



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

**EFFECTO DE LA OXITETRACICLINA EN EL RESISTOMA DEL
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Penaeus vannamei***

Por:

Ángel Daniel González Páez

TESIS APROBADA POR LA:

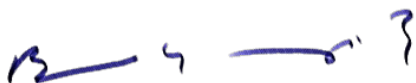
COORDINACIÓN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de IBT. Ángel Daniel González Páez, 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. Crisantema Hernández González
Integrante de comité de tesis



Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Integrante de comité de tesis



Dr. Miguel Betancourt Lozano
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efecto de la Oxiteraciclina en el Resistoma del Camarón Blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*” 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 Ángel Daniel González Páez, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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 director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a CONACYT por la beca de maestría otorgada para la realización de esta tesis.

En segundo lugar, Agradezco a CIAD por haberme aceptado como alumno y haberme formado como Maestro en Ciencias.

Al Dr. Bruno Gómez Gil por haber sido mi director de tesis y haberme transmitido parte de sus conocimientos, a los miembros de mi comité Dra. Crisantema Hernández, Dra. Sonia Soto y Dr. Miguel Betancourt por todo su apoyo y consejos durante mis estudios de posgrado, a las técnicas que laboran en CIAD Unidad Mazatlán, M.C. Carmen Bolán Mejía por su ayuda en todo lo referente al área de bacteriología, M.C. Julissa Enciso Ibarra por su apoyo en el área de genómica, M.C. Gabriela Aguilar Zarate por su ayuda en el análisis de sedimento, M.C. Erika Yazmin Sánchez y MCA. Lizeth Flores por su asistencia en la elaboración de la dieta y el alimento para camarón, M.C. Karla Aguilar y Biol. Alexis Ochoa Bojórquez por colaborar durante mi bioensayo, al Dr. Abraham Guerrero por su ayuda con el análisis en Rstudio, MC. Estela Rodríguez Ibarra por su ayuda y atención durante toda mi estancia en CIAD y por siempre estar al pendiente de los procesos de solicitudes que realicé, así mismo a la M.C. Eunice Murúa por su ayuda durante el muestreo de sedimento en el estero del Yugo, a la I.P. Francis Marrujo López por sus consejos y apoyo durante los análisis bacteriológicos, además agradezco profundamente a todo el personal de aseo y mantenimiento de CIAD Mazatlán por su ayuda cuando fue necesaria.

Agradezco al M.I Pedro Bastidas de CIAD Culiacán por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio de plaguicidas, de igual forma a la Ing. Claudia Olmeda Rubio y al Biol. Jorge Manuel Pineda Landeros por su apoyo con el procesamiento de mis muestras de sedimento marino y alimento, a mis amigas y compañeras la Biol. María José Soto y la IBT. Lisset Hernández, no solo por su apoyo sino por hacer mi paso por la maestría más ameno, gracias a mi madre Celia Páez Lamadrid por ser para mí un pilar en todo momento de estrés y alegría, a mi padre José Adán González por su ayuda, a mi tía Elvira Páez por ser apoyo en toda mi formación académica, a mi hermano Marcos González Páez por su ayuda en software, a mis amigas Valeria Patrón, Sarahi Valdez, Penélope Aguilera y Karime Osuna por haberme escuchado siempre y por ultimