12-3% del total. En los contenidos intestinales de camarones provenientes de bioensayo, se encontraron 26 órdenes. En la variante del bioensayo condición experimental, el camarón 8, presentó el orden predominante *Rhodobacterales* con un 49% del total, el camarón 23 *Bacteroidales*, y los camarones 1 y 24 *Burkholderiales*; en la segunda variante del bioensayo cambio de dieta, los camarones 12 y 13 presentaron *Burkholderiales*, como orden predominante; por último, en la variante del

bioensayo cambio de sustrato, el camarón 13 prevaleció con la predominancia de *Burkholderiales*. En el resto de los camarones el más predominante fue el orden *Vibrionales* (33-94%), como se observa en el Anexo 7.

Las familias más representativas en los contenidos intestinales de camarones silvestres, fueron *Alcaligenaceae* (24-52%), *Vibrionaceae* (16-33%) y *Pseudoalteromonadaceae* (1.76-69%), seguido por *Synechococcaceae*, *Alteromonadaceae*, *Flavobacteriaceae* (0.63-5.58%), mientras que *Cryomorphaceae*, *Moraxellaceae*, *Rhodobacteraceae* cuentan con una frecuencia relativa de 0.44-3.42%. El resto de las familias observadas están en un intervalo de 0.04 - 3.88% de frecuencia relativa (Figura 14). En los contenidos intestinales de camarones provenientes del bioensayo se observaron 35 familias (Anexo 8), siendo las familias predominantes *Vibrionaceae* (33-73%), *Pseudoalteromonadaceae* (32-62%), *Alcaligenaceae* (26-49).

En la estructura bacteriana a nivel género, se observó que las secuencias no clasificadas de las muestras de contenidos intestinales de camarón silvestre y de bioensayo se conforman del 13% al 85% de la proporción de secuencias en general. Las muestras provenientes del medio silvestre se observó mayor frecuencia de los generos *Vibrio* y *Achromobacter*; mientras que las muestras de contenidos intestinales de camarones sometidos a los diferentes tratamientos del bioensayo, el género *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* fueron los predominantes.

La estructura bacteriana de todas las muestras de contenidos intestinales de camarón, nos muestran que el filo *Proteobacteria*, la clase *Gammaproteobacteria*, el orden *Vibrionales* y la familia *Vibrionaceae* fueron los taxos dominantes en todas las muestras de los contenidos intestinales de camarón (Figura 16).

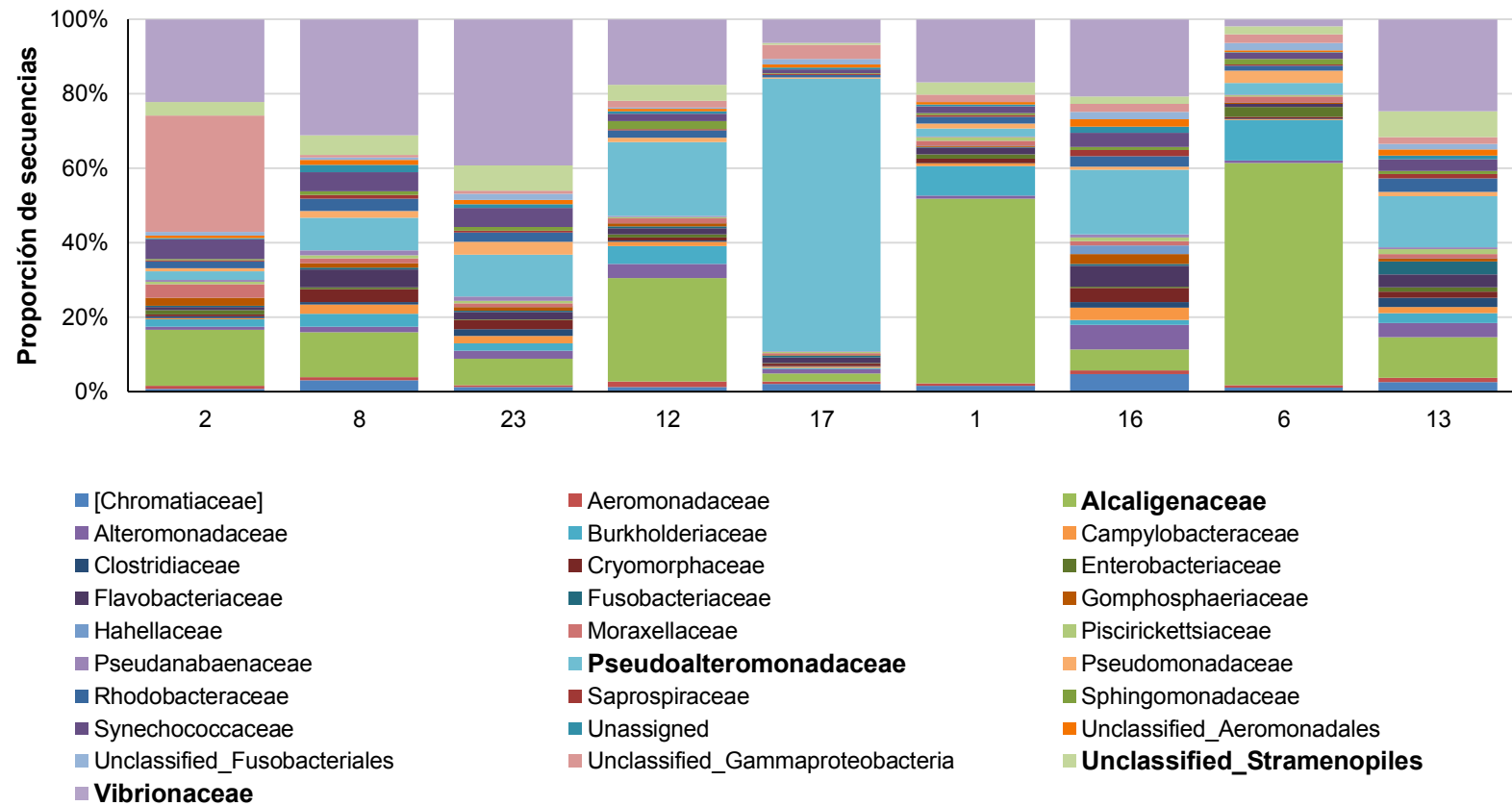


Figura 14. Estructura bacteriana de camarón *P. vannamei* de origen silvestre a nivel familia. En negrita se muestran los taxos más representativos.

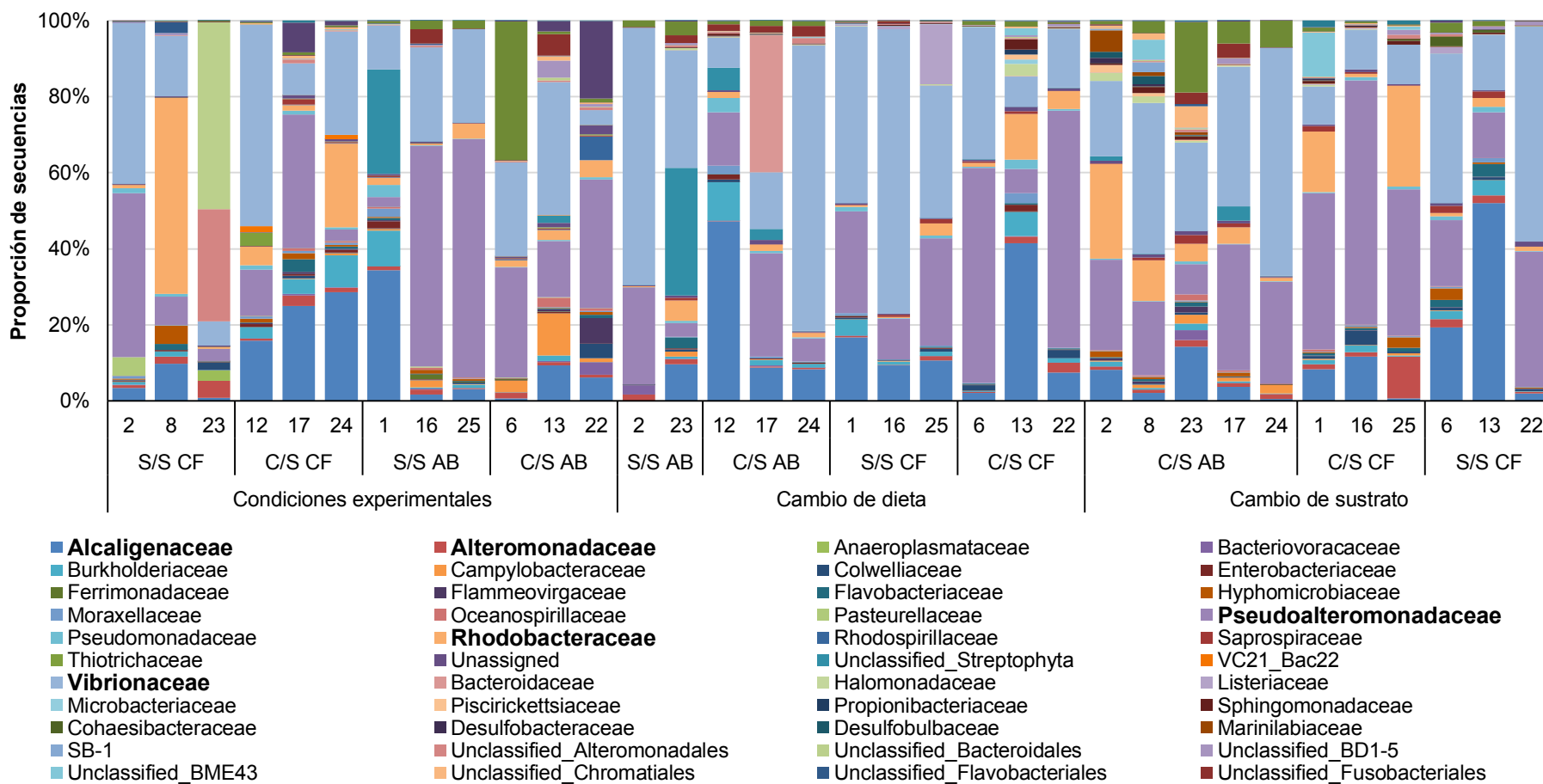


Figura 15. Estructura bacteriana del contenido intestinal (heces) de camarón *P. vannamei* a nivel familia, de las muestras del bioensayo. En negrita se muestran los taxos más representativos. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera; C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera; S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera; C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera.

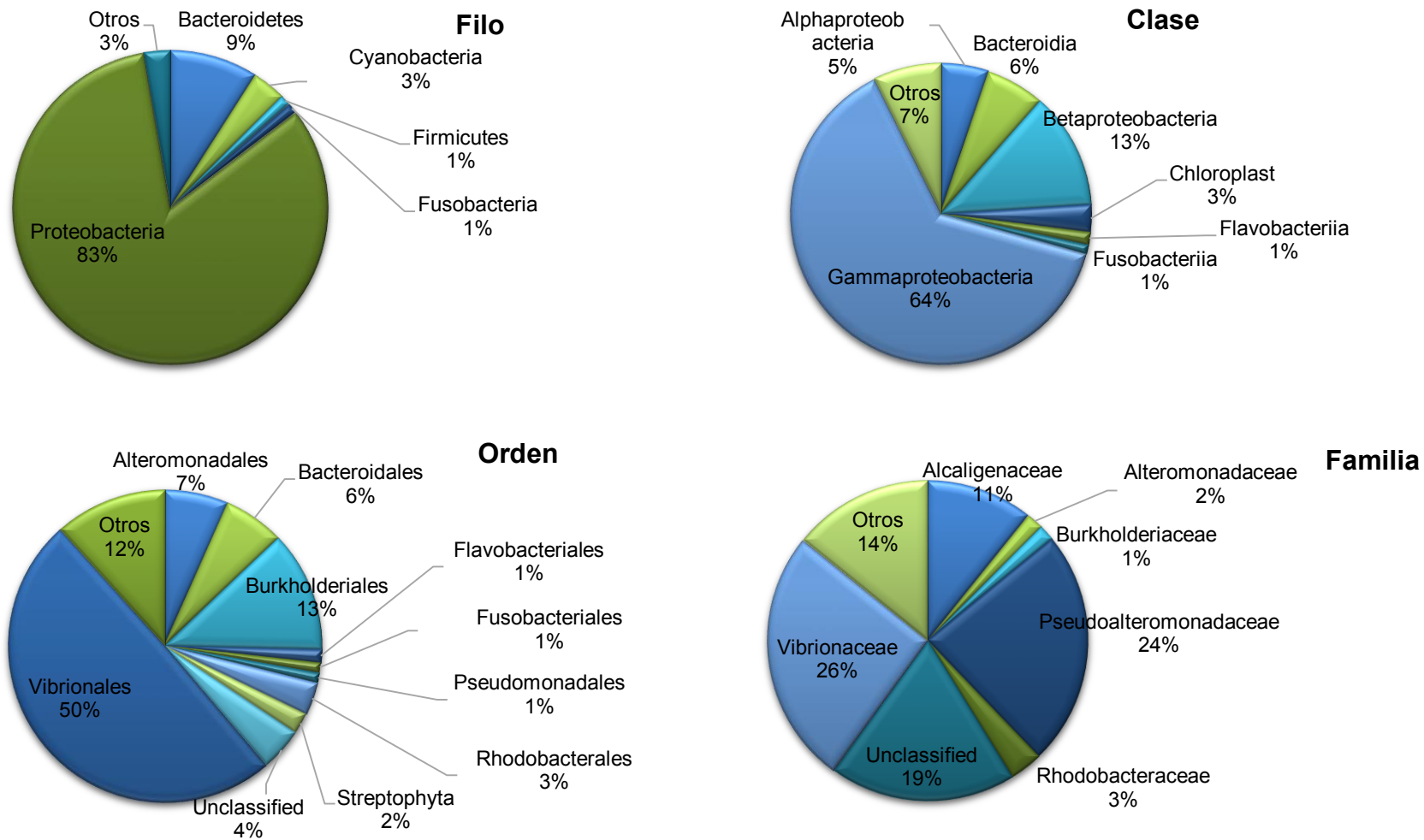


Figura 16. Estructura bacteriana de camarón *P. vannamei* desde filo hasta familia.

Adicionalmente se estudiaron las muestras de agua, sedimento a diferentes tiempos para determinar los cambios a lo largo del bioensayo y las muestras de alimento (Figura 17). En la muestra de agua proveniente del sitio de muestreo, la familia predominante fue *Enterobacteriaceae*, mientras que para las muestras de agua (con y sin sedimento) de las variantes del bioensayo, las familias predominantes fueron *Alcaligenaceae* y *Burkholderiaceae*, las cuales fueron silimilares a lo largo del bioensayo a excepción de la muestra de agua sin sedimento de la variante del bioensayo cambio de sustrato, donde las familias dominantes fueron *Pseudoalteromonadaceae* y *Pseudomonadaceae*, dicha discrepancia se pudo deber a como se tomó la muestra. El sedimento tomado de la variante condiciones experimentales, la familia dominante fue *Vibrionaceae* y *Pseudoalteromonadaceae*, mientras que en la variante cambio de sustrato, no realizó la clasificación a nivel familia pero el orden dominante fue *Bacteroidales*, se observaron cambios en el porcentaje de abundancia de las familias *Alcaligenaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* y *Vibrionaceae*, a medida que transcurrió el tiempo. En el alimento calamar fresco las familias dominantes fueron *Alcaligenaceae* y *Burkholderiaceae* y en el alimento balanceado *Streptophyta*.

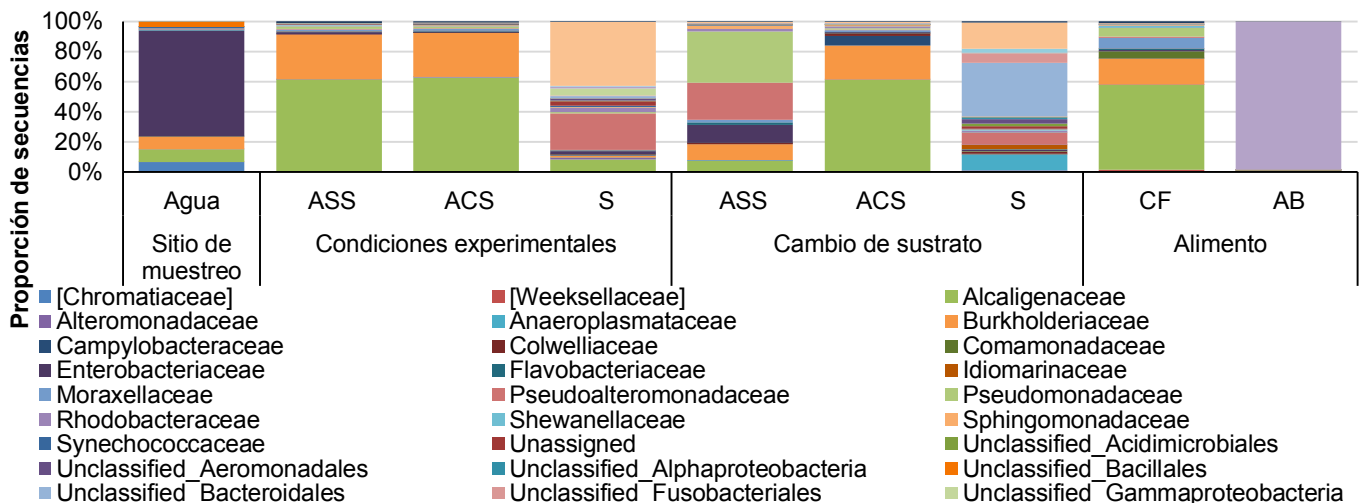


Figura 17. Estructura bacteriana a nivel familia de las muestras de agua (con y sin sedimento), sedimento y alimento. ASS agua sin sedimento; ACS agua con sedimento; S sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

6.3.4 Estructura taxonómica de la microbiota y diversidad alfa de los contenidos intestinales de camarón por grupo

Se utilizó el programa STAMP para obtener las diferencias significativas ($p < 0.05$) de la estructura bacteriana, donde, sólo se tomaron en cuenta aquellos taxa a nivel familia y las proporciones medias de las secuencias que superaron el 1%. Para determinar la diversidad alfa se usó QIIME 1.9, se seleccionó el índice Chao 1, que proporciona una medida de la riqueza, mientras que el índice de diversidad de Shannon proporciona una medida integradora de uniformidad y riqueza, dichos índices se realizaron tomando en cuenta el mismo número de secuencias (9,318) con la finalidad de controlar el esfuerzo de muestreo.

El análisis se realizó con la finalidad de evaluar, de forma sucesiva los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de los camarones. Primero se evaluó el cambio que sufrieron los camarones silvestres al ser sometidos a las condiciones experimentales (S/S CF; C/S CF; S/S AB; C/S AB), seguido por el cambio de las condiciones experimentales a cambio de dieta (CF -> AB; AB -> CF) y por último el cambio de la dieta al cambio de sustrato (S/S -> C/S; C/S -> S/S), como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Diseño experimental

Grupo	Silvestres	Variante del Bioensayo					
		Cambio	Condiciones experimentales	Cambio	Cambio de dieta	Cambio	Cambio de sustrato
1	Silvestre	→	S/S CF	→	S/S AB	→	C/S AB
2	Silvestre	→	C/S CF	→	C/S AB	→	S/S AB
3	Silvestre	→	S/S AB	→	S/S CF	→	C/S CF
4	Silvestre	→	C/S AB	→	C/S CF	→	S/S CF

S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado

Grupo 1.

Se observó que los camarones silvestres, se distribuyeron hacia el mismo cuadrante de la gráfica de componentes principales (Figura 18). Cuando fueron sometidos a la variante de condiciones experimentales (sin sedimento calamar fresco), se observó que los camarones 2 y 8 se agruparon, mientras que el 23 se separó, en la variante cambio de dieta (sin sedimento- calamar fresco a sin sedimento- alimento balanceado) los camarones no presentaron ninguna agrupación, y en la variante cambio de sustrato (sin sedimento- alimento balanceado a con sedimento- alimento balanceado) los organismo se reagruparon en el mismo cuadrante de la gráfica ACP.

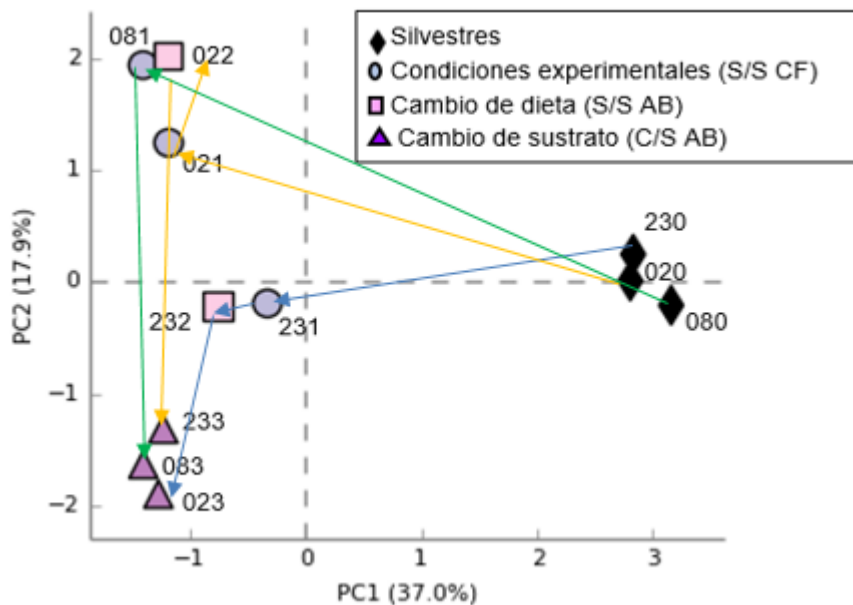


Figura 18. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando camarones silvestres se sometieron al tratamiento sin sedimento alimentado con calamar fresco (S/S CF), posteriormente se hizo un cambio de dieta: sin sedimento alimento balanceado (S/S AB) y por último un cambio de sustrato: sin sedimento a una pecera con sedimento. Flecha azul camarón 23; flecha verde camarón 8; flecha naranja camarón 2.

Cuando los camarones silvestres, se alimentaron con calamar fresco y sin sedimento en la pecera, se presentaron diferencias estadísticas en *[Chromatiaceae]* ($P= 0.031$), la cual disminuyó al someter a los camarones silvestres a condiciones experimentales y las familias *Vibrionaceae* ($P= 0.021$) y

Pseudoalteromonadaceae ($P= 0.021$) aumentaron significativamente al someter a camarones silvestres a condiciones experimentales (Figura 19).

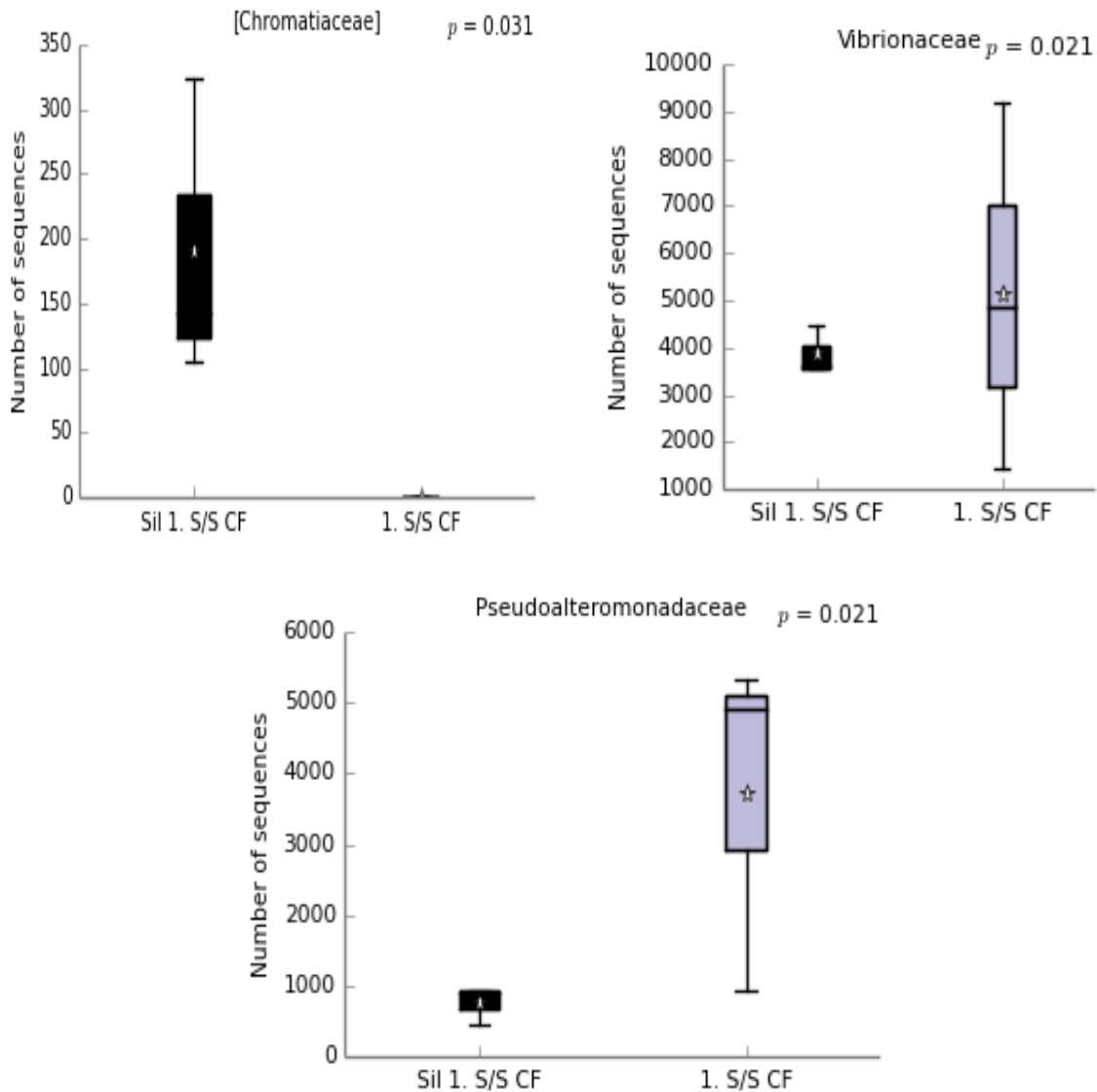


Figura 19. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de sin sedimento en la pecera y alimentados con calamar fresco (azul), a nivel familia.

Cuando se realizó la variante de cambio de dieta (calamar fresco a alimento balanceado), aumentó la familia *Flavobacteriaceae* ($P= 0.024$), Figura 20.

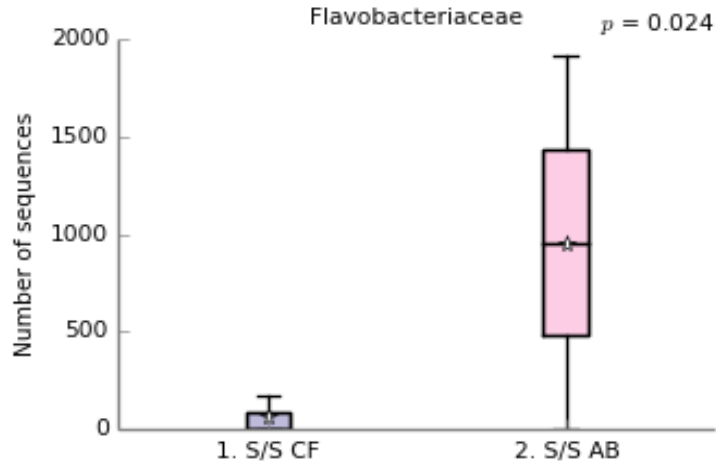
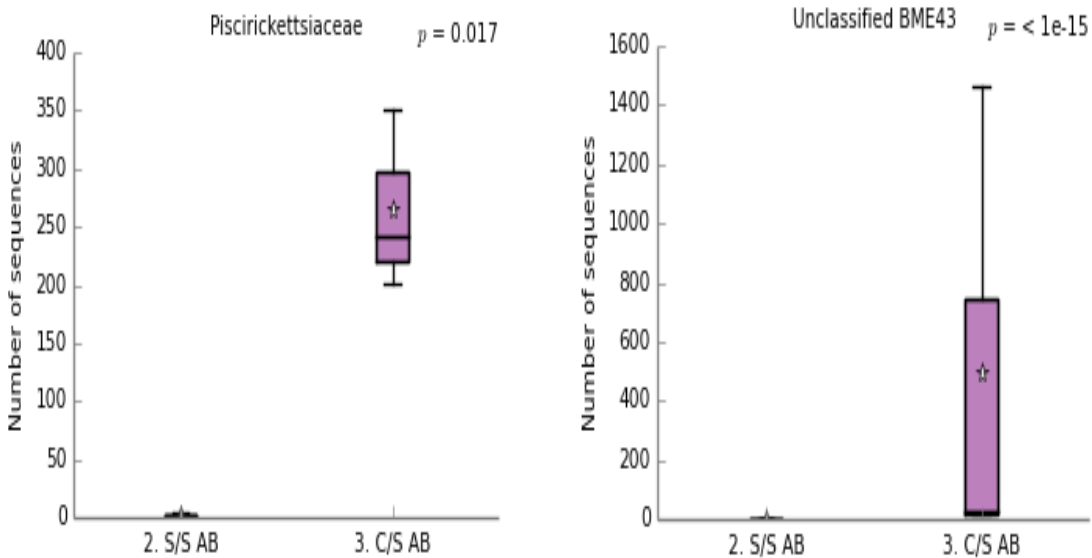


Figura 20. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que se encontraban sin sedimento en la pecera y alimentados con calamar fresco (azul) y cuando se realizó el cambio de dieta de calamar fresco a alimento balanceado (rosa), a nivel familia.

En la última variante, los camarones fueron cambiados de una pecera sin sedimento a una con sedimento (Figura 21), debido a esto, aumentaron las familias *Piscirickettsiaceae* ($P= 0.017$), *unclassified_BME43* ($P= <1e-15$), *unclassified_Chromatiales* ($P= <1e-15$).



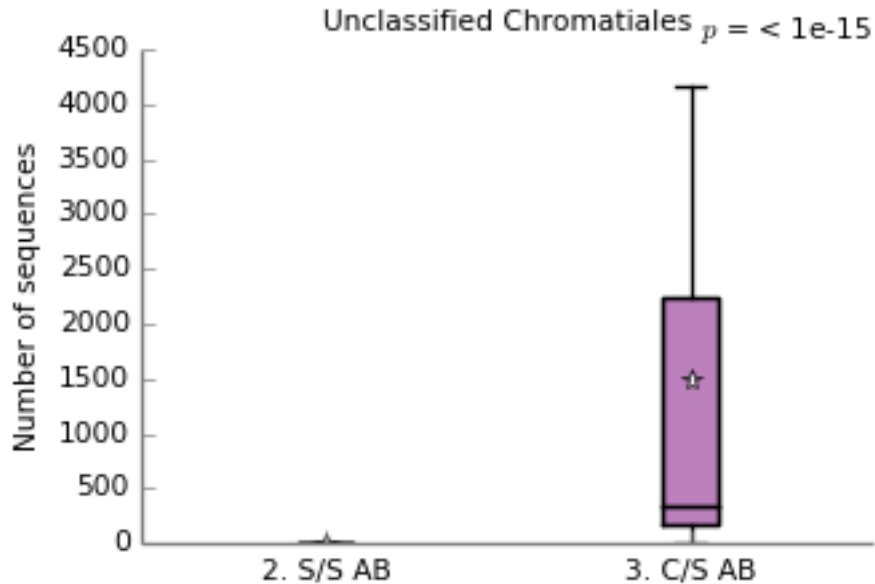


Figura 21. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que se encontraban sin sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (rosa) y cuando se realizó el cambio de sustrato de sin sedimento a con sedimento (lila), a nivel familia.

El índice Shannon (Figura 22 a), de los contenidos intestinales de camarones silvestres tuvo un valor de 6.13 ± 0.267 , mientras que Chao 1 (Figura 22 b) fue mayor en los contenidos intestinales de camarones silvestres (2776.51 ± 500.68), una vez que se sometieron los camarones silvestres a la variante del bioensayo condiciones experimentales (sin sedimento calamar fresco) hubo un decremento en ambos índices (4.41 ± 0.926 y 1705.38 ± 304.78 , Figura 22 a y b, respectivamente), al realizar el cambio de dieta, es decir, de estar alimentados con calamar fresco al alimento balanceado, volvió a disminuir la diversidad y riqueza (4.047 ± 0.709 y 1234.29 ± 344.52 , respectivamente), mientras que al cambiar los camarones de un ambiente sin sedimento a uno con sedimento, aumentó la riqueza (2502.56 ± 356.17) sin superar a la de los camarones silvestres, sin embargo el índice de Shannon fue mayor e inclusive superó el valor de los camarones silvestres, esto se aprecia de forma gráfica en el promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia (Figura 22 c), donde la gráfica de pastel presentó mas equitatividad que el resto.

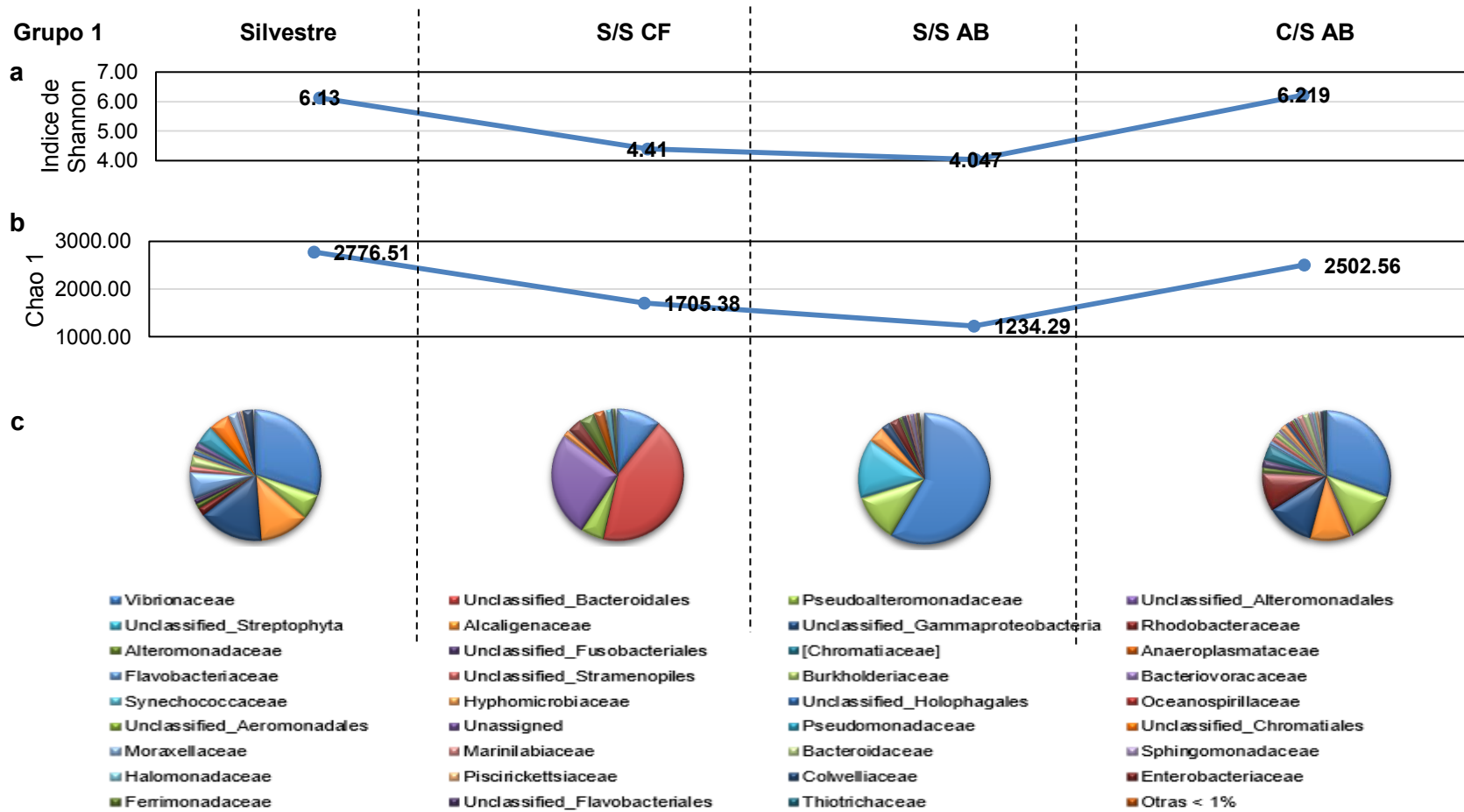


Figura 22. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 1 (silvestre n=3; S/S CF n=3; S/S AB n=2; C/S AB n=3). a) índice de equitatividad Shannon. b) índice de riqueza Chao 1. c) Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

Grupo 2.

En el grupo 2 se evaluó el cambio de la estructura taxonómica del contenido intestinal de camarones silvestres, al ser alimentados con calamar fresco y con sedimento en la pecera, posteriormente se alimentó con alimento balanceado y por último un cambio de sustrato, es decir, se trasladaron a peceras sin sedimento. Los camarones silvestres, se distribuyeron hacia el mismo cuadrante de la gráfica. Cuando se realizó la variante del bioensayo condiciones experimentales y cambio de dieta, se observó una agrupación y entre estos dos cambios no se observó mucha diferencia ya que permanecieron en el mismo cuadrante del gráfico, por último, en la variante cambio de sustrato los organismos se posicionaron en el mismo cuadrante (Figura 23).

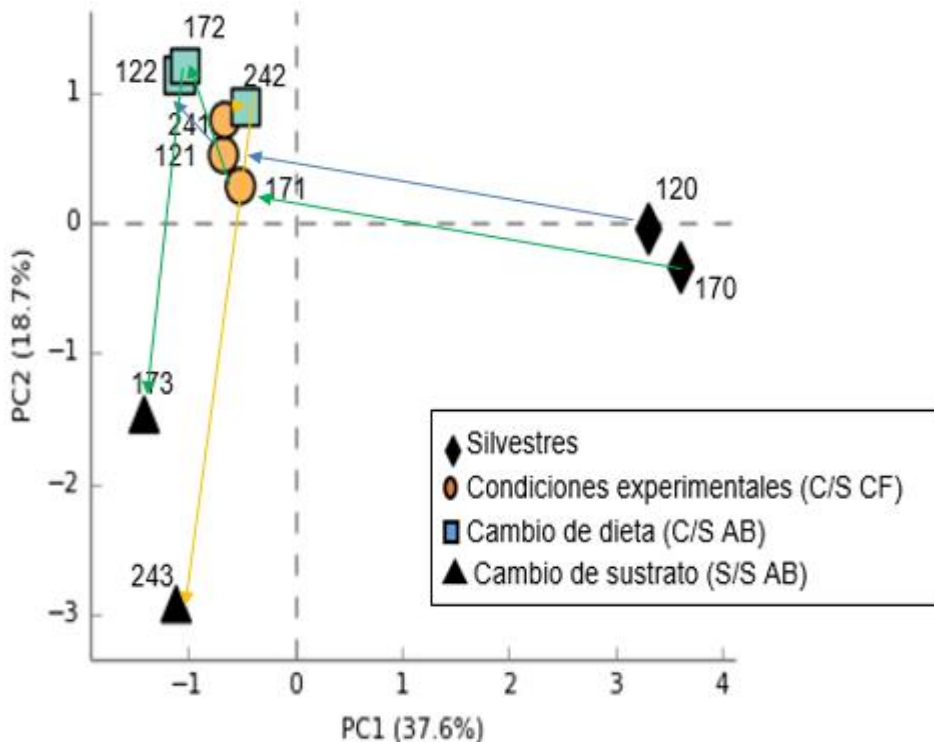
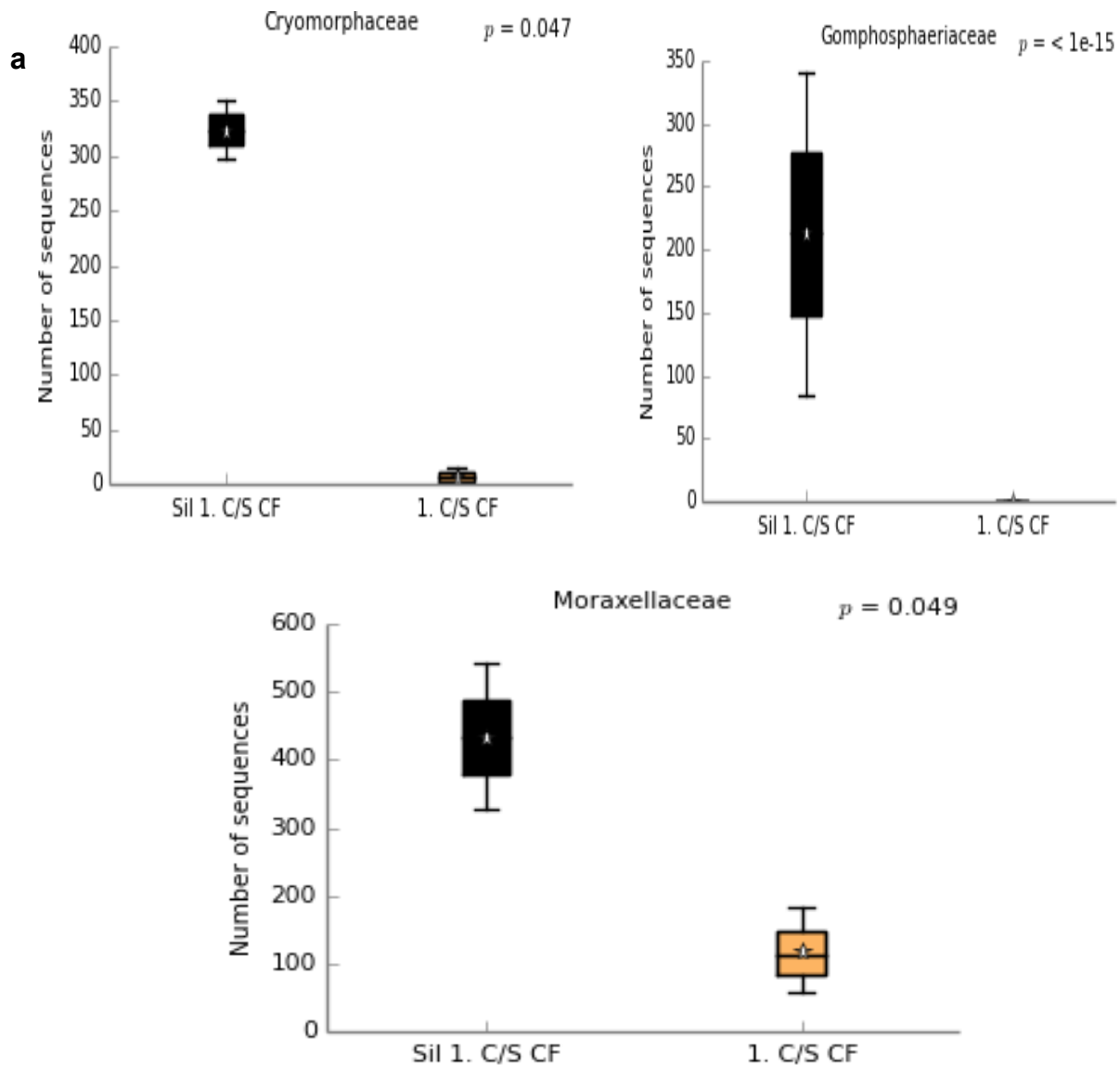


Figura 23. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando los camarones silvestres se sometieron al tratamiento con sedimento y alimentados con calamar fresco (S/S CF), posteriormente se hizo un cambio de dieta: con sedimento y alimento balanceado (S/S AB) y por último un cambio de sustrato: con sedimento a una pecera sin sedimento. Flecha azul camarón 12; flecha verde camarón 17; flecha naranja camarón 24.

Cuando los camarones silvestres, fueron alimentados con calamar fresco y la pecera contenía sedimento, se observaron diferencias significativas en las familias *Cryomorpaceae* ($P= 0.047$), *Gomphosphaeriaceae* ($p= <1e-15$) y *Moraxellaceae* ($P=0.049$) las cuales disminuyeron (Figura 24 a), a diferencia de las familias *Pseudomonadaceae* ($P= 0.049$) *unclassified_Holophagales* ($P= <1e-15$) y *VC21_Bac22* ($P= 0.045$) que aumentaron cuando los camarones silvestres fueron alimentados con calamar fresco y colocados en un ambiente con sedimento (Figura 24 b).



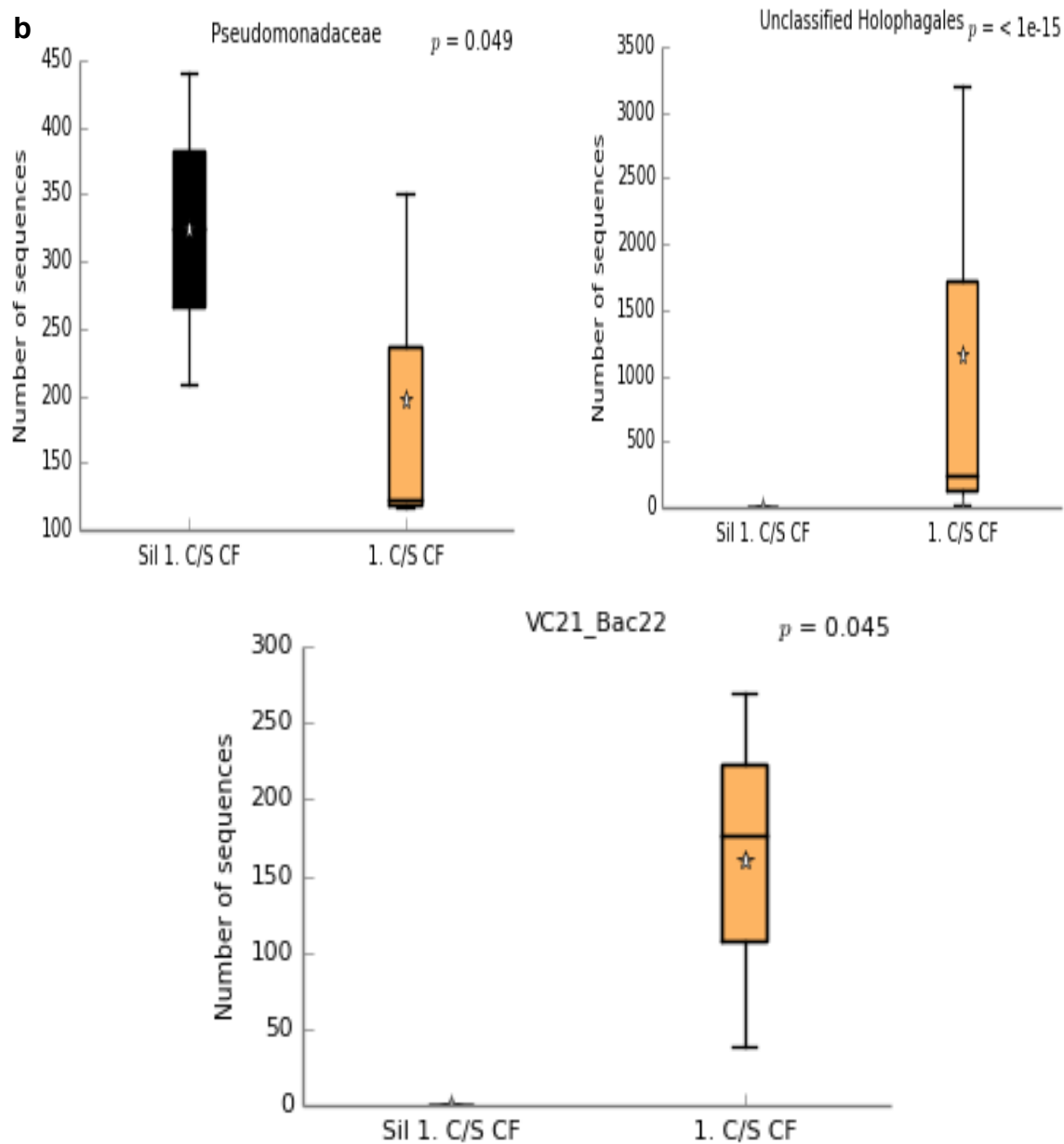


Figura 24. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de con sedimento en la pecera y alimentados con calamar fresco (naranja), a nivel familia. a) disminución significativa en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales. b) aumento significativo en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales.

Al realizar el cambio de dieta, en el grupo descrito anteriormente, que fue de calamar fresco a alimento balanceado y con sedimento en la pecera, se redujo la familia *Alteromonadaceae* ($P=0.00299$) y *VC21_Bac22* ($P= 0.044$) (Figura 25).

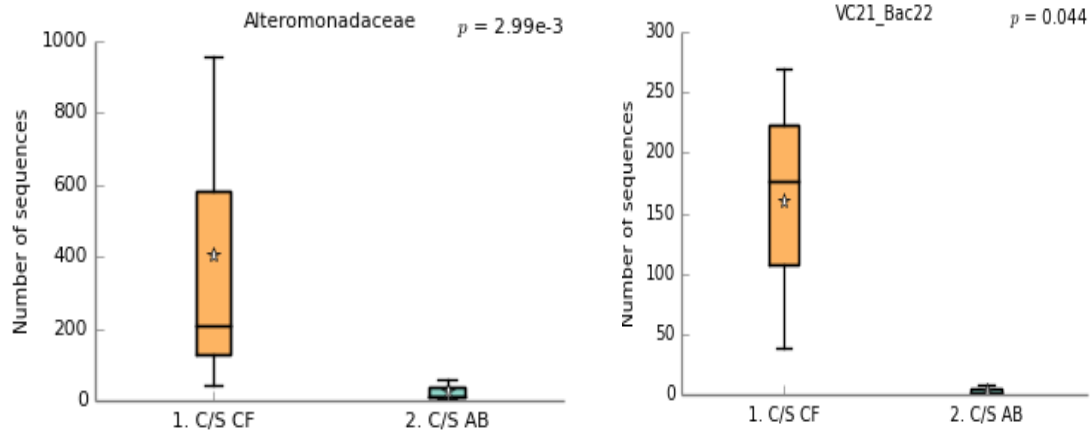


Figura 25. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones cuando se sometieron a las condiciones experimentales de con sedimento en la pecera y alimentados con calamar fresco (naranja) y el cambio de alimentación de calamar fresco a alimento balanceado (azul), a nivel familia.

Sin embargo, cuando se realizó la última variante del bioensayo que consistió en un cambio de sustrato (para este grupo de estar con sedimento se cambiaron a peceras sin sedimento) aumentó la familia *Alteromadaceae* ($P= 0.0043$) (Figura 26).

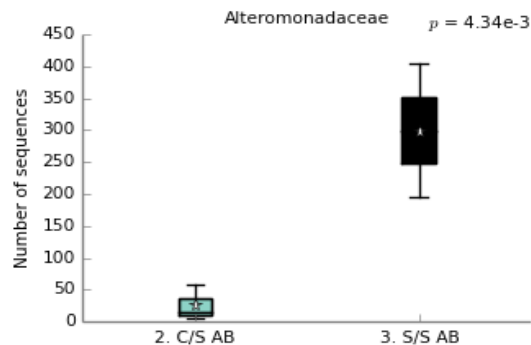


Figura 26. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de los camarones que estaban en peceras con sedimento y alimentados con el alimento balanceado (azul), a cambio de sustrato de con sedimento a sin sedimento (negro), a nivel familia.

En el grupo 2, los contenidos intestinales de camarones silvestres presentaron los valores más altos de diversidad y riqueza, el índice Shannon (Figura 27 a), tuvo un valor de 7.77 ± 0.267 y Chao 1 (Figura 27 b) de 2164.25 ± 500.68 , una vez que se sometieron los camarones silvestres a la variante del bioensayo,

condiciones experimentales (con sedimento calamar fresco) hubo un incremento del índice Shannon (5.12 ± 0.213), pero la riqueza disminuyó a 1743.98 ± 27.21 , este aumentó en la diversidad, se debe a una menor dominancia de familias bacterias (Figura 27 c); al realizar el cambio de dieta, es decir, de estar alimentados con calamar fresco a alimento balanceado, disminuyó la diversidad, pero aumentó la riqueza (4.25 ± 0.591 ; 1756.2 ± 215.72 , respectivamente), mientras que al cambiar los camarones de un ambiente con sedimento a uno sin sedimento, disminuyó la riqueza (1254.45 ± 260.79), y aumentó el índice de Shannon a 4.38 ± 0.613 .

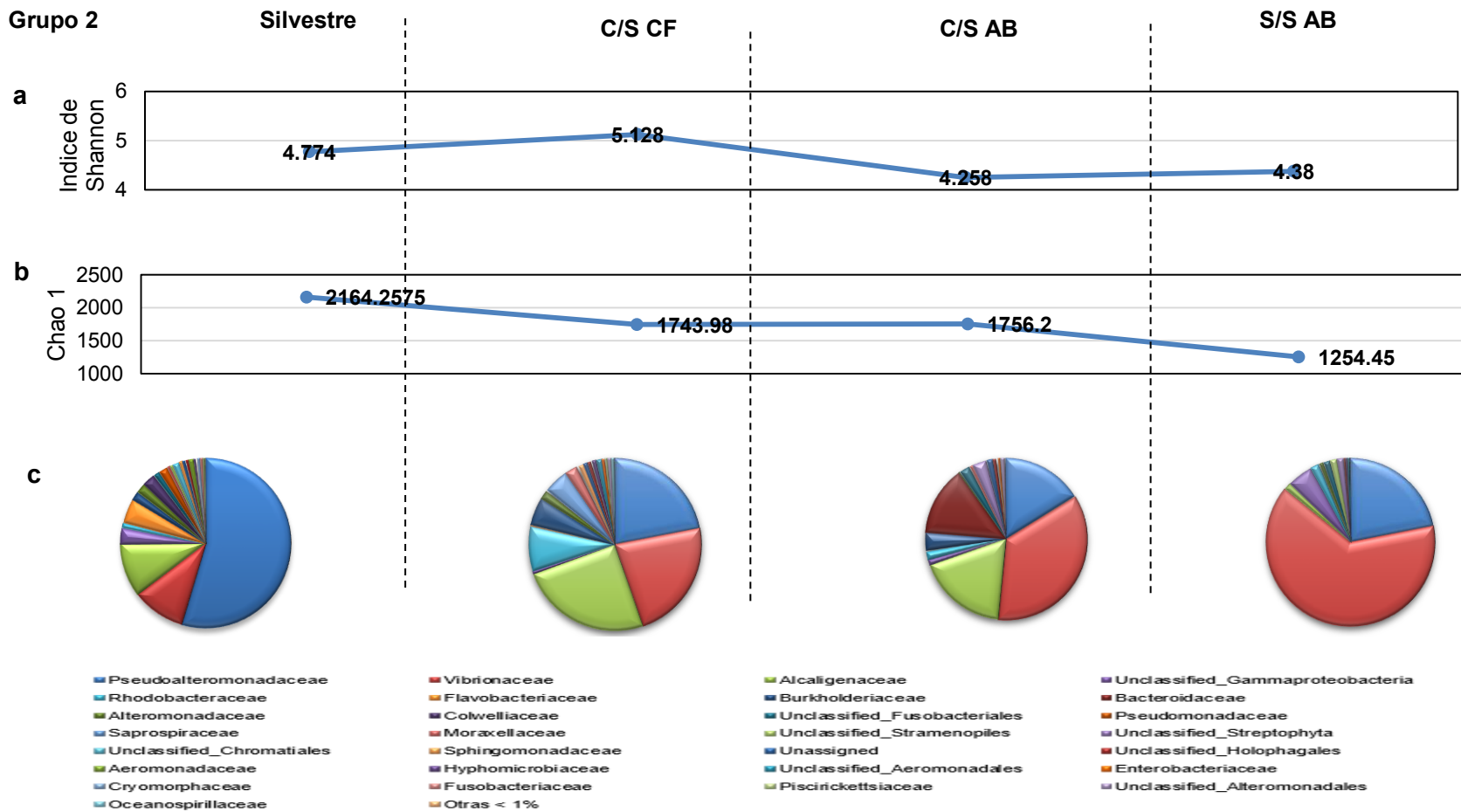


Figura 27. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 2 (silvestre n=2; C/S CF n=3; C/S CF n=3; S/S AB n=2). a) índice de equitatividad Shannon. b) índice de riqueza Chao 1. c) Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

Grupo 3.

El tercer grupo evaluado, consistió en camarones silvestres alimentados con alimento balanceado y sin sedimento en las peceras, posteriormente se realizó un cambio de dieta, es decir, se les dio calamar fresco y por último se hizo un cambio de sustrato, se cambiaron los camarones a peceras que contenían sedimento. Los camarones silvestres, se distribuyeron hacia el mismo componente de la grafica. Cuando se realizó las variantes del bioensayo, se observó variabilidad en las agrupaciones (Figura 28).

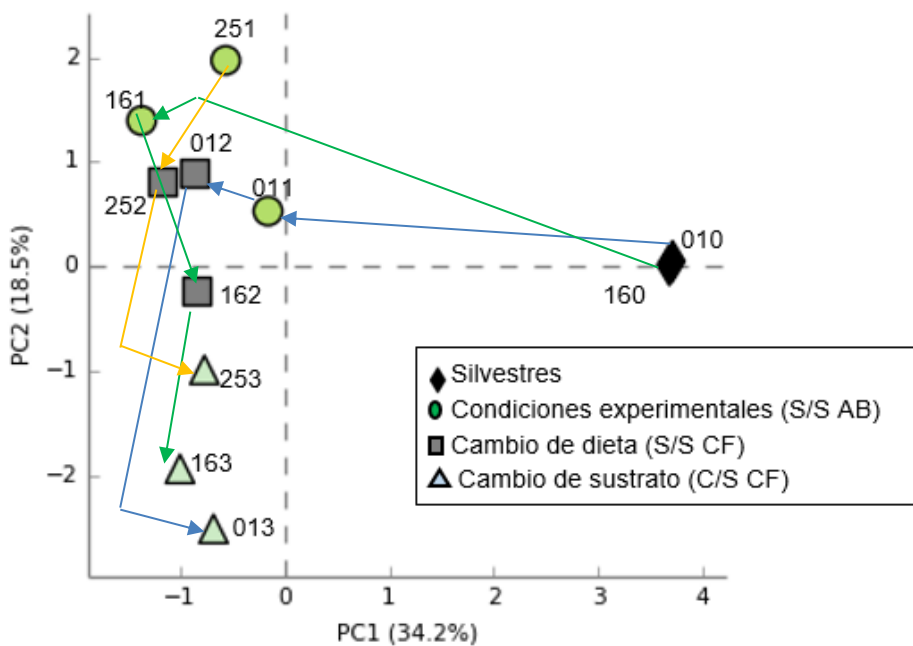


Figura 28. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando los camarones silvestres se sometieron al tratamiento sin sedimento alimentados con el alimento balanceado (S/S AB), posteriormente, se hizo un cambio de dieta: con sedimento calamar fresco (S/S CF) y por último, un cambio de sustrato: sin sedimento a una pecera con sedimento. Flecha azul camarón 1; flecha verde camarón 16; flecha naranja camarón 25.

Cuando los camarones silvestres fueron alimentados con el alimento balanceado y sin sedimento en las peceras, se presentó una disminución en las familias [*Chromatiaceae*] ($P=0.028$), *Crymorphaeae* ($P=0.015$) y *Gomphosphaeriaceae* ($P<1e-15$) (Figura 29).

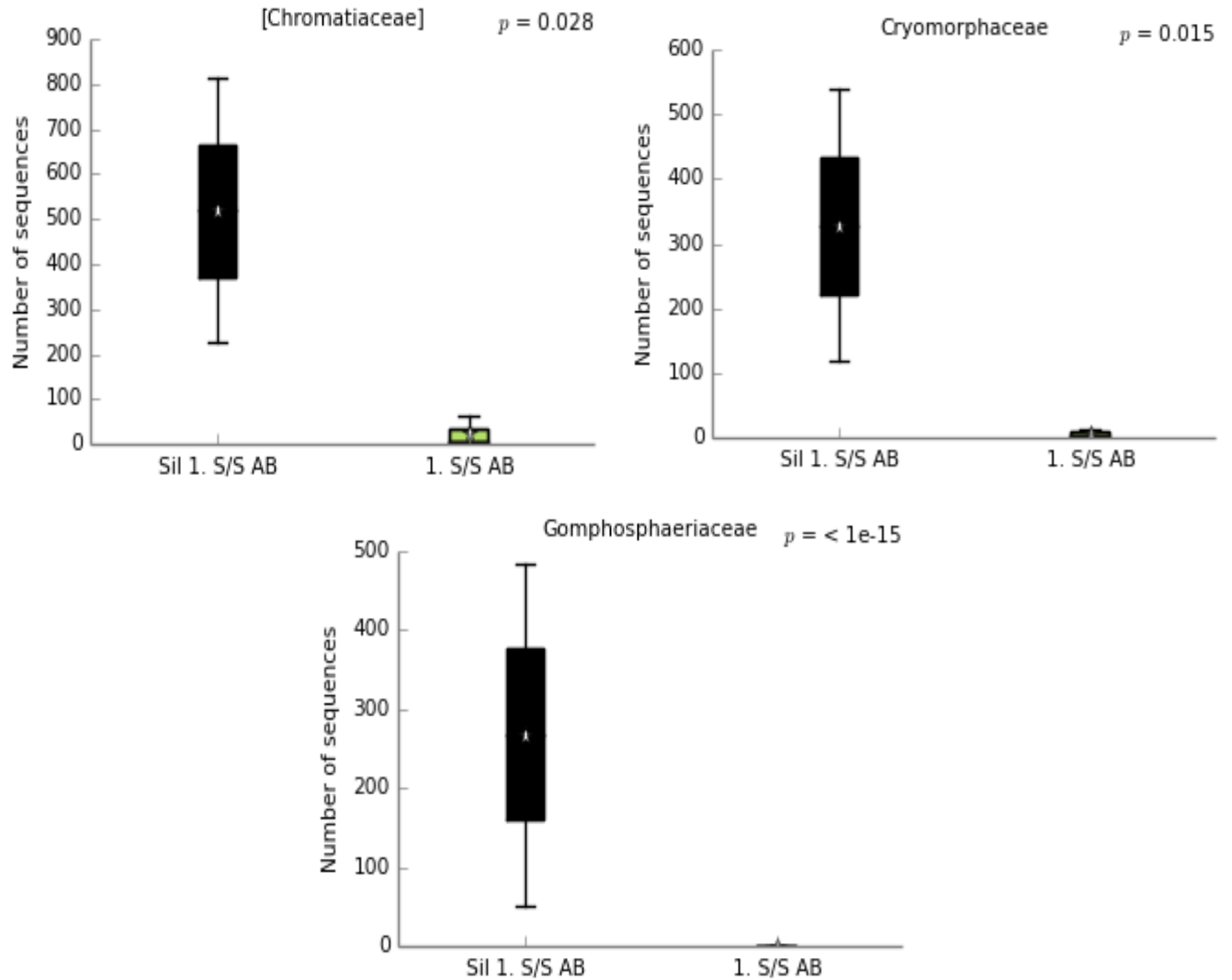


Figura 29. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de sin sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (verde), a nivel familia.

Cuando se realizó el cambio de dieta (de alimento balanceado a calamar fresco), aumentó la familia *Listeriaceae* ($P=0.023$) y disminuyó *Oceanospirillaceae* ($P=0.026$) (Figura 30).

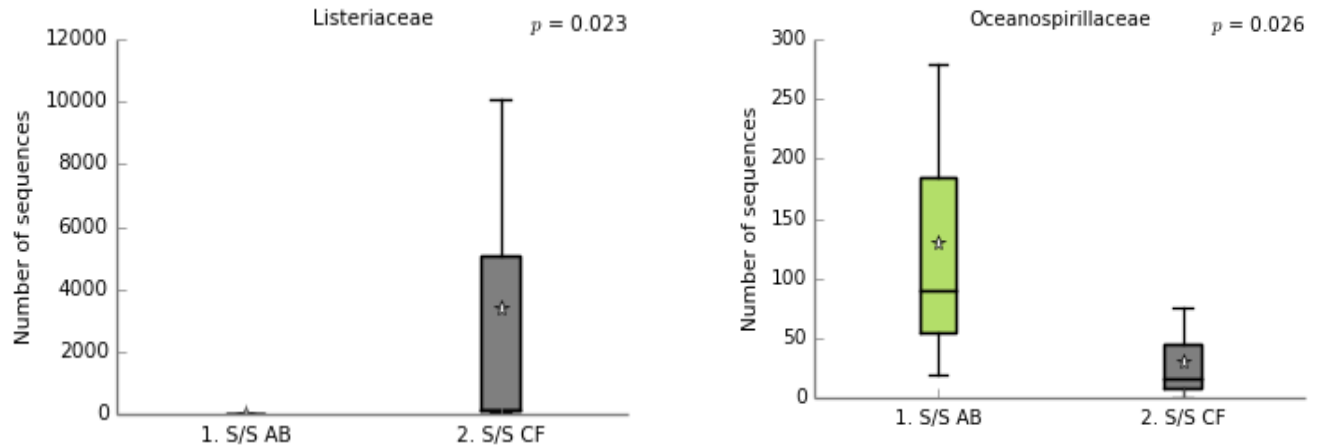


Figura 30. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones cuando se sometieron sin sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (verde) y el cambio de alimentación de alimento balanceado a calamar fresco (gris), a nivel familia.

Por último, se realizó el cambio de sustrato, es decir, los camarones de estar en una pecera sin sedimento, fueron cambiados a una con sedimento, hubo una disminución de la familia *Vibrionaceae* ($P=0.030$) y un aumento en *Pseudoalteromonadaceae* ($P=0.030$) (Figura 31).

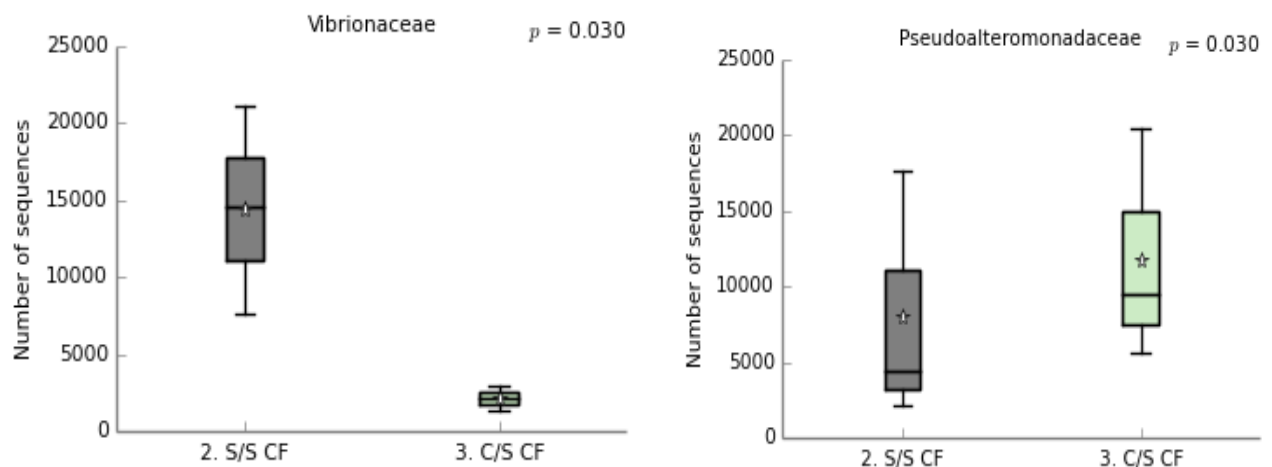


Figura 31. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que estaban en peceras sin sedimento y alimentados con calamar fresco (gris), a cambio de sustrato de sin sedimento a con sedimento (azul), a nivel familia.

En el grupo 3, los contenidos intestinales de los camarones silvestres presentaron los valores más altos de riqueza, con un valor de Chao 1 (Figura 32

b) de 2624.25 ± 500.68 , el índice Shannon presento un valor de 6.10 ± 0.267 (Figura 32 a), una vez que se sometieron los camarones silvestres a la variante del bioensayo, condiciones experimentales (sin sedimento alimento balanceado) hubo una disminución en ambos índices, el índice Shannon disminuyó a 4.61 ± 0.474 y Chao 1 a 1534.07 ± 236.46 . Al realizar el cambio de dieta, es decir, de estar alimentados con alimento balanceado a calamar fresco, disminuyó la diversidad, pero aumentó la riqueza (4.54 ± 0.25 ; 1914.57 ± 127.91 , respectivamente), mientras que al cambiar los camarones de un ambiente sin sedimento a uno con sedimento, aumentó la riqueza (1933.16 ± 260.79), y aumentó el índice de Shannon a 4.65 ± 0.83 el cual superó los valores de los camaros silvestres. Los promedios de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia (Figura 32 c), muestran de forma gráfica el índice de diversidad, ya que el tratamiento que presenta el valor menor de abundancia (sin sedimento calamar fresco y con sedimento calamar fresco), son los que presentan una dominancia de pocas familias, en comparación con los tratamientos que tenían mayor valor de abundancia, donde observa una mayor equitatividad de las familias presentes.

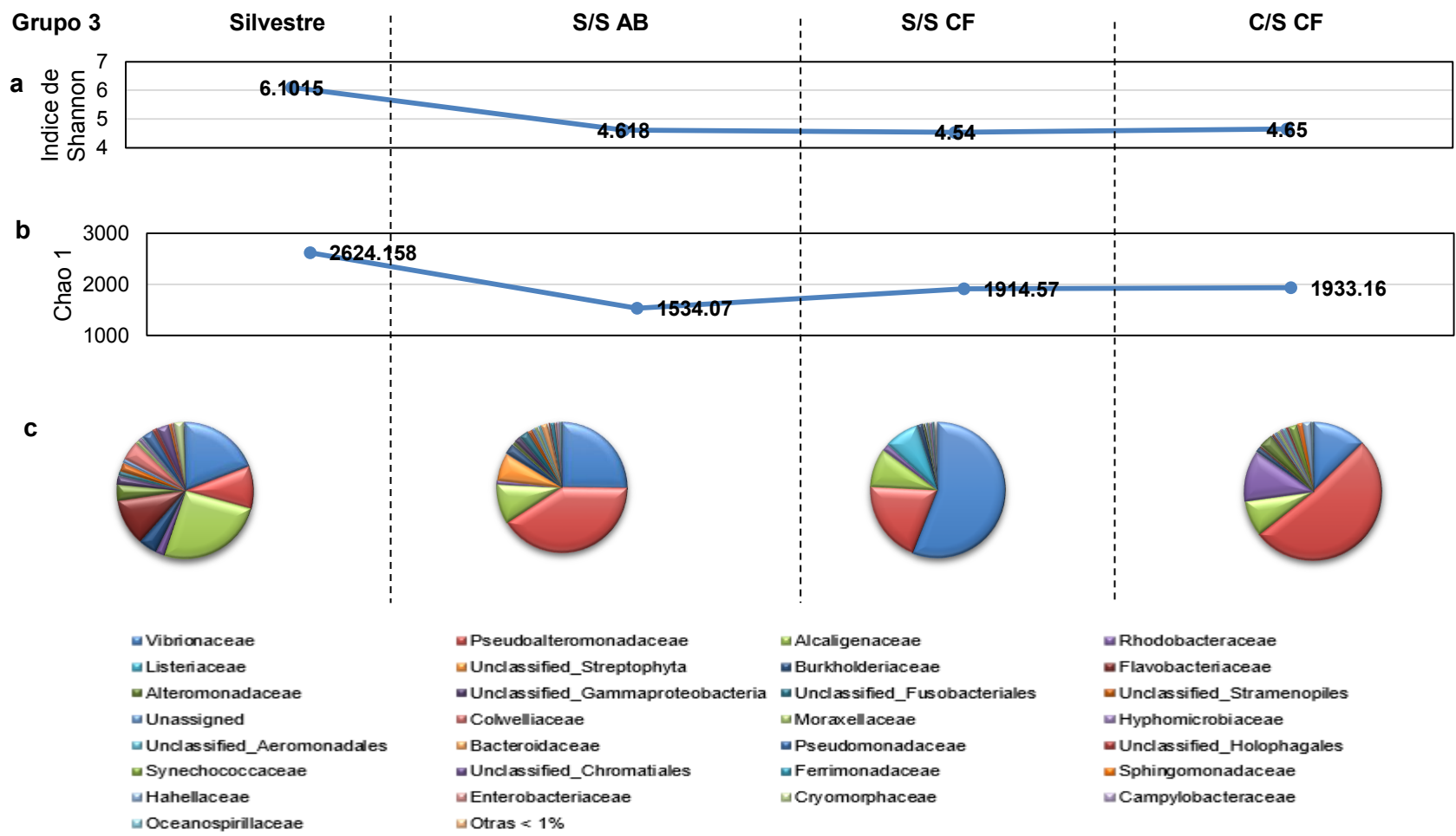


Figura 32. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 3 (silvestre n=2; S/S AB n=3; S/S CF n=3; C/S CF n=3). a) índice de equitatividad Shannon. b) índice de riqueza Chao 1. c) Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

Grupo 4

El último grupo evaluado estuvo integrado por camarones silvestres, los cuales fueron alimentados con alimento balanceado y en las peceras con sedimento, posteriormente se cambió su alimentación a calamar fresco y por último se realizó un cambio de sustrato, de estar en un ambiente con sedimento se trasladaron a uno sin sedimento. Los camarones silvestres se agruparon en el mismo componente de la gráfica (Figura 33), al momento de someterlos a la variante condiciones experimentales, el camarón 22 y el 13 se agrupan, mientras que el 6 se separa un poco de la agrupación, en la variante cambio de dieta, se observa que hubo más dispersión y por último, en el cambio de sustrato vuelve a existir una agrupación.

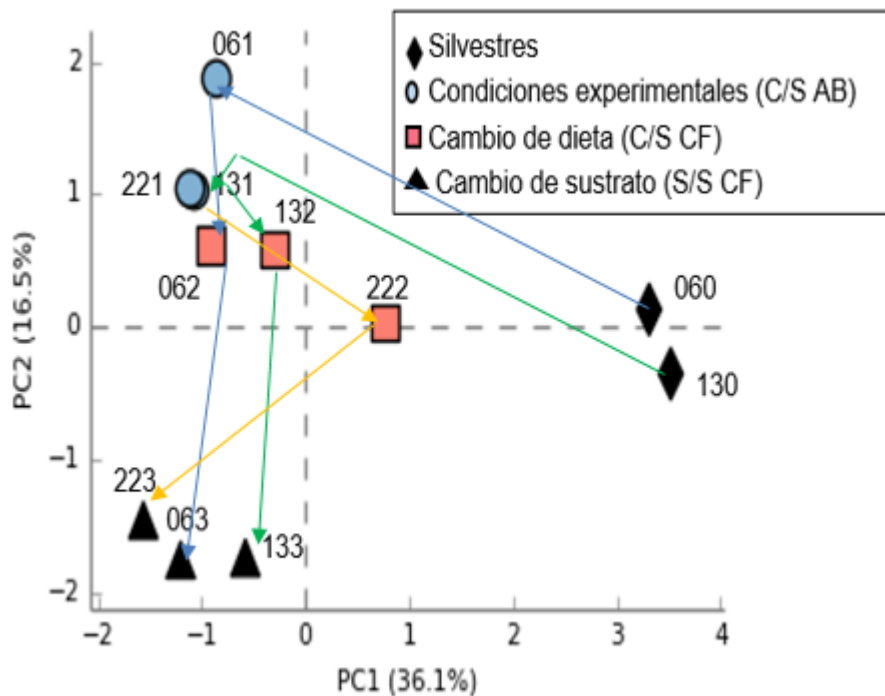


Figura 33. Distribución en la ACP de los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de camarón, cuando camarones silvestres se sometieron al tratamiento con sedimento alimentados con alimento balanceado (C/S AB), posteriormente, se hizo un cambio de dieta: con sedimento calamar fresco (C/S CF) y por último, un cambio de sustrato: con sedimento a una pecera sin sedimento. Flecha azul camarón 6; flecha verde camarón 13; flecha naranja camarón 22.

Cuando los camarones silvestres, fueron alimentados con alimento balanceado y las peceras contenían sedimento, para esta condición se presentó la disminución de las familias *Piscirickettsiaceae* ($P=5.41e-3$), *Clostridiaceae* ($P=0.038$), y un aumento en *Bacteriovoracaceae* ($P=<1e-15$) y *Rhodospirillaceae* ($P=<1e-15$) (Figura 34).

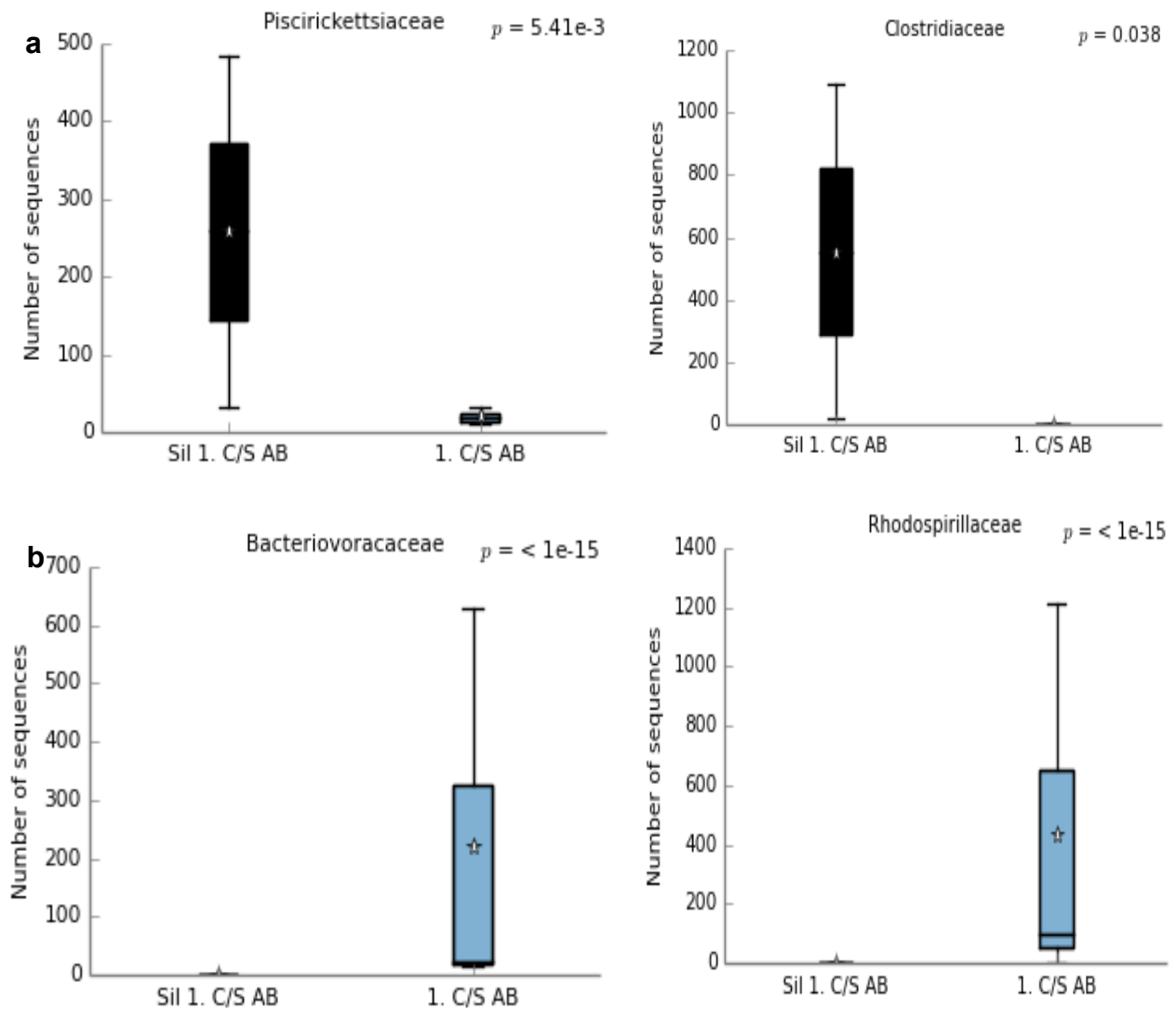


Figura 34. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones silvestres (negro) y cuando se sometieron a las condiciones experimentales de con sedimento en la pecera y alimentados con alimento balanceado (azul), a nivel familia. a) disminución significativa en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales. b) aumento significativo en las secuencias al someter camarones silvestres a condiciones experimentales.

Al cambiarles la alimentación (de dieta balanceada a calamar fresco), las familias *Oceanospirillaceae* ($P=0.013$) y *Rhodospirillaceae* ($P= <1e-15$), disminuyeron, (Figura 35).

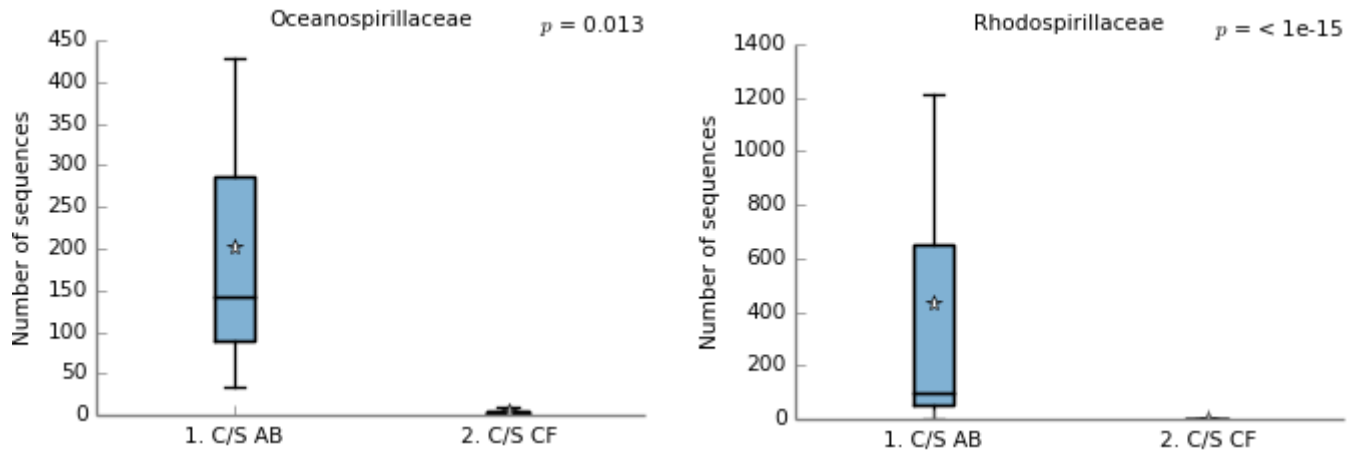
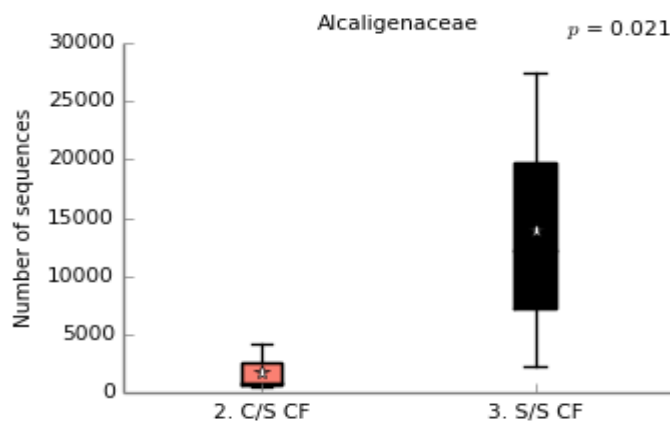


Figura 35. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones cuando las peceras contenían sedimento y alimentados con alimento balanceado (azul) y el cambio de alimentación de alimento balanceado a calamar fresco (rosa), a nivel familia.

En la última variante, se cambiaron los camarones de peceras con sedimento a peceras sin sedimento, aumentaron las familias *Alcaligenaceae* ($P=0.021$), *Burkholderiaceae* ($P=0.021$) y *Listeriaceae* ($P=<1e-15$) (Figura 36).



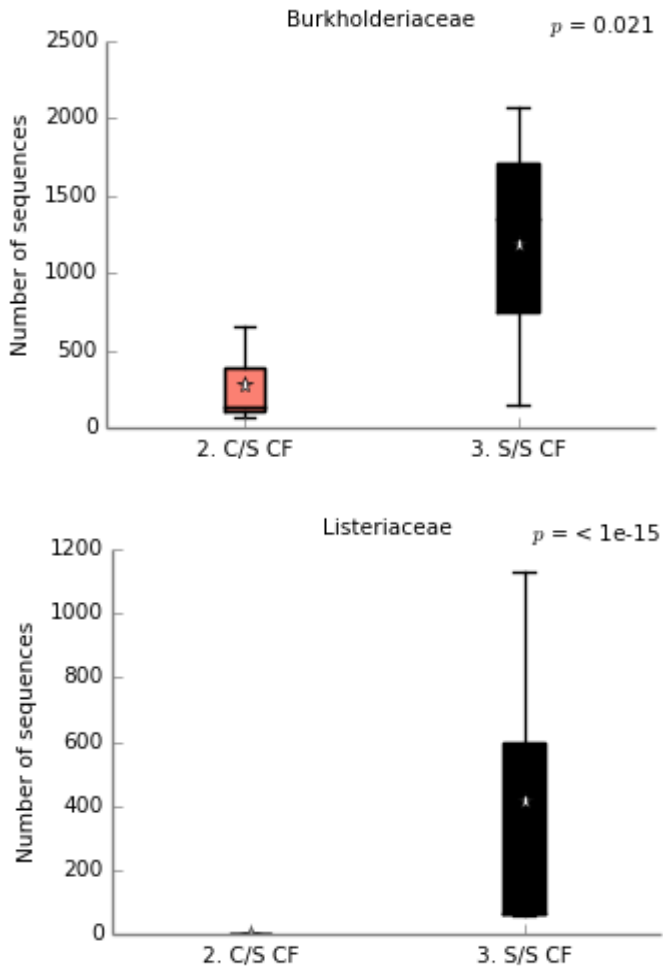


Figura 36. Diferencias significativas entre los contenidos intestinales de camarones que estaban en peceras con sedimento y alimentados con calamar fresco (rosa), a cambio de sustrato de con sedimento a sin sedimento (negro), a nivel familia.

En el grupo 4, los contenidos intestinales de camarones silvestres presentaron los valores más altos de riqueza y abundancia, con un valor de Chao 1 (Figura 37 b) de 2558.74 ± 500.68 , el índice Shannon (Figura 37 a), tuvo un valor de 5.59 ± 0.474 , una vez que se sometieron los camarones silvestres a la variante del bioensayo, condiciones experimentales (con sedimento alimento balanceado) hubo una disminución en ambos índices, Shannon disminuyó a 4.81 ± 0.621 y Chao 1 a 1495.80 ± 114.56 ; al realizar el cambio de dieta, es decir, de estar alimentados con alimento balanceado a calamar fresco, disminuyó la diversidad, pero aumentó la riqueza (4.59 ± 0.67 ; 1646.83 ± 168.33 , respectivamente), mientras que al cambiar los camarones de un ambiente con sedimento a uno sin

sedimento, aumentó la riqueza (1981.54 ± 601.01), y abundancia aumentó a 4.67 ± 0.54 . Los promedios de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia (Figura 37 c), muestran de forma gráfica el índice de diversidad, ya que el que los tratamientos que presentan el valor menor de abundancia (con sedimento calamar fresco y sin sedimento calamar fresco), son los gráficos donde se observa una dominancia de pocas familias, en comparación con los que tienen mayores valores que los gráficos presentan más equitatividad entre las familias.

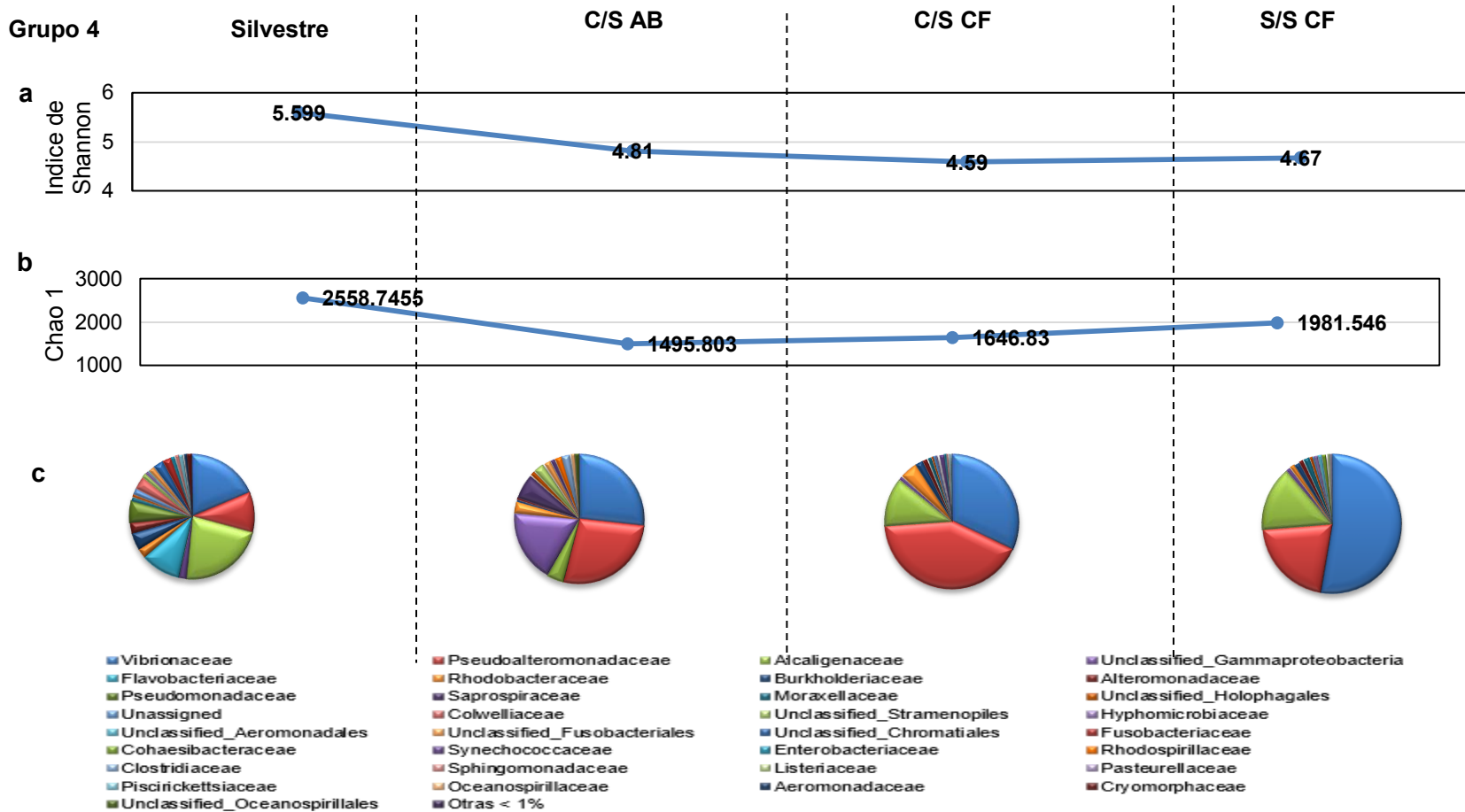


Figura 37. Diversidad alfa (Shannon y Chao1) de la estructura taxonomica de los contenidos intestinales de camaron del grupo 4 (silvestre n=2; S/S AB n=3; S/S CF n=3; C/S CF n=3). **a)** índice de equitatividad Shannon. **b)** índice de riqueza Chao 1. **c)** Promedio de abundancias relativas de los contenidos intestinales a nivel familia bacterianas. S/S sin sedimento; C/S con sedimento; CF calamar fresco; AB alimento balanceado.

6.3.5 Diversidad beta

Para comparar la diversidad beta, se aplicó la medida de distancia no ponderada Unifrac entre pares de muestras, la cual utiliza las distancias filogenéticas entre los OTUs y sus abundancias relativas. Se formaron seis grupos (Figura 38), dicho agrupamiento indica una composición bacteriana similar entre los contenidos intestinales, independientemente del tratamiento. Todas las muestras de los contenidos intestinales de camarones silvestres (Figura 38 línea gris) quedaron agrupadas. El grupo marcado con línea verde estuvo integrado por 13 muestras de contenido intestinal de camarones que estuvieron con sedimento en las peceras y alimentados tanto con calamar fresco como con balanceado, y de 2 muestras provenientes del tratamiento sin sedimento y alimento balanceado. El grupo marcado con línea naranja, estuvo integrado por 6 muestras de contenido intestinal de camarón, 4 de ellas provenientes del tratamiento sin sedimento alimentados con calamar fresco y 2 del tratamiento sin sedimento alimento balanceado. El grupo rosa estuvo integrado por 11 muestras, 5 del tratamiento con sedimento y 6 del tratamiento sin sedimento. Dos muestras del tratamiento sin sedimento, alimentados con calamar fresco (Figura 38, línea negra y amarilla), permanecieron como muestras independientes.

Dada dichas agrupaciones, se comprobó que la estructura taxonómica de la microbiota fue similar entre grupos con sedimento que eran alimentados con calamar fresco y alimento balanceado, sin importar la variante del bioensayo; para el caso de aquellos que en las peceras no contenían sedimento, se observó mas dispersión en su composición taxonómica de los contenidos intestinales de camarón.

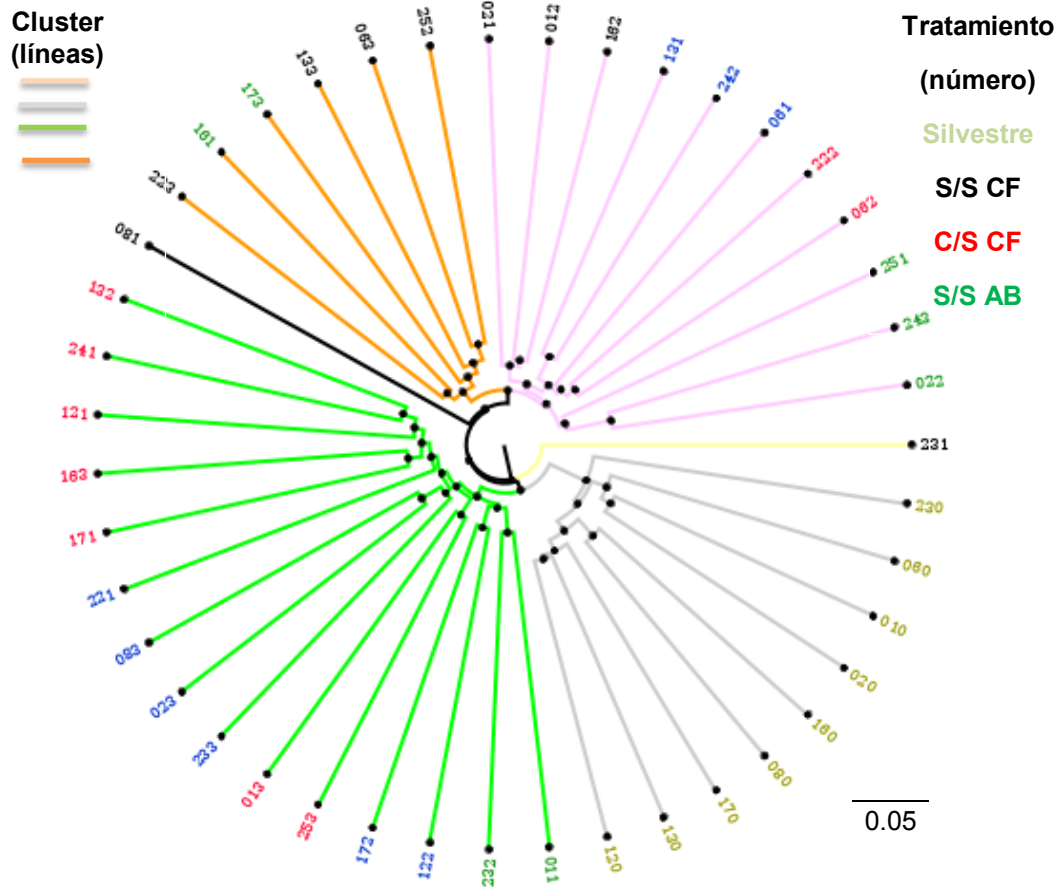


Figura 38. Diversidad beta de la microbiota de los contenidos intestinales de camarón sin importar la variante del bioensayo. Cada grupo generado con el agrupamiento UPGMA de la distancia UniFrac con variantes no ponderadas, se representó con diferente color (verde, negro, naranja, rosa, amarillo, gris). Las muestras fueron codificadas con tres números, donde los dos primeros dígitos representan el número de camarón y el tercer número simboliza la variante del bioensayo, para silvestres (0), condiciones experimentales (1), cambio de dieta (2) y cambio de sustrato (3). Los tratamientos se representaron con diferente color, silvestres en verde oliva; S/S CF sin sedimento calamar fresco en color negro; C/S CF con sedimento calamar fresco en rojo; S/S AB sin sedimento alimento balanceado verde; C/S AB con sedimento alimento balanceado en azul.

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se caracterizó la estructura taxonómica de la microbiota del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* de origen silvestre, además se realizó un bioensayo, sometiendo a los mismos camarones silvestres, a diferentes condiciones de cultivo (con y sin sedimento y alimentados con alimento balanceado y calamar fresco), con la finalidad de contrastar los cambios que ocurren en la estructura taxonómica y diversidad de la microbiota de los contenidos intestinales de camarón.

Las secuencias utilizadas para realizar la caracterización y medición de la diversidad alfa y beta de la microbiota de los contenidos intestinales de camarón, tuvieron entre 10,583 y 179,854 secuencias por muestra (media de 21,057, n=43), dichas secuencias están dentro del intervalo utilizado en otros estudios, donde los intervalos de secuencias por muestra usadas van desde 1,009 hasta 181,841 (Rungrassamee *et al.*, 2013; Rungrassamee *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015; Sha *et al.*, 2016; Rungrassamee *et al.*, 2016), por lo que se consideraron suficientes para tener una visión general de las estructuras taxonómicas bacterianas de la microbiota del camarón *P. vannamei* de origen silvestre con las variantes anteriormente detalladas.

Una vez que se caracterizaron las secuencias obtenidas de los contenidos intestinales del camarón de origen silvestre, se encontró que los filos *Proteobacteria* (entre el 68-91%), *Cyanobacteria* (2-13%) y *Bacteroidetes* (2-12%) resultaron los más dominantes. En línea con los resultados que se obtuvieron para la comunidad bacteriana intestinal en *P. monodon* silvestre, el filo predominante fue *Proteobacteria* y en una muestra predominó *Firmicutes* (Rungrassamee *et al.*, 2014).

Así mismo, una vez que se sometieron a las variantes del bioensayo a los camarones silvestres se encontró que el filo predominante fue *Proteobacteria* con más del 80% en todas las muestras. Lo cual concuerda con el trabajo de Zheng y colaboradores (2016), quienes caracterizaron la microbiota intestinal de *P. vannamei* de cultivo, en distintas fases de salud y desarrollo, donde los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* fueron predominantes en camarón sano en todas las etapas de crecimiento (Huang *et al.*, 2014).

Por su parte Zhang *et al.*, (2014) caracterizaron la microbiota de la estructura bacteriana intestinal con respecto a la fuente de lípidos en la dieta del camarón *P. vannamei*, estos autores determinaron como predominante al filo *Proteobacteria*. Este filo también se encuentra comúnmente en *P. monodon* (Rungrassamee *et al.*, 2012; Rungrassamee *et al.*, 2013) y *Macrobrachium nipponense* (Tzong *et al.*, 2015). En los estudios mencionados también se encontraron los filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, por lo que se puede inferir que al ser especies del grupo de los peneidos comparten la estructura bacteriana similar al menos en el nivel filo. Respecto a los filos *Verrucomicrobia* (presente en los contenidos intestinales de camarón silvestre) y *Cyanobacteria* (presente en los contenidos intestinales de todos los camarones silvestres y de los de los camarones 1, 23 y 12, provenientes de las variantes del bioensayo) únicamente estuvieron presentes en la microbiota intestinal de *Macrobrachium nipponense* lo cual se puede deber a que eran organismos provenientes de un medio silvestre (rio y lago).

Proteobacteria está ampliamente dispersa en ambientes marinos y puede participar en la degradación de compuestos complejos (Cottrell y Kirchman, 2000), mientras que *Bacteroidetes* (mayor proporción en algunos de los contenidos intestinales de camarones provenientes de las variantes del bioensayo) puede tener un papel especializado en la absorción y degradación de material orgánico disuelto (Kirchman, 2002) y en la degradación de carbohidratos lo que sugiere que la función del ecosistema microbiano estaba estrechamente relacionada con la estructura bacteriana (Zhang *et al.*, 2014).

El análisis estadístico se realizó con la finalidad de evaluar, de forma sucesiva los cambios en las comunidades bacterianas de los contenidos intestinales de los camarones. Primero evaluando el cambio que sufrieron los camarones silvestres al ser sometidos condiciones experimentales (sin sedimento y alimentados con calamar fresco; con sedimento y alimentados con calamar fresco; sin sedimento y alimentados con alimento balanceado; con sedimento y alimentados con alimento balanceado), seguido por el cambio de condiciones experimentales a cambio de dieta (Calamar fresco a alimento balanceado y viceversa) y por último el cambio de dieta a cambio de sustrato (sin sedimento a una pecera con sedimento y viceversa). Dicho análisis se realizó a nivel familia, debido a que no se tuvo la resolución necesaria para hacer la identificación a nivel especie ya que según Huse *et al.* (2008), la región V3 pudiera no tener la resolución suficiente.

Cuando se evaluaron las diferencias significativas entre grupos, se encontró que la familia [*Chromatiaceae*], disminuyó significativamente cuando los camarones silvestres se sometieron a las diferentes variantes del bioensayo, esto se pudo deber a que dicha familia también estuvo presente en la muestra de agua tomada del sitio de muestreo, mientras que en las muestras de agua tomadas durante el bioensayo ya no se presentó. Lo cual concuerda con lo encontrado por Zheng y colaboradores (2016) y Xiong *et al.* (2015) quienes encontraron correlaciones entre las comunidades bacterianas intestinales de camarón y del agua de cultivo. Las familias *Clostridiaceae* y *Cryomorphaceae*, presentes en los contenidos intestinales de camarones silvestres fueron significativamente mayor comparados con los contenidos intestinales de camarones sometidos a las diferentes variantes del bioensayo, donde ya no se presentaron dichas familias, a diferencia del estudio realizado por Navarro (2014), quien reportó la presencia de estas familias en camarones provenientes de un sistema de cultivo y en muestras de camarón de bioensayo, la discrepancia entre este estudio y el trabajo de Navarro puede ser atribuible a las dietas o alas condiciones de cultivo utilizadas, o bien al ambiente externo.

Como consecuencia de las diferentes variantes del bioensayo, se presentó un aumento en las familias *Vibrionaceae* y *Pseudoalteromonadaceae*, las cuales son familias muy comunes en el ambiente marino, y se han reportado en otros estudios donde se han estudiado a camarones sanos provenientes de un sistema de cultivo (Chaiyapechara *et al.*, 2012; Huang, 2014; Tzud, 2014).

La familia *Pseudoalteromonadaceae* cuenta con alrededor de 30 especies, que están presentes en el agua de mar, algas o en invertebrados marinos (Holmström *et al.*, 2002). Estas especies producen varios compuestos químicos, compuestos antimicrobianos (Holmström *et al.*, 2002). Mientras que la familia *Vibrionaceae* posee algunas especies que han sido usadas como probióticos (Gómez *et al.*, 2000) y otras se han relacionado con enfermedades en camarones (Zhang *et al.*, 2016), sin embargo, la mayoría de las especies de vibrios no poseen cepas patógenas, solo algunas de comprobada patogenicidad (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010).

Algunos autores ya han reportado los cambios en la diversidad bacteria intestinal por efecto de diversos factores, como en especies de camarón a distintos estadios de crecimiento (Rungrassamee *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016), en camarones silvestres o cultivados (Rungrassamee *et al.*, 2014), camarones de diferentes granjas (Rungrassamee *et al.*, 2012) camarones con diferente grado de salud (Navarro, 2014; Xion *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016) y alimentados con distintas fuentes de lípidos, o adicionando probióticos a la dieta (Zhang *et al.*, 2014; Luis *et al.*, 2013; Sha *et al.*, 2016). Lo que sugiere que la selección del medio ambiente y la dieta tiene un impacto importante en la microbiota intestinal. Esta plasticidad podría constituir un mecanismo por el cual el huésped puede adaptarse rápidamente a los cambios ambientales (Greenhill *et al.*, 2015).

La diversidad bacteriana se estimó con el índice de Shannon, un mayor valor indica mayor diversidad bacteriana. En este estudio, los valores del índice de Shannon sugirieron que los organismos de origen silvestre (índice de Shannon = 5.737 ± 1.19)

tenían mayor diversidad que en las muestras de contenidos intestinales de camarón provenientes de los tratamientos: sin sedimento y alimentados con calmar fresco 4.49 ± 0.69 ; con sedimento y alimentado con calamar fresco 4.792 ± 0.67 ; sin sedimento y alimentados con alimento balanceado 4.425 ± 0.66 y el tratamiento con sedimento y alimentados con alimento balanceado 5.098 ± 0.96 . Lo cual no concuerda con lo que obtuvieron Rungrassamee *et al.* (2014), donde los camarones provenientes de un sistema de cultivo presentaron mayor diversidad en comparación con los camarones silvestres. En peces (Anusha *et al.*, 2011; Jiajia *et al.*, 2012) también se han realizado estudios donde se compara organismos silvestres contra los cultivados, donde encontraron que la diversidad de la comunidad bacteriana intestinal fue menor en los peces criados en estanques que en los peces silvestres.

Para el caso de los tratamientos a los que se sometieron los camarones silvestres, se observó una mayor diversidad en los tratamientos en que las peceras contenían sedimento, lo cual se pudo haber debido a que los camarones al ser bentónicos están en constante contacto con el sedimento, se ha reportado que los sedimentos superficiales contienen, meiofauna, desechos orgánicos en descomposición, componentes inorgánicos, materia orgánica disuelta y microorganismos, de este último, cabe mencionar que las bacterias en el sedimento se consideran una fuente directa de alimentos, como fuente de proteína o una fuente que indirectamente puede proporcionar al huésped nutrientes esenciales que no están disponibles de otro modo (Gao *et al.*, 2014). La familia dominante en el sedimento tomado de la variante condiciones experimentales, fue *Vibrionaceae* y *Pseudoalteromonadaceae*, lo cual concuerda con Suarez *et al.*, (2015), quien reporta alta prevalencia de especies de *Vibrio* en su estudio, mientras que en la variante cambio de sustrato, no realizó la clasificación a nivel familia pero el orden dominante fue *Bacteroidales*.

Por otro lado, los tratamientos donde los camarones fueron alimentados con alimento balanceado tuvieron una mayor diversidad en comparación con los

camarones alimentados con calamar fresco, Zhang y colaboradores (2014), obtuvieron resultados similares ya que las dietas que presentaban fuentes de ácidos grasos combinados, contribuyeron a que la diversidad bacteriana intestinal fuera superior, que en aquellos organismos alimentados con una sola fuente de lípidos en las dietas, en otro estudio realizado con mero amarillo, se encontró menor abundancia en las estructuras comunitarias intestinales cuando eran alimentados con alimento balanceado en comparación con aquellos que eran alimentados con dieta natural (Feng *et al.*, 2010), dicha discrepancia se puede atribuir a que la dieta natural estuvo integrada por pescado y camarones frescos, mientras que en el presente estudio se alimentaron solo con calamar fresco, el cual principalmente está compuesto por proteína. Resulta importante tener mayor diversidad en el intestino debido a que existe evidencia de que las comunidades más diversas, ocuparán más nichos por lo que excluirá la mayoría de las especies invasoras y optimizará el uso de recursos variados, además, tiene mayor probabilidad de un efecto protector contra el crecimiento o invasión de otros microorganismos (Hodgson *et al.*, 2002; Schryver, 2014).

En el árbol filogenético, se demostró que la composición bacteriana de la microbiota de los contenidos intestinales varió menos en camarones silvestres, es decir se observó una clara agrupación en dichas muestras, esto contrasta con los resultados de Rungrasamee *et al.* (2014), quienes demostraron que la composición bacteriana de la microbiota del intestino del camarón cultivado fue la que varió menos. También se observó una menor variación cuando los camarones estaban en un ambiente con sedimento, por lo anterior se puede determinar que el tipo de hábitat, juega un papel importante en la formación de las comunidades microbianas intestinales (Sullam *et al.*, 2012),

En general, los diferentes tipos de alimentación (alimento balanceado y calamar fresco), como los tipos de sustrato (con y sin sedimento) fueron factores importantes que provocaron un cambio en la composición taxonómica y diversidad bacteriana de los contenidos intestinales de camarones silvestres *P. vannamei*.

VIII. CONCLUSIONES

Dado los resultados obtenidos la hipótesis no se rechaza ya que la estructura de la comunidad bacteriana del contenido intestinal de camarón (*Penaeus vannamei*) de origen silvestre se modificó por efecto de los tipos de sustrato (con y sin sedimento) y alimentación (alimento balanceado y calamar fresco) además, los contenidos intestinales de camarones que fueron alimentados con alimento balanceado y la pecera contenían sedimento, presentaron mayor riqueza y diversidad, que el resto de los tratamientos.

Los filos *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Bacteroidetes* resultaron predominantes para todas las muestras de contenidos intestinales del camarón de origen silvestre, mientras que las familias *Alcaligenaceae*, *Vibrionaceae* y *Pseudoalteromonadaceae* fueron las más representativas.

En los contenidos intestinales de camarones de las diferentes variantes del bioensayo, el filo predominante fue *Proteobacteria*.

Cuando los camarones silvestres fueron sometidos a las diferentes variantes del bioensayo se observó un aumento significativo en las familias *Vibrionaceae* y *Pseudoalteromonadaceae* y una disminución significativa en las familias [*Chromatiaceae*], *Clostridiaceae* y *Cryomorphaceae*.

Se observaron diferencias en la composición del agua del sitio de muestreo y la utilizada durante el bioensayo. Además a medida que avanzó el ensayo el sedimento también cambio en la estructura de la comunidad bacteriana.

Los contenidos intestinales de camarones silvestres presentaron mayor riqueza (Chao 1) y diversidad (Shannon-Wiener).

Los contenidos intestinales de los camarones cultivados con sedimento, presentaron mayor riqueza y diversidad, en comparación con lo que no tenían sedimento.

Se observó menor variación en la estructura taxonómica de la microbiota de los contenidos intestinales de camarones cuando se encontraban en peceras con sedimento.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio metagenómico específico para comparar la microbiota bacteriana intestinal de camarón *P. vannamei* silvestres provenientes de diferentes ambientes y de diferentes sistemas de cultivo.

Algo muy importante sería realizar trabajos con más muestras de las utilizadas en este, ya que en algunos casos no se pudo realizar el análisis estadístico.

Estudiar la composición, diversidad y función de las comunidades microbianas intestinales y establecer que miembros de la comunidad tienen nichos y funciones similares y estudiar como son sustituidos unos taxos por otros.

Estudiar los efectos de la microbiota intestinal en la salud y la enfermedad desde un enfoque ecológico que tenga en cuenta la comunidad en su conjunto y no solo enfoque de los patógenos individuales.

Descifrar las correlaciones entre la enfermedad del camarón y la composición de microbiota con la finalidad de predecir la incidencia de la enfermedad, que es el objetivo final de tales estudios de microbioma.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W., Berg, D., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl, 4516–4522.
- Ceccaldi, H. J. (1989). Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Aquaculture*, 9, 243–259.
- Chaiyapechara, S., Rungrassamee, W., Suriyachay, I., Kuncharin, Y., Klanchui, A., Karoonuthaisiri, N., & Jiravanichpaisal, P. (2012). Bacterial Community Associated with the Intestinal Tract of *P. monodon* in Commercial Farms. *Microbial Ecology*, 63(4), 938–953. <http://doi.org/10.1007/s00248-011-9936-2>
- Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), 265-270. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4615964>
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2013). *La Pesca y Acuacultura en Cifras 2013*, 1–21.
- Committee on Metagenomics: Challenges and, Functional Applications, N. R. C. (2007). *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. Washington, D.C.
- Conlon, M., Bird, A. (2014). The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients*, 7(1), 17–44. Doi: 10.3390/nu7010017

- Córdova, J., García, F., Navarrete, M. (2003). Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297(1), 43–56.
- Di Bella, J., Bao, Y., Gloor, G., Burton, J., Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 401–414.
- Escalante, A. (2008). Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. *Ecología Molecular*, 393–424.
- Espinosa, E. (2003). ¿Cuántas especies hay? Los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos: ciencia y cultura*, 52, 53-56.
- FAO. (2005). México Características, estructura y recursos del sector, 1872. Departamento de pesca.
- FAO. (2014). Estado mundial de la pesca y acuicultura, desafíos y oportunidades. ISSN 1020-5500
- Felgenhauer, B. (1992). Internal anatomy of the Decapoda: an overview. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, 10(1980), 45–75. Retrieved from <http://decapoda.nhm.org/pdfs/10393/10393.pdf>
- Feng, J., Hu, C., Luo, P., Zhang, L., Chen, C. (2010) Microbiota of yellow grouper (*Epinephelus awoora* Temminck & Schlegel, 1842) fed two diets. *Aquacult. Res.*, 41, 1778–1790.
- Flegel, T., Lightner, D., Lo, C. F., & Owens, L. (2008). Shrimp Disease Control : Past, Present and Future. *Diseases in Asian Aquaculture VI*, 334–378.

- Flint, H., Scott, K., Louis, P., Duncan, S. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 577–589. doi:10.1038/nrgastro.2012.156
- Franco, J. (1989). *Manual de ecología*. Trillas. México. 128 p.
- Gao, F., Li, F., Tan, J., Yan, J., & Sun, H. (2014). Bacterial Community Composition in the Gut Content and Ambient Sediment of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* Revealed by 16S rRNA Gene Pyrosequencing, 9(6), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0100092>
- Gomez-Gil B, Tron-Mayen L, Roque A, Turnbull JF, Inglis V, Guerra-Flores AL (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph & digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1–9.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J. F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms, 259–270.
- Greenhill, A., Walter, J. (2015). The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans : Composition, Diversity Patterns, and Ecological Article The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, 527–538. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.049>
- Gross, R., Hacker, J., Goebel, W. (2003). The leopoldina international symposium on parasitism, commensalism and symbiosis - Common themes, different outcome. *Molecular Microbiology*, 47(6), 1749–1758. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03443.x
- Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 22, 14–19.

- Ha E. (2011). The impact of gut microbiota in human health and diseases: Implication for therapeutic potential. *Biomolecules and Therapeutics*, 19(2), 155–173. doi:10.4062/biomolther.2011.19.2.155
- Harris, J. (1993). The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microbial Ecology*, 25, 195–231. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/w5783532114128h1.pdf>
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00171889>
- Hernández, R., Velázquez, I., Orozco, M., Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: Grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton*, 79, 133–139.
- Hodgson, D., Rainey, P., Buckling, A. (2002). Mechanisms linking diversity, productivity and invasibility in experimental bacterial communities. *Proceedings. Biological Sciences / the Royal Society*, 269(1506), 2277–83. doi:10.1098/rspb.2002.2146
- Holmström C., Egan S., Franks A., McCloy S., Kjelleberg S. (2002) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol Ecol* 41:47–58
- Huang, Z., Li, X., Wang, L., & Shao, Z. (2014). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, (Harris 1993), 1–10. <http://doi.org/10.1111/are.12628>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J., Chinwalla, A. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.

- Icaza, M. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240–248.
- Jiajia, N., Yuhe, Y., Tanglin, Z., Lei, G. (2012). Comparison of intestinal bacterial communities in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, from two different habitats *, 30(5), 757–765.
- Kirchman, D. (2002). The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 91–100.
- Lande, R. (1996). Statistics and partitioning of species diversity, and similarity among multiple communities. *Oikos*, 76: 5-13.
- Li k., Zheng, T., Tian, Y., Yuan, J. (2007). Bacterial community structure in intestine of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.
- Li, E., Wang, X., Chen, K., Xu, C., Qin, J. G. and Chen, L. (2015). Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Rev Aquacult.* doi:10.1111/raq.12104
- Llewellyn, M., Boutin, S., Hoseinifar, S., Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, 5(June).
- Magurran, A. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Croom Helm, Londres, 179 p.
- Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp.

- Meziti, E., Kormas, K. (2012). Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 473–482.
- Mizrahi-Man, O., Davenport, E., Gilad, Y. (2013). Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE*, 8(1), 18–23. doi:10.1371/journal.pone.0053608
- Moreno, C. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *M&T - Manuales Y Tesis SEA*, 1, 84. doi:10.1371/journal.pone.0103709
- Muszer, M., Noszczyńska, M., Kasperkiewicz, K., Skurnik, M. (2015). Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. *Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis*. doi:10.1007/s00005-015-0332-3
- Navarro E. (2015). Caracterización de la comunidad bacteriana del sistema digestivo del camarón *Litopenaeus vannamei* afectado con la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas. Centro de investigación en Alimentación.
- O'Hara, A., Shanahan, F. (2007). Gut Microbiota: Mining for Therapeutic Potential. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5, 274–284.
- Oxley, A., Shipton, W., Owens, L., McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2), 214–223. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01673.x
- Ponce-Palafox, J. T., Ruiz-Luna, A., Castillo-Vargas, S., García-Ulloa, M., Arredondo-Figueroa, J. L. (2011). Technical, economics and environmental analysis of semi-intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in Sonora, Sinaloa and Nayarit states, at the east coast of the Gulf of California, México.

Ocean and Coastal Management, 54(7), 507–513.
doi:10.1016/j.ocecoaman.2011.03.008

Robinson, C., Bohannan, B., Young, V. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 74(3), 453–76. doi:10.1128/MMBR.00014-10

Rodicio, R., Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. doi:10.1016/S0213-005X(04)73073-6

Rungrasamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S, Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N. (2013). Bacterial Population in Intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) under Different Growth Stages. *PLoS ONE*, 8(4).

Rungrasamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., & Karoonuthaisiri, N. (2016). Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 12–19. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.004>

Schryver, P., & Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal*, 8(12), 2360–8. doi:10.1038/ismej.2014.84

Sha Y., Liu M., Jiang, K., Qi C., Wang L. (2016). Bacterial Population in Intestines of *Litopenaeus vannamei* Fed Different Probiotics or Probiotic Supernatant. 26, 1736–1745.

- Sogin, M., Morrison, H., Huber, J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 12115–20. doi:10.1073/pnas.0605127103
- Soto-Rodríguez S, Gómez-Gil B, Lozano R, Roque A (2010). Density of vibrios in hemolymph and hepatopancreas of diseased Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from northwestern Mexico. *J World Aquacult Soc* 41: 76–83.
- Stecher, B., Hardt, W. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 82–91. doi:10.1016/j.mib.2010.10.003
- Suárez, M. G., Medina, Z., Montiel, M., Ibarra, J., & Salcedo, A. (2015). Distribución de *Vibrio spp.* en agua y sedimento de estanques productores de camarón *Litopenaeus vannamei* cultivados con agua del lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista Científica, FCV-LUZ*, 25(4), 293-299.º
- Sullam, K., Essinger, S., Lozupone, C., Connor, M. (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis, 21(13).
- Tzuc, J., Escalante, D., Rojas, R., Gaxiola, G., Ortiz, M. (2014). Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus*, 3, 280.
- Vadstein, O., Schryver, P. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal*, 8(12), 2360–8. doi:10.1038/ismej.2014.84

- Whiteley, A., Jenkins, S., Waite, I., Kresoje, N., Payne, H., Mullan, B. (2012). Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform.80-88. doi:10.1016/j.mimet.2012.07.008
- Xiong J., Wang K., Wu J., Qionqian L., Kunjie Y., Qian Y., Zhang D. (2016). Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity with shrimp disease severity, (May 2015). <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6632-z>
- Xiong J., Zhu J, Zhang D. (2014). The application of bacterial indicator phylotypes to predict shrimp health status, (July). <http://doi.org/10.1007/s00253-014-5941y>
- Yoon, S., Kim, E., Lee, W. (2015). Functional genomic and metagenomic approaches to understanding gut microbiota–animal mutualism. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 38–46.
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Li, E. (2014). Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources, *Aquaculture*, 434, 449–455.
- Zheng, Y., Yu, M., Liu, Y., Su, Y., Xu, T., Yu, M., & Zhang, X. (2016). Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages, *Aquaculture*, 451, 163–169.
- Zhou, Z., Ding, Z., Huiyuan, L. (2007). Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 296–301. doi:10.1111/j.1749-7345.2007.00099.x

XI. ANEXOS

Anexo I. Purificación de sedimento

Para la purificación de sedimento se utilizó el kit AxygenPrep-PCR® column.

1. A 20 μ L de la muestra de ADN se le adicionó 100 μ L de Buffer PCR-A 3X y se agitó en vortex.
2. Se transfirió la mezcla a un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 13,200 rpm por 5 min.
3. Se añadió 700 μ L de Buffer W2 en la columna y centrifugó a 13,200 rpm por 7 min.
4. Se filtró y regresó la columna al tubo.
5. Se adicionaron 400 μ L de Buffer W2 y se centrifugó a 13,200 rpm por 5 min.
6. Se filtró y centrifugó a 13,200 rpm por 3min.
7. La columna se dejó secar en campana de flujo laminar durante 30 min.
8. Una vez secas las columnas se le adicionó 20 μ L de agua de 18 Ω estéril.
9. Se incubó durante 1 min y centrifugó a 12,000 rpm por 3 min.
10. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

Anexo II. Primers

Primers utilizados en la amplificación de la región V3 del gen 16S rRNA. Los primers forward, contienen el sitio de reconocimiento (en minúsculas), el código de barras (mayúsculas en negrita) las cuales son diferentes en cada primer y las secuencias de unión (mayúsculas).

Nombre del primer forward	Secuencia (5' - 3')
IonXpress_01_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG CTAAGGTAA gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_03_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG AAGAGGATTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_04_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TACCAAGATC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_05_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG CAGAAGGAAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_06_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG CTGCAAGTTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_07_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTCGTGATTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_08_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTCCGATAAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_09_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TGAGCGGAAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_10_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG CTGACCGAAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_11_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCCTCGAATC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_12_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TAGGTGGTTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_13_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCTAACGGAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_14_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTGGAGTGTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_15_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCTAGAGGTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_16_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCTGGATGAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_17_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCTATTCTGTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_18_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG AGGCAATTG CgataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_19_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTAGTCCGAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_21_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCGCAATTAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_22_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTCGAGACGC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_24_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG AACCTCATTTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_26_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTACAACCTTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_31_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCCAAGCTGC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_32_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TCTTACACAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_33_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTCTCATTTGAAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_37_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG CTTGAGAATGTC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_38_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TGGAGGACGGAC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_39_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TAACAATCGGC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_41_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG TTCCACTTCGC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG
IonXpress_43_V3f	ccatctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG CTTGACACCGC gataCTCCTACGGGAGGCAGCAG

IonXpress_45_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TGGAGCTTCCTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_47_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TAAGGCAACCAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_48_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TTCTAAGAGAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_49_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TCCTAACATAAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_50_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CGGACAATGGC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_58_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TCCTAGAACAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_60_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TCCTAGCTCTTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_63_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CCTTAGAGTTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_65_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TCCTGGCACATC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_66_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CCGCAATCATC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_67_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TTCTACCAGTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_70_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CCTACTGGTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_71_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TGAGGCTCCGA**CgatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_72_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CGAAGGCCACAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_75_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TCAGGAATAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_76_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CGGAAGAACCTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_77_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CGAAGCGATTTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_79_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CCTGGTTGTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_82_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TTGGCATCTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_83_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CTAGGACATTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_85_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CCAGCCTCAAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_86_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CTTGTTTATTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_87_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TTGGCTGGAC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_89_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TCCTGAATCTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_90_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CTAACCACGGC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_92_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CTAGGAACCGC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_94_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TCGGACAAGC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_95_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**CGGACAGATC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 IonXpress_96_V3f ccattctcatccctgCGTGTCTCCGACTCAG**TTAAGCGGTC**gatACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 16S-V3_533r CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTACCGCGGCTGCTGGCAC

Anexo III. Cuantificación de las librerías por Qubit™.

Los reactivos deben estar a temperatura ambiente y se diluyen las muestras 1:10.

1. Solución de trabajo. Se mezcló 1 μL de Qubit™ Reagent más 199 μL de Qubit™ Buffer por cada muestra a cuantificar.
2. Curva de calibración. Se utilizaron 190 μL de la solución de trabajo y se le adicionaron 10 μL del estándar 1 y 2 del kit (con una concentración conocida).
3. Preparación de las muestras. De la solución de trabajo se tomaron 199 μL y se añadió 1 μL del ADN purificado, posteriormente se dio vortex y se incubó a temperatura ambiente por 2 min, por último se leyeron las muestras por Qubit y se multiplicaron por 10 para obtener su valor real.

Anexo IV. Secuenciación masiva

Una vez que se tiene los fragmentos de ADN ligados los adaptadores, se prosigue con los siguientes pasos:

1. Preparación del templado

- Se comenzó con la preparación del templado (One Touch system) utilizando el kit Ion Touch 200 Supplies/Solutions, en este paso se inmovilizan los fragmentos a secuenciar en un sustrato específico (ISP's), que permite su amplificación, por PCR en emulsión.
- Se cuantifican el % de ISP vivas sobre las esferas totales con el kit One Touch 200 reagents.
- Se cuantificaron las ISP totales (10-30%) con el Qubit y utilizando el kit Ion Sphere Quality Control.
- Se enriquecieron las ISP utilizando el kit One Touch 200 reagents y se separaron las esferas positivas de las totales a través del sistema automatizado Ion One Touch ES.
- Se realiza otra cuantificación de las ISP vivas (>50%) nuevamente con el Qubit y el kit Ion Sphere Quality Control.

2. Lavado del Secuenciador

Previo a la secuenciación se requirió lavar el PGM:

- Se realizó un lavado de los contenedores de reactivos utilizando cloro.
- El equipo se lavó con agua destilada que no estuvo almacenada, es decir, recién filtrada.
- Se ajustó el pH de W2 (sales y detergentes) y W1 (solución de NaOH) tomando de referencia W3 hasta que llega a 7.7.
- Se realizó la primera inicialización utilizando El kit de secuenciación Ion PGM Sequencing 200 Kit v2.
- Se prepararon la ISP's que englobó el alineamiento de Primer seq, adición de test fragments (95pb) y de la polimerasa.

3. Cargado del Chip

- Para el cargado del chip 316 se siguió el protocolo establecido por Life Technologies.
- Las ISPs control se sometieron a un vortex y spin por 2 seg y se agregaron 5µL a 100 µL de ISPs con templado.
- Agregamos 150µL de buffer de alineamiento y se mezcla por pipeteo.
- Centrifugamos a 15500g x 4min y retiramos 240µL el volumen, dejando solamente 15µl, se le agregó 12µl de primer de secuenciación, homogenizamos y llevamos al termociclador.
- Después de salir del termociclador se agregaron 3 µl de polimerasa y 2µl del buffer de alineamiento, se incubó por 5 min.
- Se hizo el chequeo del chip como lo indica el equipo y se centrifugó por 1 min con el puerto de entrada hacia abajo.
- Se tomó todo el volumen (32µl) del tubo de PCR, inclinando el chip 45° y colocando la pipeta a 90° respecto al chip. Se cargó todo el líquido lentamente.
- Se centrifugó con el “tab in” por 1 min, después con el “tab out” por 1 min. finalmente se sacó todo el líquido y se volvió a introducir lentamente. Se centrifugo nuevamente con el “tab in” por 1min, se sacó todo el exceso del puerto de salida. Al final se introdujo en el secuenciador.

Anexo V. Pureza y concentración de ADN

Pureza y concentración obtenida de las muestras de heces donde, los dos primeros dígitos representan el número de organismo de donde proceso la muestra y el tercer número simboliza el tratamiento, para silvestres (0), ensayo 1 (1), cambio de dieta (2) y cambio de sustrato (3).

Muestra	Concentración ng/μL	Pureza 260/280	Muestra	Concentración ng/μL	Pureza 260/280
010	76.2	2.06	012 S/S AF	48.5	2.04
020	430	1.84	022 S/S AC	686.65	2.11
060	122.25	1.99	062 C/S AF	213.05	1.8
080	109.5	2.03	082 S/S AC	120.05	2.19
120	90.6	2.04	122 C/S AC	94.8	2.12
130	115.05	2.2	132 C/S AF	122.5	2.69
160	77.25	2	162 S/S AF	72.2	2.43
170	159.9	2.31	172 C/S AC	269.5	1.71
220	79.6	1.6	222 C/S AF	219.75	1.72
230	101.7	1.83	232 S/S AC	206.8	1.86
240	71.7	1.59	242 C/S AC	98.8	3.05
250	98.45	1.86	252 S/S AF	82.85	2.55
011 S/S AC	162.4	2.65	013 C/S AF	116.2	2.03
021 S/S AF	110.7	2.67	023 C/S AC	379.75	1.57
061 C/S AC	416.35	1.71	063 S/S AF	79	2.25
081 S/S AF	101.6	2.05	083 C/S AC	356.9	1.62
121 C/S AF	48.5	1.91	123 S/S AC	89.8	2.48
131 C/S AC	127.85	2.39	133 S/S AF	130.4	2.19
161 S/S AC	90.5	2.17	163 C/S AF	90.5	2.78
171 C/S AF	76.46	2.42	173 S/S AC	185.75	2.02
221 C/S AC	95.6	1.95	223 S/S AF	182.3	2.21
231 S/S AF	127.6	1.97	233 C/S AC	61.05	1.95
241 C/S AF	85.1	2.68	243 S/S AC	96.3	2.49
251 S/S AC	75.75	1.96	253 C/S AF	166.95	2.37

S/S: Sin sedimento, C/S: Con sedimento, AC: Alimento comercial, AF: Alimento fresco

Pureza y concentración obtenida de las muestras de alimento, agua y sedimento.

Muestra	Código de muestra	Concentración ng/μL	Pureza 260/280
Alimento fresco	AF	342.6	1.59
Alimento comercial	AB	6054.05	1.31
Agua sitio de muestreo	A0	92.65	1.96
Agua con sedimento de condiciones experimentales	ACS1	59.45	2.37
Agua sin sedimento de condiciones experimentales	ASS1	48.49	2.27
Agua con sedimento del cambio de sustrato	ACS3	10.65	1.08
Agua sin sedimento del cambio de sustrato	ASS3	112.3	2.33
Sedimento sitio de muestreo	S0	610.4	1.4
Sedimento de condiciones experimentales	S1	2112.9	1.4
Sedimento cambio de sustrato	S3	376.1	1.45

ASS agua sin sedimento, ACS agua con sedimento, S sedimento, A agua, CF calamar fresco, AB alimento balanceado, 0 silvestres, 1 condiciones experimentales, 3 cambio de sustrato.

Anexo VI. Concentración de ADN purificado

Cuantificación con Qubit® dsDNA HS Assay Kit.

Concentración		Concentración	
Muestra	ng/mL	Muestra	ng/μL
010	15,900	012 S/S AF	15,000
020	15,000	022 S/S AC	17,100
060	13,000	062 C/S AF	16,300
080	15,400	082 S/S AC	37,000
120	14,400	122 C/S AC	14,600
130	13,000	132 C/S AF	280,000
160	15,000	162 S/S AF	15,600
170	15,500	172 C/S AC	16,800
220	-	222 C/S AF	152,000
230	14,900	232 S/S AC	15,400
240	13,200	242 C/S AC	29,400
250	19,300	252 S/S AF	148,000
011 S/S AC	15,600	013 C/S AF	14,400
021 S/S AF	16,800	023 C/S AC	13,900
061 C/S AC	19,400	063 S/S AF	16,900
081 S/S AF	15,000	083 C/S AC	17,000
121 C/S AF	15,500	123 S/S AC	15,300
131 C/S AC	15,500	133 S/S AF	16,300
161 S/S AC	15,000	163 C/S AF	16,700
171 C/S AF	144,000	173 S/S AC	14,700
221 C/S AC	13,900	223 S/S AF	18,300
231 S/S AF	20,200	233 C/S AC	16,600
241 C/S AF	13,900	243 S/S AC	18,800
251 S/S AC	19,000	253 C/S AF	15,800
ASM	137,000	S0	14,400
ACS1	30,400	S1	10,300
ASS1	19,600	S3	105,000
ACS3	189,000	AF	129,000
ASS3	13,600	AC	24,400

S/S: Sin sedimento, C/S: Con sedimento, AC: Alimento comercial, AF: Alimento fresco, ASS agua sin sedimento, ACS agua con sedimento, S sedimento, A agua, CF calamar fresco, AB alimento balanceado, 0 silvestres, 1 condiciones experimentales, 3 cambio de sustrato.

ANEXO VII. Lecturas por muestra

Listado de secuencias crudas (lecturas del secuenciador) y útiles (>130 pb, libre de quimeras y de secuencias del gen 18s ribosomal de eucariontes o 16s de mitocondrias) de las muestras de camarón silvestre, las de las variantes del bioensayo, muestras de agua, sedimento y alimento.

Muestras de contenido intestinal de camarones silvestres

No. de Camarón	Tratamiento	Lecturas de secuenciador	Limpieza de secuencias	Descontaminación de quimeras	Descontaminación de eucariotas	% de eliminadas
2	Silvestre	36,098	24,209	23,383	23,271	35.53
8	Silvestre	18,971	16,533	15,059	14,729	22.36
23	Silvestre	19,832	13,526	11,955	11,661	41.20
12	Silvestre	119,753	57,330	54,550	53,590	55.24
17	Silvestre	149,856	110,443	105,466	105,283	29.74
1	Silvestre	30,145	19,837	18,917	18,710	37.93
16	Silvestre	29,367	25,785	23,436	23,258	20.80
6	Silvestre	60,126	19,654	18,488	18,220	69.69
13	Silvestre	113,591	60,672	56,119	55,708	50.95

Muestras de contenido intestinal de camarones de bioensayo

Variante del bioensayo	No. de Camarón	Tratamiento	Lecturas de secuenciador	Limpieza de secuencias	Descontaminación de quimeras	Descontaminación de eucariotas	% de eliminadas
Condiciones experimentales	2	S/S CF	22,583	13,950	13,462	13,440	40.49
	8	S/S CF	20,913	15,868	13,408	13,351	36.16
	23	S/S CF	215,962	183,666	179,913	179,854	16.72
	12	C/S CF	35,199	12,948	12,247	12,152	65.48
	17	C/S CF	86,139	45,534	44,141	43,938	48.99
	24	C/S CF	53,019	26,746	25,049	24,821	53.18
	1	S/S AB	53,579	35,224	33,714	33,201	38.03
	16	S/S AB	119,952	76,195	75,132	75,075	37.41
	25	S/S AB	17,741	10,719	10,589	10,583	40.35
	6	C/S AB	57,972	39,021	38,518	38,501	33.59
Cambio de dieta	13	C/S AB	32,518	20,995	20,582	20,513	36.92
	22	C/S AB	72,596	22,990	22,465	22,103	69.55
	2	S/S AB	87,334	62,987	62,254	62,253	28.72
	23	S/S AB	125,858	86,395	81,992	80,974	35.66
	12	C/S AB	20,575	16,242	14,971	14,781	28.16
	17	C/S AB	26,734	23,115	22,439	22,330	16.47
	24	C/S AB	24,459	18,298	18,040	17,997	26.42
	1	S/S CF	36,787	17,768	17,359	17,273	53.05
	16	S/S CF	33,711	23,089	22,357	22,327	33.77
	25	S/S CF	93,878	70,788	67,392	67,205	28.41
6	C/S CF	33,788	21,624	21,308	21,278	37.02	
13	C/S CF	28,265	12,706	12,160	11,983	57.60	
22	C/S CF	18,924	12,752	12,472	12,423	34.35	

Variante del bioensayo	No. de Camarón	Tratamiento	Lecturas de secuenciador	Limpieza de secuencias	Descontami-nación de quimeras	Descontami-nación de eucariotas	% de eliminadas
Cambio de sustrato	2	C/S AB	36,805	24,037	23,077	23,022	37.45
	8	C/S AB	39,594	31,642	30,169	30,137	23.88
	23	C/S AB	114,797	91,280	86,360	86,074	25.02
	17	S/S AB	40,348	27,041	26,377	26,264	34.91
	24	S/S AB	52,916	36,759	36,519	36,497	31.03
	1	C/S CF	30,350	25,759	24,623	24,594	18.97
	16	C/S CF	56,705	33,726	32,904	32,790	42.17
	25	C/S CF	25,992	18,805	16,377	16,336	37.15
	6	S/S CF	121,107	74,748	68,541	68,236	43.66
	13	S/S CF	91,771	58,979	56,383	55,898	39.09
	22	S/S CF	187,841	124,754	119,758	119,467	36.40

S/S: Sin sedimento, C/S: Con sedimento, AB: Alimento balanceado, CF: Calamar fresco

Muestra	Tratamiento	Lecturas de secuenciador	Limpieza de secuencias	Descontami-nación de quimeras	Descontami-nación de eucariotas	% de eliminadas
A0	Sitio de muestreo	28,842	20,513	19,927	19,857	31.15
ASS1	Condiciones experimentales	35,813	15,577	15,149	14,917	58.35
ACS1		35,995	23,174	22,525	22,269	38.13
S1		114,690	38,189	36,629	33,306	70.96
ASS3	Cambio de sustrato	37,938	23,481	22,199	22,068	41.83
ACS3		31,946	14,565	14,325	14,117	55.81
S3		20,078	11,299	11,000	10,921	45.61
CF	Alimento	22,600	15,965	15,356	14,856	34.27
AB		38,199	30,530	30,454	30,084	21.24

ASS agua sin sedimento, ACS agua con sedimento, S sedimento, A agua, CF calamar fresco, AB alimento balanceado, 0 silvestres, 1 condiciones experimentales, 3 cambio de sustrato.

ANEXO VIII. Taxas identificados en contenidos intestinales de camarón silvestre y provenientes del bioensayo

Taxas identificados en los contenidos intestinales de camarón silvestre

Phylum

[Caldithrix], [Parvarchaeota], [Thermi], AC1, Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, BHI80-139, BRC1, Caldithrix, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deferribacteres, Elusimicrobia, FBP, FCPU426, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, GN02, GN04, H-178, Hyd24-12, KSB3, LCP-89, Lentisphaerae, MVS-104, NC10, Nitrospirae, NKB19, OD1, OP1, OP11, OP3, OP8, Planctomycetes, Proteobacteria, SAR406, SBR1093, Spirochaetes, SR1, Synergistetes, Tenericutes, TM6, TM7, Verrucomicrobia, WPS-2, WS2, WS3, WWE1, ZB3.

Clase

[Brachyspirae], [Chloracidobacteria], [Cloacamonae], [Fimbriimonadia], [Lentisphaeria], [Leptospirae], [Methylacidiphilae], [Parvarchaea], [Pedosphaerae], [Rhodothermi], [Saprospirae], [Spartobacteria], 028H05-P-BN-P5, 3BR-5F, 4-29, 4C0d-2, 5bav_B12, AB16, ABY1, Acidimicrobiia, Acidobacteria-5, Acidobacteria-6, Acidobacteriia, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Anaerolineae, AT-s2-57, AT-s54, Bacilli, Bacteroidia, BB34, BD1-5, BD4-9, BD7-11, Betaproteobacteria, BME43, BPC102, BS119, BSV26, C6, Caldithrixae, Chlamydiia, Chlorobia, Chloroflexi, Chloroplast, Clostridia, Coriobacteriia, Cytophagia, DA052, Deferribacteres, Dehalococcoidetes, Deinococci, Deltaproteobacteria, EC214, Ellin6529, Elusimicrobia, Endomicrobia, Epsilonproteobacteria, Erysipelotrichi, Fibrobacteria, Flavobacteriia, Fusobacteriia, Gammaproteobacteria, Gemm-1, Gemm-2, Gemm-3, Gemm-4, Gemm-5, Gemm-6, Gemmatimonadetes, Gitt-GS-136, GKS2-174, GN05, GN10, GN15, HDBW-WB69, Holophagae, Ignavibacteria, IIB17, iii1-8, JL-ETNP-Z39,

Kazan-3B-09, koll11, KSB1, MB-A2-108, ML635J-21, Mollicutes, MSB-5A5, MSBL6, MVP-15, Nitriliruptoria, Nitrospira, noFP_H4, Nostocophycideae, NPL-UPA2, ODP123, OM190, OP8_1, OP8_2, OPB41, OPB56, Opitutae, Oscillatoriophycideae, OS-K, PBS-25, Phycisphaerae, Pla3, Pla4, Planctomycetia, PRR-11, PRR-12, RB25, Rubrobacteria, S085, SAR202, SAW1_B44, SAW1_B6, SBRH58, SC3, SHA-109, SHA-114, SJA-28, SJA-4, SM2F11, Solibacteres, Sphingobacteriia, Spirochaetes, Sva0725, Synechococcophycideae, Synergistia, TA18, TG3, Thermoleophilia, Thermomicrobia, TK10, TK17, TM1, TM7-1, TM7-3, TSBW08, Unassigned, Unclassified, vadinHA49, VC2_1_Bac22, Verruco-5, Verrucomicrobiae, VHS-B5-50, wb1-A12, WM88, ZB2.

Orden

[Brachyspirales], [Chthoniobacterales], [Cloacamonales], [Entotheonellales], [Fimbriimonadales], [Leptospirales], [Marinicellales], [Pedosphaerales], [Pelagicoccales], [Rhodothermales], [Roseiflexales], [Saprospirales], 0319-7L14, 11-24, 34P16, Acholeplasmatales, Acidimicrobiales, Acidobacteriales, Actinomycetales, Aeromonadales, agg27, AKAU3564, AKYG1722, AKYG885, Alteromonadales, Anaerolineales, Anaeroplasmatales, Ardenscatenales, ASSO-13, B110, Bacillales, Bacteroidales, BD7-3, Bdellovibrionales, BPC015, BPC076, Burkholderiales, C20, Caldilineales, Caldithriales, Campylobacterales, Cardiobacteriales, Caulobacterales, CCU21, CFB-26, Chlamydiales, Chlorobiales, Chlorophyta, Chromatiales, Chroococcales, CL500-15, Clostridiales, Coriobacteriales, Cryptophyta, CV90, CW040, Cytophagales, d113, Deferribacterales, Dehalococcoidales, Deinococcales, Desulfarculales, Desulfobacterales, Desulfovibrionales, Desulfuromonadales, DRC31, DS-18, DTB120, Ellin329, Ellin6067, Ellin6513, Elusimicrobiales, Enterobacteriales, envOPS12, Erysipelotrichales, Euglenozoa, Euzebyales, FAC87, FAC88, Fibrobacterales, Flavobacteriales, FS117-23B-02, Fusobacteriales, Gaiellales, Gallionellales, GCA004, Gemmatales, Gemmatimonadales, GIF10, GIF9, GMD14H09, GN03, GW-22, Halanaerobiales, Haloplasmatales, Haptophyceae,

HMMVPog-54, HOC36, Holophagales, HTCC2188, Hydrogenophilales, I025, Ignavibacteriales, Ilb, iii1-15, IndB3-24, JG30-KF-CM45, KD8-87, Kiloniellales, Lactobacillales, LD1-PA13, LD1-PB3, Legionellales, Lentisphaerales, M2PT2-76, MBNT15, MD2894-B20, Methylacidiphilales, Methylococcales, Methylophilales, MIZ46, MLE1-12, MND1, MSB-1E9, MSB-5B5, MSBL3, MVP-88, MVS-107, MVS-40, MWH-UniP1, Mycoplasmatales, Myxococcales, NB1-j, Neisseriales, Nitriliruptorales, Nitrosomonadales, Nitrospirales, NKB15, Nostocales, O4D2Z37, Oceanospirillales, OPB11, Oscillatoriales, Pasteurellales, PB19, PBS-III-9, PeHg47, PHOS-HD29, Phycisphaerales, Pirellulales, PK29, PK329, PL-11B10, Pseudanabaenales, Pseudomonadales, R76-B128, RB41, RF39, Rhizobiales, Rhodobacterales, Rhodocyclales, Rhodophyta, Rhodospirillales, Rickettsiales, Rubrobacterales, S0208, S1198, Salinisphaerales, SB-34, S-BQ2-57, SBR1031, SBYZ_6080, SC-I-84, Sediment-1, SHA-124, SHA-20, SJA-15, SM2F09, Solibacterales, Solirubrobacterales, Sphingobacteriales, Sphingomonadales, Spirobacillales, Spirochaetales, SSS58A, ST-3K15, Stigonematales, Stramenopiles, Streptophyta, Sva0485, Sva0725, Sva0853, Synechococcales, Synergistales, Syntrophobacterales, T8-B82, TG3-1, TG3-2, Thiobacterales, Thiohalorhabdadales, Thiotrichales, Turicibacterales, UA01, Ucm1571, Unassigned, Unclassified, Verrucomicrobiales, Vibrionales, Victivallales, wb1_H11, WCHB1-41, WCHB1-81, Xanthomonadales, YJF2-48, YLA114, YS2, Z20.

Familia

[Acidaminobacteraceae], [Amoebophilaceae], [Balneolaceae], [Chromatiaceae], [Chthoniobacteraceae], [Entotheonellaceae], [Exiguobacteraceae], [Fimbriimonadaceae], [Kouleothrixaceae], [Marinicellaceae], [Mogibacteriaceae], [Odoribacteraceae], [Paraprevotellaceae], [Pelagicococcaceae], [Thermodesulfovibrionaceae], [Tissierellaceae], [Weeksellaceae], 0319-6A21, 0319-6G20, 125ds10, 211ds20, 3H8, A0-023, A4b, Acetobacteraceae, Acholeplasmataceae, Acidobacteriaceae, ACK-M1, Actinomycetaceae, Aerococcaceae, Aeromonadaceae, AK1AB1_02E, AKIW659, Alcaligenaceae,

Alcanivoracaceae, Alicyclobacillaceae, Alteromonadaceae, Anaerolinaceae, Anaeroplasmataceae, Anaplasmataceae, Ardenscatenaceae, At425_EubF1, Aurantimonadaceae, auto67_4W, BA008, BA059, Bacillaceae, Bacteriovoracaceae, Bacteroidaceae, Bartonellaceae, Bdellovibrionaceae, Beijerinckiaceae, Bradyrhizobiaceae, Brevibacteriaceae, Burkholderiaceae, C111, Caldilineaceae, Caldithrixaceae, Campylobacteraceae, Caulobacteraceae, Cellulomonadaceae, Chitinophagaceae, Chlamydomonadaceae, Chlorobiaceae, Christensenellaceae, Chromatiaceae, Clostridiaceae, Cohaesibacteraceae, Colwelliaceae, Comamonadaceae, Conexibacteraceae, Coriobacteriaceae, Corynebacteriaceae, Coxiellaceae, Cryomorphaceae, CV106, Cyanobacteriaceae, Cyclobacteriaceae, Cystobacterineae, Cytophagaceae, Deferribacteraceae, Dehalobacteriaceae, Dehalococcoidaceae, Deinococcaceae, Dermabacteraceae, Desulfarculaceae, Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae, Desulfomicrobiaceae, Desulfovibrionaceae, Desulfuromonadaceae, Dethiosulfovibrionaceae, Dietziaceae, Dolo_23, EB1017, Ectothiorhodospiraceae, Ellin515, Ellin6075, Endozoicimonaceae, Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Erysipelotrichaceae, Erythrobacteraceae, EtOH8, Eubacteriaceae, Euzebyaceae, Ferrimonadaceae, Fibrobacteraceae, Flammeovirgaceae, Flavobacteriaceae, Francisellaceae, Fusobacteriaceae, Gaiellaceae, Gallionellaceae, Gemmataceae, Gemmatimonadaceae, Geobacteraceae, Geodermatophilaceae, Gomphosphaeriaceae, Gracilibacteraceae, GZKB119, Hahellaceae, Halanaerobiaceae, Haliangiaceae, Halobacteroidaceae, Halomonadaceae, Haloplasmataceae, Helicobacteraceae, Holophagaceae, HTCC2089, HTCC2188, Hydrogenophilaceae, Hyphomicrobiaceae, Hyphomonadaceae, Idiomarinaceae, Ignavibacteriaceae, Intrasporangiaceae, Isosphaeraceae, JdFBGBact, Jonesiaceae, JTB36, JTB38, Kiloniellaceae, koll13, kpj58rc, KSB4, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, LD19, LD1-PA34, Legionellaceae, Leptospiraceae, Leptotrichiaceae, Leuconostocaceae, IheB3-7, Mamiellaceae, Marinilabiaceae, mb2424, Methylobacteriaceae, Methylococcaceae, Methylocystaceae, Methylophilaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Micromonosporaceae, ML635J-40, MND4,

Moraxellaceae, *MSBL8*, *Mycobacteriaceae*, *Mycoplasmataceae*,
Myxococcaceae, *Nannocystaceae*, *NB1-i*, *Neisseriaceae*, *Nitriliruptoraceae*,
Nitrosomonadaceae, *Nitrospiraceae*, *Nocardioideae*, *Nostocaceae*,
Oceanospirillaceae, *Oleiphilaceae*, *OM27*, *OM60*, *Oxalobacteraceae*,
Paenibacillaceae, *Pasteurellaceae*, *PAUC26f*, *Pelagibacteraceae*,
Pelobacteraceae, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Phormidiaceae*,
Phycisphaeraceae, *Phyllobacteriaceae*, *Pirellulaceae*, *Piscirickettsiaceae*,
Planococcaceae, *Polyangiaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*,
Propionibacteriaceae, *Pseudanabaenaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*,
Pseudomonadaceae, *Pseudonocardiaceae*, *Psychromonadaceae*, *R4-41B*,
RB40, *RFP12*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodobiaceae*,
Rhodocyclaceae, *Rhodospirillaceae*, *Rhodothermaceae*, *Rickettsiaceae*,
Rikenellaceae, *Rivulariaceae*, *Rubrobacteraceae*, *Ruminococcaceae*, *S25_1238*,
Saccharospirillaceae, *Salinisphaeraceae*, *Saprospiraceae*, *SB-1*, *Sediment-4*,
SHA-31, *Shewanellaceae*, *Simkaniaceae*, *Sinobacteraceae*, *SJA-101*,
Solibacteraceae, *Sphingobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Spirochaetaceae*,
Sporichthyaceae, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Streptomycetaceae*,
SUP05, *Synechococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Syntrophobacteraceae*,
Thiotrichaceae, *TK06*, *Trebouxiophyceae*, *Trueperaceae*, *TSCOR003-O20*,
Turicibacteraceae, *Ulvophyceae*, *Unassigned*, *Unclassified*, *V1B07b93*,
VC21_Bac22, *Veillonellaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Vibrionaceae*,
Victivallaceae, *Waddliaceae*, *wb1_P06*, *Xanthobacteraceae*,
Xanthomonadaceae, *Xenococcaceae*.

Genero

[Prevotella], *Acholeplasma*, *Achromobacter*, *Acidaminobacter*, *Acinetobacter*,
Actinomyces, *Actinomycetospira*, *Adhaeribacter*, *Aequorivita*, *Aeromonas*,
Afifella, *Agrobacterium*, *Agrococcus*, *Agromyces*, *Alcanivorax*, *Alicyclobacillus*,
Allochromatium, *Alloiococcus*, *Alteromonas*, *Amaricoccus*, *Amycolatopsis*,
Anaerofustis, *Anaerolinea*, *Anaeromyxobacter*, *Anaeroplasma*, *Anaerospora*,
Anaerovibrio, *Anoxybacillus*, *Aquaspirillum*, *Arcobacter*, *Ardenscatena*,

Mycoplasma, Myroides, Neorickettsia, Nesterenkonia, Nevskia, Nitrincola, Nitrospira, Nocardioides, Nostoc, Novispirillum, Novosphingobium, NP25, nsmpVI18, Oceanimonas, Octadecabacter, Odoribacter, Oleibacter, Olivibacter, Owenweeksia, Paenibacillus, Paludibacter, Paracoccus, Pectinatus, Pedobacter, Pedomicrobium, Pelagicoccus, Pelobacter, Peptoniphilus, Perlucidibaca, Phaeobacter, Phaeospirillum, Photobacterium, Phyllobacterium, Planococcus, Planomicrobium, Pleomorphomonas, Plesiocystis, Plesiomonas, Polaribacter, Polynucleobacter, Pontibacter, Prevotella, Prochlorothrix, Propionibacterium, Propionivibrio, Prosthecobacter, Proteiniclasticum, Proteus, Providencia, PSB-M-3, Pseudanabaena, Pseudidiomarina, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Pseudonocardia, Pseudoxanthomonas, Psychrilyobacter, Psychrobacter, Psychromonas, Pyramidobacter, Ralstonia, Reinekea, Rheinheimera, Rhodobaca, Rhodobacter, Rhodoferax, Rhodoplanes, Rhodovibrio, Rhodovulum, Robiginitalea, Roseivirga, RS62, Rubellimicrobium, Rubricoccus, Rubritalea, Rubrobacter, Ruminococcus, Rummeliibacillus, Saccharospirillum, Salinibacterium, Salinicoccus, Salinisphaera, Saprospira, Sediminibacterium, Segetibacter, Serratia, SGUS912, SHD-231, Shewanella, SJA-88, SMB53, Smithella, Solibacillus, Sphingobacterium, Sphingobium, Sphingomonas, Sphingopyxis, Spirochaeta, Spirosoma, Sporocytophaga, Sporosarcina, Sporotomaculum, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Steroidobacter, Streptococcus, Streptomyces, Sulfuricurvum, Sulfurimonas, Sulfurospirillum, Synechococcus, Syntrophobacter, T78, Tenacibaculum, Tepidibacter, Tepidimonas, Tessaracoccus, Thalassomonas, Thalassospira, Thauera, Thermomonas, Thioalkalivibrio, Thiobacillus, Thiococcus, Thiolamprovum, Thiomicrospira, Thiothrix, Tissierella_Soehngenia, Treponema, Turicibacter, Turneriella, Uliginosibacterium, Unassigned, Unclassified, Vagococcus, Verrucomicrobium, Vibrio, Vogesella, Waddlia, Wandonia, Wautersiella, WH1-8, Winogradskyella, Wolbachia, Z-35, Zoogloea.

Especie

acetiphilus, acidaminiphila, acnes, algae, amazonensis, aminovorans, angustum, aurantia, aureum, bacteriovorus, brunescens, caccae, caseolyticus, cereus, chondroitinus, cohaerens, damselae, dieselolei, effusa, flexus, fortis, fulvum, fusca, genosp., gyiorum, homiensis, hongkongensis, johnsonii, kestanbolensis, kujiense, lwoffii, maitriensis, marcescens, marincola, melaninogenica, mexicana, mobilis, morganii, multivorans, multivorum, neonatale, ochracea, odoratimimus, otitis, pacificensis, palustris, parvum, pedioforme, perfringens, raciborskii, reuszeri, rhizosphaerae, rosenbergii, ruthenica, salaria, salmoninarum, sanguinis, schindleri, selenatarsenatis, serpens, shigelloides, shilonii, somerae, stutzeri, succinicans, tapetis, thalassocola, thermophila, Unassigned, Unclassified, venetianus, veronii, vinosum, wittichii, xiamenensis.

Taxas identificados en los contenidos intestinales de camarón de bioensayo

Filo

[Caldithrix], [Thermi], AC1, Acidobacteria, Actinobacteria, Armatimonadetes, Bacteroidetes, BHI80-139, BRC1, Caldithrix, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, GAL15, Gemmatimonadetes, GN02, GN04, H-178, Hyd24-12, KSB3, LCP-89, Lentisphaerae, Nitrospirae, NKB19, OD1, OP1, OP3, OP8, Planctomycetes, Proteobacteria, SAR406, SBR1093, Spirochaetes, SR1, Synergistetes, Tenericutes, TM6, TM7, Unassigned, Unclassified, Verrucomicrobia, WPS-2, WS2, WS3, WWE1, ZB3.

Clase

[Chloracidobacteria], [Cloacamonae], [Fimbriimonadia], [Lentisphaeria], [Leptospirae], [Methylacidiphilae], [Pedosphaerae], [Rhodothermi], [Saprospirae], [Spartobacteria], [Thermobacula], 028H05-P-BN-P5, 3BR-5F, 4C0d-2, AB16,

ABY1, Acidimicrobiia, Acidobacteria-6, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Anaerolineae, AT-s2-57, AT-s54, Bacilli, Bacteroidia, BB34, BD1-5, BD4-9, BD7-11, Betaproteobacteria, BME43, BPC102, BS119, BSV26, C6, Caldithrixae, Chlamydiia, Chlorobia, Chloroflexi, Chloroplast, Clostridia, Coriobacteriia, Cytophagia, DA052, Dehalococcoidetes, Deinococci, Deltaproteobacteria, EC214, Ellin6529, Elusimicrobia, Epsilonproteobacteria, Erysipelotrichi, Fibrobacteria, Flavobacteriia, Fusobacteriia, Gammaproteobacteria, Gemm-1, Gemm-2, Gemm-3, Gemm-4, Gemm-5, Gemmatimonadetes, Gitt-GS-136, Gloeobacterophycideae, GN10, GN15, Holophagae, Ignavibacteria, IIB17, iii1-8, koll11, KSB1, MAT-CR-H3-D11, MB-A2-108, ML635J-21, Mollicutes, MSBL6, MVP-15, Nitriliruptoria, Nitrospira, Nostocophycideae, NPL-UPA2, ODP123, OM190, OP8_1, OP8_2, OPB41, OPB56, Opitutae, Oscillatorioophycideae, OS-K, Phycisphaerae, Pla3, Planctomycetia, PRR-11, PRR-12, RB25, Rs-J96, Rubrobacteria, S085, SAR202, SAW1_B44, SAW1_B6, SBRH58, SBZP_4958, SHA-109, SHA-114, SJA-28, SJA-4, SM2F11, Solibacteres, Sphingobacteriia, Spirochaetes, Sva0725, Synechococcophycideae, Synergistia, TA18, TG3, Thermoleophilia, Thermomicrobia, TK10, TM7-1, TM7-3, TSBW08, Unassigned, Unclassified, vadinHA49, Verruco-5, Verrucomicrobiae, VHS-B5-50, WM88, ZB2.

Orden

[Cerasicoccales], [Chthoniobacterales], [Cloacamonales], [Entotheonellales], [Fimbriimonadales], [Leptospirales], [Marinicellales], [Pedosphaerales], [Rhodothermales], [Roseiflexales], [Saprospirales], [Thermobaculales], 0319-7L14, 258ds10, 34P16, Acidimicrobiales, Actinomycetales, Aeromonadales, agg27, AKYG1722, AKYG885, Alteromonadales, Anaerolineales, Anaeroplasmatales, Ardenscatenales, B110, B97, Bacillales, Bacteroidales, BD7-3, Bdellovibrionales, Bifidobacteriales, BPC015, BPC076, Burkholderiales, C20, Caldilineales, Caldithrixaes, Campylobacterales, Cardiobacteriales, Caulobacterales, CCM11a, CCU21, CFB-26, Chlamydiales, Chlorobiales, Chlorophyta, Chromatiales, Chroococcales, CL500-15, Clostridiales, Coriobacteriales, Cryptophyta, CV90, CW040, Cytophagales, d113,

Dehalococcoidales, *Deinococcales*, *Desulfarculales*, *Desulfobacterales*,
Desulfovibrionales, *Desulfuromonadales*, *DRC31*, *DS-18*, *Ellin329*, *Ellin5290*,
Ellin6067, *Ellin6513*, *Elusimicrobiales*, *Enterobacterales*, *envOPS12*,
Erysipelotrichales, *Euzebyales*, *EW055*, *Fibrobacterales*, *Flavobacterales*,
FS117-23B-02, *Fusobacterales*, *Gaiellales*, *GCA004*, *Gemmatales*,
Gemmatimonadales, *GIF10*, *GIF9*, *Gloeobacterales*, *GMD14H09*, *GN03*, *GW-22*,
GW-28, *H39*, *Halanaerobiales*, *Haloplasmatales*, *Haptophyceae*, *HMMVPog-54*,
HOC36, *Holophagales*, *HTCC2188*, *Hydrogenophilales*, *Ignavibacterales*, *iii1-15*,
JG30-KF-CM45, *KD8-87*, *Kiloniellales*, *Kordiimonadales*, *Lactobacillales*, *LD1-
PA13*, *LD1-PB3*, *Legionellales*, *Lentisphaerales*, *M2PT2-76*, *Methylacidiphilales*,
Methylococcales, *Methylophilales*, *Micrococcales*, *MIZ46*, *MLE1-12*, *MND1*,
MSB-1E9, *MVP-88*, *MVS-107*, *MVS-40*, *MWH-UniP1*, *Myxococcales*, *NB1-j*,
Neisseriales, *Nitriliruptorales*, *Nitrosomonadales*, *Nitrospirales*, *NKB15*,
noFP_H7, *Nostocales*, *O4D2Z37*, *Oceanospirillales*, *OPB11*, *OPB54*,
Oscillatoriales, *Pasteurellales*, *PB19*, *PBS-III-9*, *PeHg47*, *PHOS-HD29*,
Phycisphaerales, *PK29*, *PK329*, *PL-11B10*, *Planctomycetales*, *Procabacterales*,
Pseudanabaenales, *Pseudomonadales*, *Puniceicoccales*, *R76-B128*, *RB41*,
RF32, *RF39*, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodocyclales*, *Rhodospirillales*,
Rickettsiales, *Rubrobacterales*, *S0208*, *S1198*, *Salinisphaerales*, *SB-34*,
SBR1031, *SC-I-84*, *Sediment-1*, *SHA-20*, *SJA-15*, *SM1D11*, *SM2F09*,
Solibacterales, *Solirubrobacterales*, *Sphingobacterales*, *Sphingomonadales*,
Spirobacillales, *Spirochaetales*, *Stramenopiles*, *Streptophyta*, *Sva0485*,
Sva0725, *Sva0853*, *Synechococcales*, *Synergistales*, *Syntrophobacterales*, *TG3-
1*, *TG3-2*, *Thiobacterales*, *Thiohalorhabdales*, *Thiotrichales*, *UA01*, *Ucn15732*,
Unassigned, *Unclassified*, *Verrucomicrobiales*, *Vibrionales*, *Victivallales*,
wb1_H11, *WCHB1-41*, *WCHB1-81*, *WM105*, *Xanthomonadales*, *YS2*, *Z20*.

Familia

<i>[Acidaminobacteraceae]</i> ,	<i>[Amoebophilaceae]</i> ,	<i>[Balneolaceae]</i> ,
<i>[Cerasioccaceae]</i> ,	<i>[Chromatiaceae]</i> ,	<i>[Chthoniobacteraceae]</i> ,
<i>[Entotheonellaceae]</i> ,	<i>[Exiguobacteraceae]</i> ,	<i>[Fimbriimonadaceae]</i> ,

[*Kouleothrixaceae*], [*Marinicellaceae*], [*Mogibacteriaceae*], [*Thermobaculaceae*], [*Thermodesulfovibrionaceae*], [*Tissierellaceae*], [*Weeksellaceae*], 125ds10, A4b, *Acetobacteraceae*, *Actinosynnemataceae*, *Aerococcaceae*, *Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Alcanivoracaceae*, *Alteromonadaceae*, *Anaerolinaceae*, *Anaeroplasmataceae*, *Arctic95B-10*, *Ardenscatenaceae*, *At425_EubF1*, *Aurantimonadaceae*, *BA008*, *BA059*, *Bacillaceae*, *Bacteriovoracaceae*, *Bacteroidaceae*, *Bartonellaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Brucellaceae*, *Burkholderiaceae*, *C111*, *Caldicoprobacteraceae*, *Caldilineaceae*, *Caldithrixaceae*, *Campylobacteraceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Cellulomonadaceae*, *Chitinophagaceae*, *Chlorobiaceae*, *Christensenellaceae*, *Chromatiaceae*, *Clostridiaceae*, *Cohaesibacteraceae*, *Colwelliaceae*, *Comamonadaceae*, *Conexibacteraceae*, *Coriobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Coxiellaceae*, *Crenotrichaceae*, *Cryomorphaceae*, *CV106*, *Cyanobacteriaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Cystobacterineae*, *Cytophagaceae*, *Dehalobacteriaceae*, *Dehalococcoidaceae*, *Deinococcaceae*, *Dermabacteraceae*, *Dermacoccaceae*, *Desulfarculaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfomicrobiaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Dethiosulfovibrionaceae*, *Dietziaceae*, *EB1017*, *Ectothiorhodospiraceae*, *Ellin6075*, *Endoecteinascidiaceae*, *Endozoicimonaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Eubacteriaceae*, *Euzebyaceae*, *Ferrimonadaceae*, *Fibrobacteraceae*, *Flammeovirgaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Francisellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Gaiellaceae*, *Gemmataceae*, *Gemmatimonadaceae*, *Geobacteraceae*, *Geodermatophilaceae*, *Gloeobacteraceae*, *Glycomycetaceae*, *Gomphosphaeriaceae*, *Gordoniaceae*, *Gracilibacteraceae*, *Hahellaceae*, *Halanaerobiaceae*, *Haliangiaceae*, *Halobacteroidaceae*, *Halomonadaceae*, *Haloplasmataceae*, *Helicobacteraceae*, *Holophagaceae*, *Holosporaceae*, *HTCC2089*, *HTCC2188*, *Hydrogenophilaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Hyphomonadaceae*, *Idiomarinaceae*, *Ignavibacteriaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Isosphaeraceae*, *J115*, *JdFBGBact*, *JTB215*, *JTB36*, *JTB38*,

Kiloniellaceae, *koll13*, *Kordiimonadaceae*, *kpj58rc*, *KSB4*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Legionellaceae*, *Leptospiraceae*, *Leptotrichiaceae*, *Leuconostocaceae*, *lheB3-7*, *Listeriaceae*, *Marinilabiaceae*, *mb2424*, *Methylobacteriaceae*, *Methylococcaceae*, *Methylocystaceae*, *Methylophilaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Micromonosporaceae*, *Microthrixaceae*, *mitochondria*, *ML635J-40*, *MND4*, *Moraxellaceae*, *MSB-4E2*, *Mycobacteriaceae*, *Nannocystaceae*, *NB1-i*, *Neisseriaceae*, *Nitriliruptoraceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Nitrospinaceae*, *Nitrospiraceae*, *Nocardiaceae*, *Nocardioidaceae*, *Nocardiopsaceae*, *Nostocaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Oleiphilaceae*, *OM27*, *OM60*, *Oxalobacteraceae*, *Paenibacillaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Pasteurellaceae*, *PAUC26f*, *Pelagibacteraceae*, *Pelobacteraceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Phormidiaceae*, *Phycisphaeraceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Piscirickettsiaceae*, *Planctomycetaceae*, *Planococcaceae*, *Polyangiaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Procabacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Pseudanabaenaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Psychromonadaceae*, *Puniceicoccaceae*, *RB40*, *RFP12*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodobiaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Rhodothermaceae*, *Rickettsiaceae*, *Rubrobacteraceae*, *Ruminococcaceae*, *Saccharospirillaceae*, *Salinisphaeraceae*, *Saprospiraceae*, *SB-1*, *SHA-31*, *Shewanellaceae*, *Simkaniaceae*, *Sinobacteraceae*, *SJA-101*, *Sphingobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Spirochaetaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Streptomycetaceae*, *Succinivibrionaceae*, *SUP05*, *Synechococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Syntrophobacteraceae*, *Thermomonosporaceae*, *Thiohalorhabdaceae*, *Thiotrichaceae*, *TK06*, *Trebouxiophyceae*, *Trueperaceae*, *TSCOR003-O20*, *Tsakamurellaceae*, *Unassigned*, *Unclassified*, *VC21_Bac22*, *Veillonellaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Vibrionaceae*, *Victivallaceae*, *Waddliaceae*, *wb1_P06*, *Xanthobacteraceae*, *Xanthomonadaceae*, *Xenococcaceae*.

Genero

[*Ruminococcus*], 5-7N15, *Achromobacter*, *Acidaminobacter*, *Acidocella*, *Acinetobacter*, *Actinoallomurus*, *Actinobacillus*, *Actinomycetospora*, *Adhaeribacter*, *Aequorivita*, *Aeromicrobium*, *Afifella*, *Agarivorans*, *Agrobacterium*, *Agrococcus*, *Alcanivorax*, *Alkaliphilus*, *Alteromonas*, *Amaricoccus*, *Ammoniphilus*, *Amphritea*, *Anaerococcus*, *Anaerolinea*, *Anaeroplasma*, *Anaerospora*, *Anoxybacillus*, *Aquicella*, *Arcobacter*, *Ardenscatena*, *Arthrobacter*, *Asticcacaulis*, *Atopobium*, *Azospirillum*, B-42, *Bacillus*, *Bacteriovorax*, *Bacteroides*, *Balneola*, BD2-13, BD2-6, *Bdellovibrio*, *Brachybacterium*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Brochothrix*, *Bulleidia*, *Burkholderia*, C1_B004, *Caldicoprobacter*, *Caldilinea*, *Caloramator*, *Candidatus Aquiluna*, *Candidatus Entotheonella*, *Candidatus Portiera*, *Candidatus Xiphinematobacter*, *Cardiobacterium*, *Carnobacterium*, *Celerinatantimonas*, *Cellulomonas*, *Cerasicoccus*, *Cetobacterium*, CF-26, *Chromohalobacter*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Cloacibacterium*, *Clostridiisalibacter*, *Clostridium*, *Cohaesibacter*, *Colwellia*, *Comamonas*, *Congregibacter*, *Coprococcus*, *Coraliomargarita*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Crenothrix*, *Crocinitomix*, *Cryomorpha*, *Cupriavidus*, *Cyanobacterium*, *Dechloromonas*, *Dehalobacterium*, *Deinococcus*, *Delftia*, *Demequina*, *Dermacoccus*, *Desulfarculus*, *Desulfobacca*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfocapsa*, *Desulfococcus*, *Desulfofrigus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonile*, *Desulfosarcina*, *Desulfosporosinus*, *Desulfotalea*, *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas*, *Dethiosulfatibacter*, *Devosia*, *Dinoroseobacter*, *Dokdonella*, *Dorea*, *Echinicola*, *Ectothiorhodospira*, *Edwardsiella*, *Enhydrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Enterovibrio*, *Epulopiscium*, *Erwinia*, *Erythrobacter*, *Euzebya*, *Exiguobacterium*, *Ferrimonas*, *Fimbriimonas*, *Flavisolibacter*, *Flavobacterium*, *Flexithrix*, *Fluviicola*, *Francisella*, *Fulvivirga*, *Fusibacter*, *Fusobacterium*, *Gemmatimonas*, *Geobacillus*, *Geobacter*, *Geodermatophilus*, *Geosporobacter_Thermotalea*, *Glaciecola*, *Gloeobacter*, *Glycomyces*, *Gordonia*, GW-34, HA73, *Haererehalobacter*, *Hahella*, *Halochromatium*, *Halomicronema*, *Halomonas*, *Halorhodospira*, HTCC, HTCC2207, *Hydrocarboniphaga*, *Hydrogenophilus*, *Hymenobacter*,

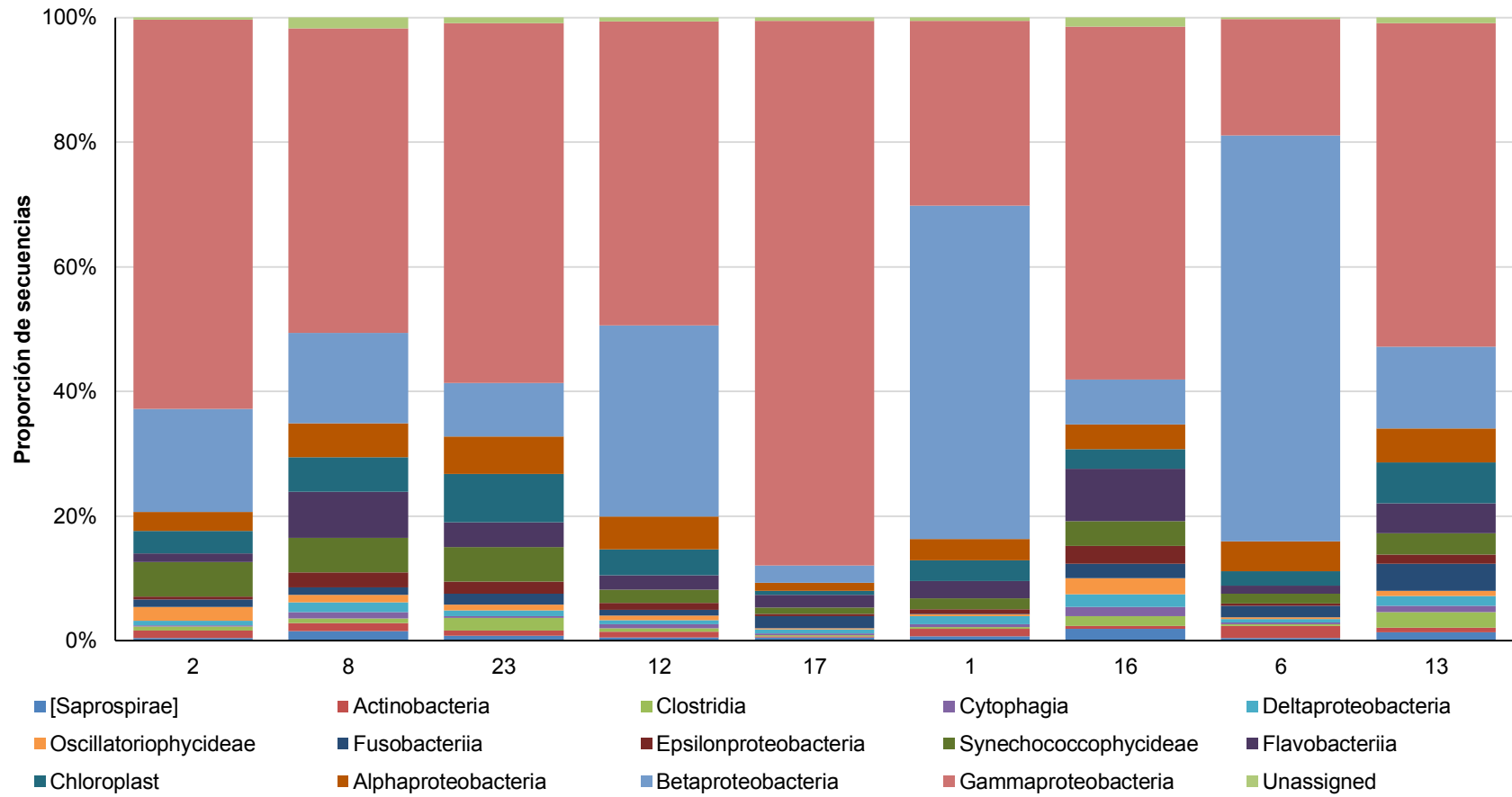
Hyphomicrobium, Hyphomonas, Idiomarina, Ignavibacterium, Inquilinus, Jeotgalicoccus, Jiangella, Kaistobacter, Klebsiella, Kocuria, Kordia, KSA1, Labrys, Lactobacillus, Lactococcus, LCP-26, LCP-6, Leadbetterella, Legionella, Leptolyngbya, Leptonema, Leptospira, Leptotrichia, Leucobacter, Leuconostoc, Lewinella, Limnobacter, Loktanella, Luteibacter, Luteolibacter, Lutibacterium, Lysinibacillus, Lysobacter, Macrococcus, Magnetospirillum, Maricaulis, Marinicella, Marinimicrobium, Marinobacter, Marinococcus, Marinomonas, Marivita, Melitea, Mesonia, Mesorhizobium, Methylibium, Methylobacterium, Methylophaga, Methylosinus, Methylothermus, Microbacterium, Microbulbifer, Micrococcus, Morganella, Muricauda, Mycobacterium, Myroides, Nannocystis, Natronocella, Nautella, ND137, Neisseria, Nesterenkonia, Nevskia, Nitratireductor, Nitrospina, Nitrospira, Nocardioidea, Nocardiosis, Nonlabens, Novispirillum, Novosphingobium, nsmpVI18, Oceanicaulis, Oceanimonas, Oceanospirillum, Ochrobactrum, Octadecabacter, Oleibacter, Oleispira, Oscillospira, Owenweeksia, Paenibacillus, Paludibacter, Pandoraea, Paracoccus, Parvibaculum, Paulinella, Pectinatus, Pediococcus, Pedobacter, Pedomicrobium, Pelobacter, Peptococcus, Peptoniphilus, Peptostreptococcus, Perlucidibaca, Phaeobacter, Phaeospirillum, Phenylobacterium, Phormidium, Photobacterium, Phycococcus, Planctomyces, Planomicrobium, Pleomorphomonas, Plesiocystis, Plesiomonas, Polaribacter, Pontibacillus, Pontibacter, Porphyromonas, Prevotella, Prochlorothrix, Propionibacterium, Propionigenium, Prosthecochloris, Proteiniclasticum, PSB-M-3, Pseudidiomarina, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Pseudonocardia, Pseudoramibacter_Eubacterium, Pseudoxanthomonas, Psychrilyobacter, Psychrobacter, Psychroflexus, Psychromonas, Ramlibacter, Reclinomonas, Reichenbachiella, Reinekea, Rheinheimera, Rhodobaca, Rhodobacter, Rhodobium, Rhodococcus, Rhodoplanes, Rhodovulum, Rickettsia, Robiginitalea, Roseburia, Roseibium, Roseivirga, Roseomonas, Rothia, Rubellimicrobium, Rubricoccus, Rubritalea, Rubrobacter, Ruegeria, Ruminobacter, Ruminococcus, Rummeliibacillus, Saccharopolyspora, Salinisphaera, Salinivibrio, Saprospira, SC3-56, Sedimentibacter, Sediminibacterium, Serratia, Shewanella, Solibacillus,

Sphingobacterium, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Spirochaeta*,
Spongiibacter, *Sporanaerobacter*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus*,
Stenotrophomonas, *Steroidobacter*, *Streptococcus*, *Streptomyces*,
Sulfuricurvum, *Sulfurimonas*, *Sulfurospirillum*, *Sutterella*, *Synechococcus*,
Syntrophobacter, *T78*, *Tenacibaculum*, *Tepidibacter*, *Tepidimicrobium*,
Thalassococcus, *Thalassomonas*, *Thalassospira*, *Thioalkalivibrio*, *Thiobacillus*,
Thiolamprovum, *Thioploca*, *Thiothrix*, *Tissierella_Soehngenia*, *Trabulsiella*,
Treponema, *Unassigned*, *Unclassified*, *Ureibacillus*, *Vagococcus*, *Veillonella*,
Verrucomicrobium, *Vibrio*, *Virgibacillus*, *Vogesella*, *Waddlia*, *Wautersiella*,
Weissella, *WH1-8*, *Winogradskyella*, *Wolbachia*, *ZD0117*, *Zhouia*, *Zoogloea*.

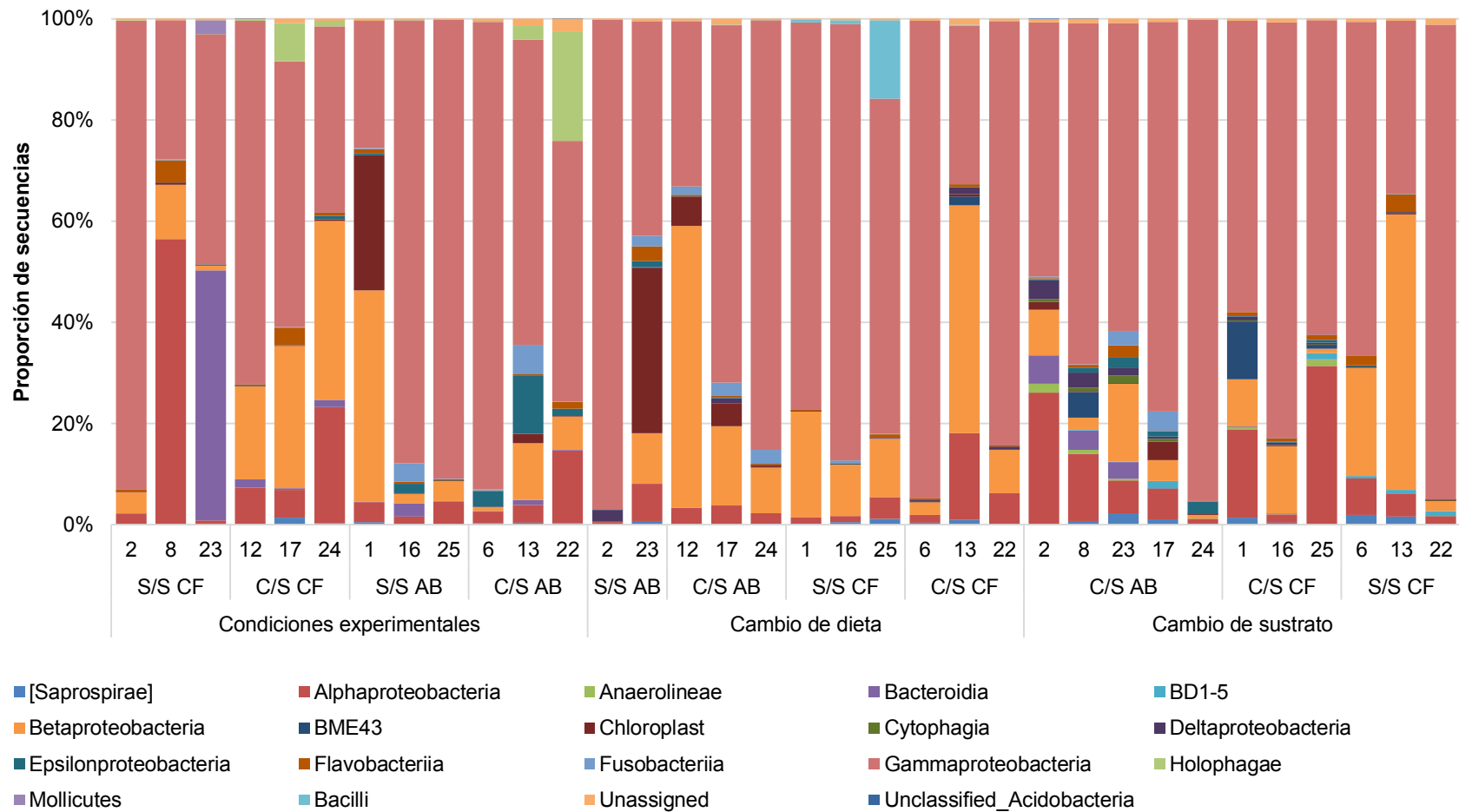
Especie

acetinitrilica, *acidaminiphila*, *acnes*, *alaskensis*, *algae*, *americana*, *aminovorans*,
angustum, *anticariensis*, *bacteriovorus*, *capsulatum*, *caseolyticus*, *cecorum*,
chondroitinus, *cloacae*, *coagulans*, *cohaerens*, *conglomeratum*, *copri*, *costicola*,
damselae, *diazotrophica*, *dispar*, *effusa*, *elkanii*, *exhalans*, *farmeri*, *flexus*, *fortis*,
fragi, *fulvum*, *ginsengihumi*, *gnavus*, *halodurans*, *halophobica*, *hirsuta*,
hispanicum, *hongkongensis*, *hydrocarbonoclasticus*, *iriomotensis*, *jenensis*,
johnsonii, *kestanbolensis*, *kujiense*, *luteoviolacea*, *luteus*, *lwoffii*, *melaninogenica*,
meridiei, *mexicana*, *mobilis*, *morganii*, *mucilaginosa*, *multivorum*, *nigricans*,
odoratimimus, *oleae*, *p-1630-c5*, *pacificensis*, *pedioforme*, *piscicida*,
psychrolactophilus, *rhizophila*, *rhizosphaerae*, *rhizovicinus*, *rosenbergii*, *ruber*,
rubra, *ruminis*, *ruthenica*, *salaria*, *saalexigens*, *sanguinis*, *schindleri*, *sciuri*,
sediminis, *selenatarsenatis*, *shilonii*, *suberifaciens*, *succinicans*, *succinus*,
thalassocola, *transvaalensis*, *tropicus*, *Unassigned*, *Unclassified*, *undicola*,
variabile, *venetianus*, *veronii*, *viridans*, *xiamenensis*, *yabuuchiae*, *zeae*.

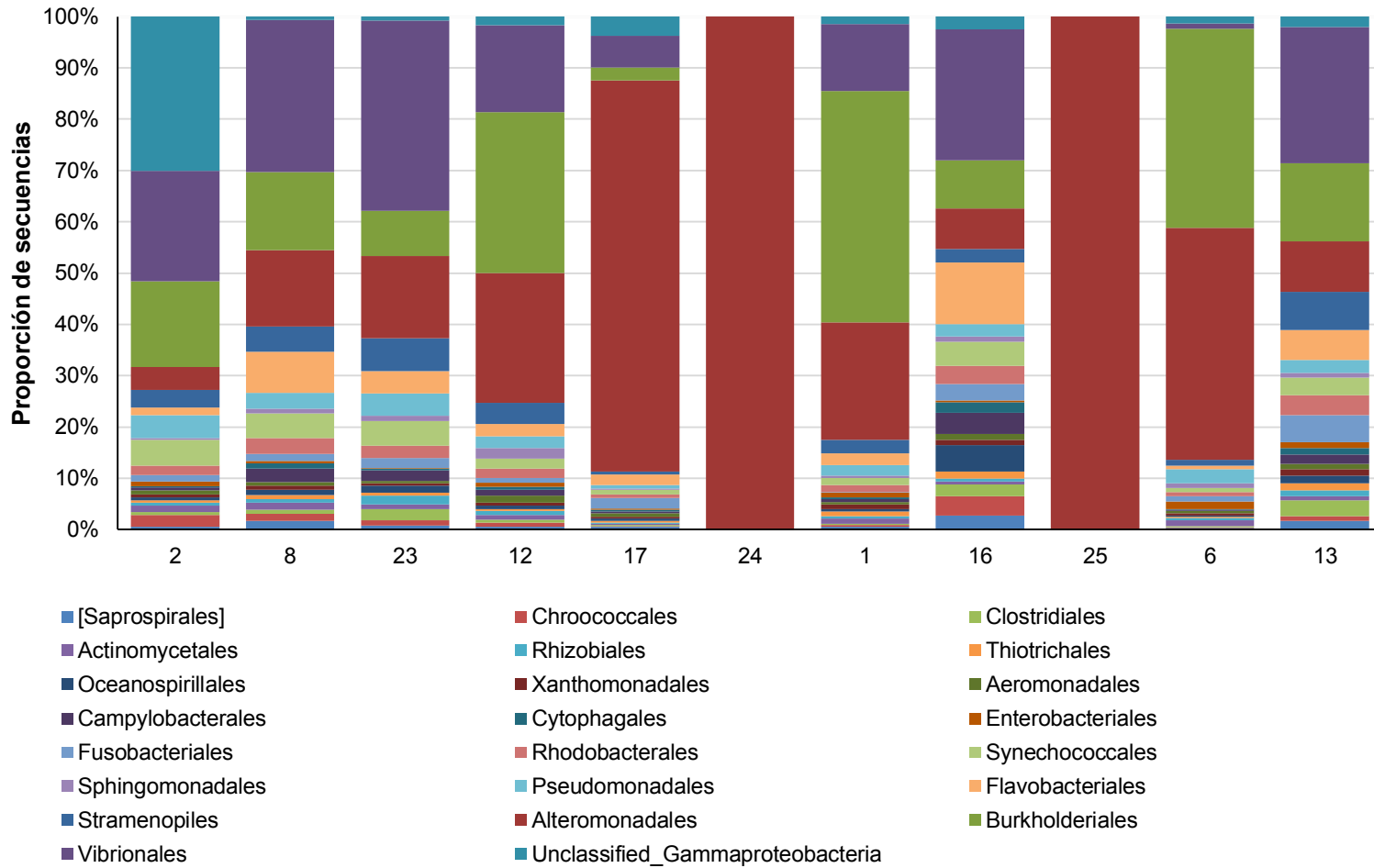
ANEXO IX. Estructura bacteriana de la microbiota del contenido intestinal de camarones silvestres y de bioensayo.



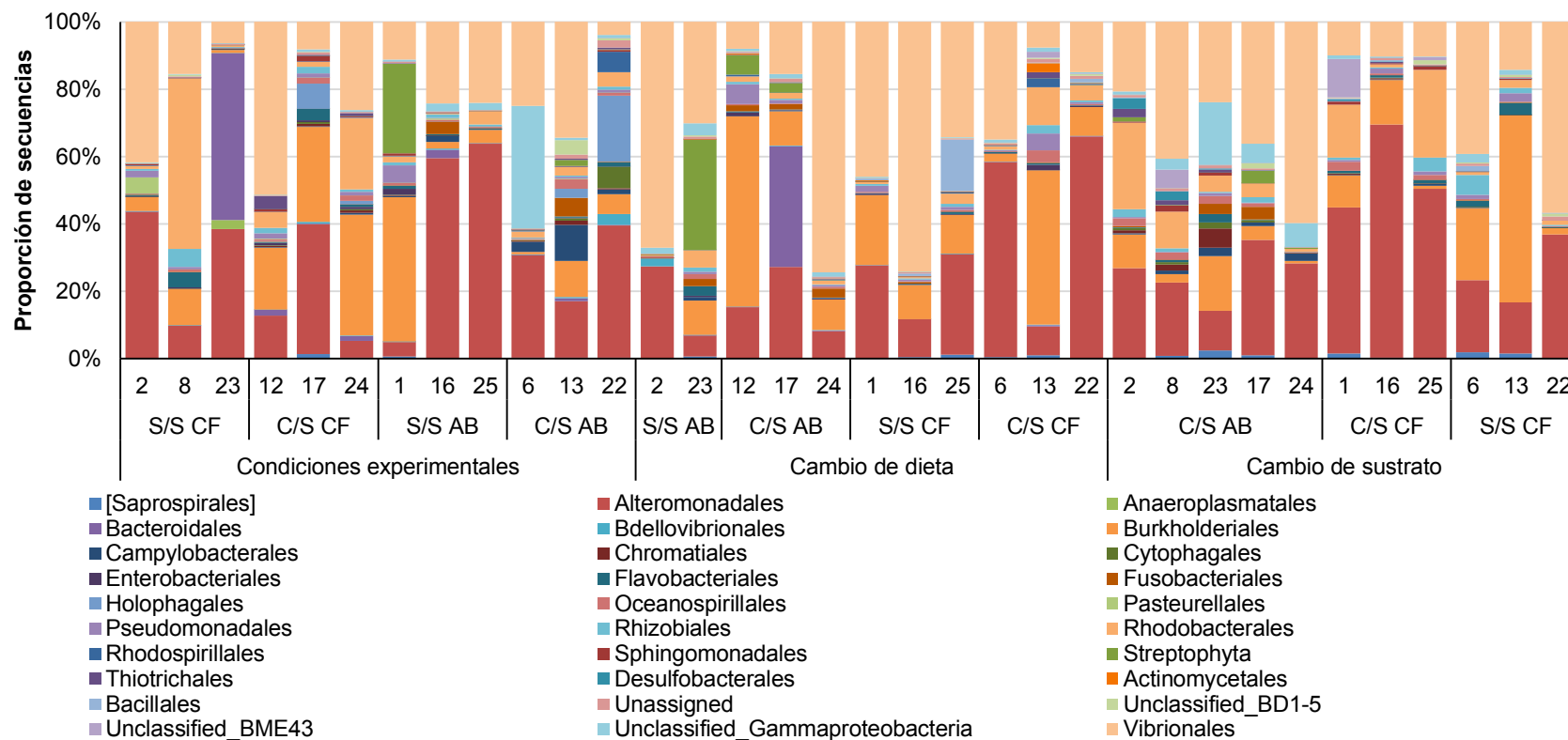
Estructura bacteriana del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* de origen silvestre a nivel clase.



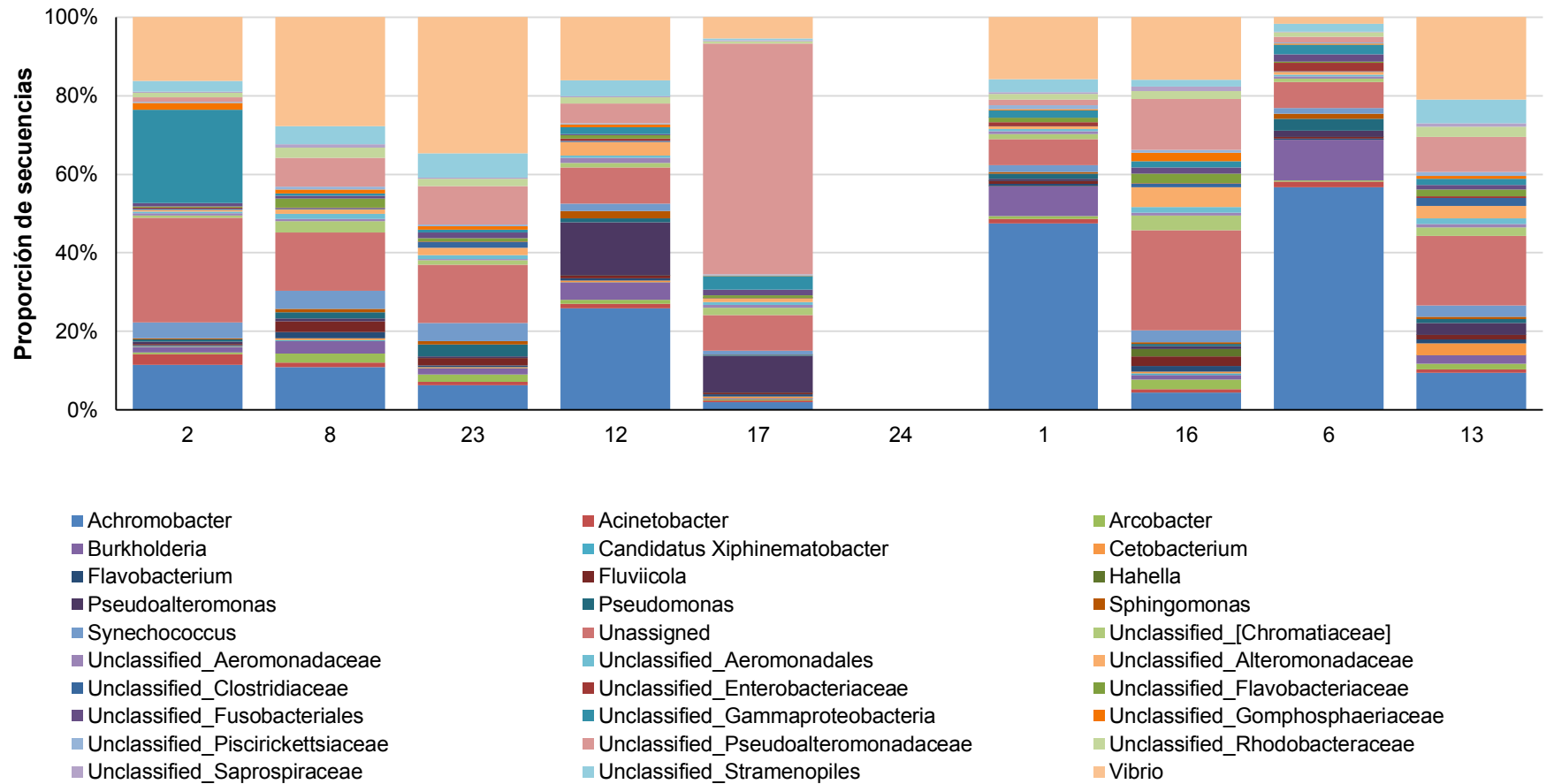
Estructura bacteriana del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* a nivel clase, de las muestras del bioensayo. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera, C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera, S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera, C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera.



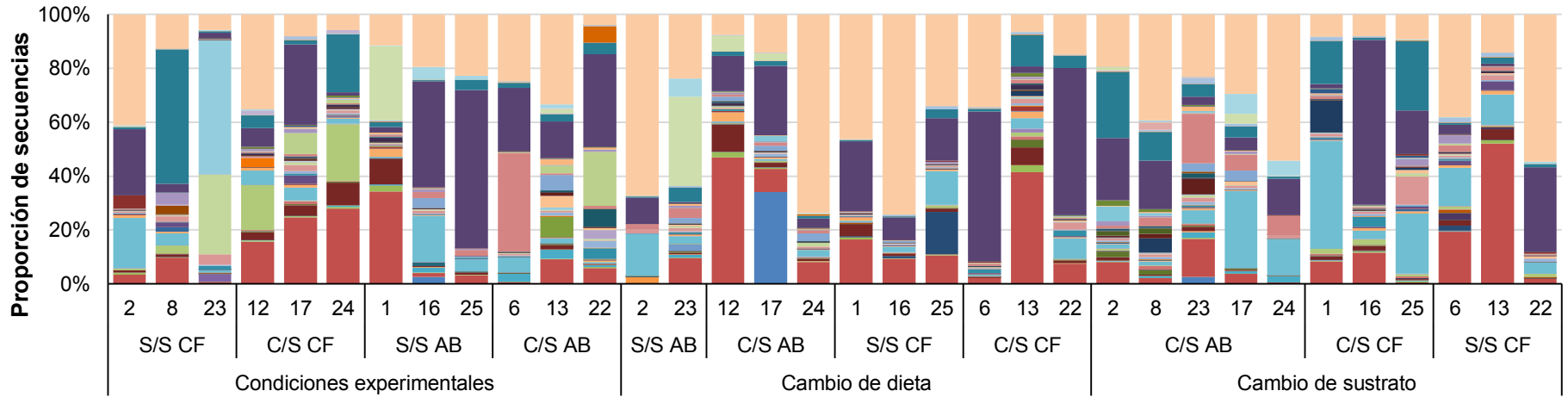
Estructura bacteriana del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* de origen silvestre a nivel orden.



Estructura bacteriana del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* a nivel orden, de las muestras del bioensayo. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera, C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera, S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera, C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera.



Estructura bacteriana del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* de origen silvestre a nivel género.



- | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| ■ 5-7N15 | ■ Achromobacter | ■ Acinetobacter | ■ Anaeroplasma |
| ■ Arcobacter | ■ Bacteriovorax | ■ Brochothrix | ■ Burkholderia |
| ■ Candidatus Portiera | ■ Cohaesibacter | ■ Ferrimonas | ■ Glaciecola |
| ■ Nonlabens | ■ Novosphingobium | ■ Photobacterium | ■ Propionibacterium |
| ■ Pseudoalteromonas | ■ Pseudomonas | ■ Ruegeria | ■ Sphingomonas |
| ■ Sulfurospirillum | ■ Tenacibaculum | ■ Thalassomonas | ■ Thiothrix |
| ■ Unassigned | ■ Unclassified_Alteromonadaceae | ■ Unclassified_Alteromonadales | ■ Unclassified_Bacteriovoracaceae |
| ■ Unclassified_Bacteroidales | ■ Unclassified_BD1-5 | ■ Unclassified_BME43 | ■ Unclassified_Chromatiales |
| ■ Unclassified_Desulfobulbaceae | ■ Unclassified_Enterobacteriaceae | ■ Unclassified_Flammeovirgaceae | ■ Unclassified_Flavobacteriales |
| ■ Unclassified_Fusobacteriales | ■ Unclassified_Gammaproteobacteria | ■ Unclassified_Holophagales | ■ Unclassified_Hyphomicrobiaceae |
| ■ Unclassified_Marinilabiaceae | ■ Unclassified_Oceanospirillaceae | ■ Unclassified_Oceanospirillales | ■ Unclassified_Pasteurellaceae |
| ■ Unclassified_Piscirickettsiaceae | ■ Unclassified_Pseudoalteromonadaceae | ■ Unclassified_Rhodobacteraceae | ■ Unclassified_Rhodospirillaceae |
| ■ Unclassified_Saprospiraceae | ■ Unclassified_SB-1 | ■ Unclassified_Streptophyta | ■ Unclassified_VC21_Bac22 |
| ■ Unclassified_Vibrionaceae | ■ Vibrio | | |

Estructura bacteriana del contenido intestinal de camarón *P. vannamei* a nivel género, de las muestras del bioensayo. S/S CF representa el tratamiento de alimento calamar fresco y sin sedimento en la pecera, C/S CF alimento calamar fresco y con sedimento en la pecera, S/S AB alimento balanceado y sin sedimento en la pecera, C/S AB alimento balanceado y con sedimento en la pecera.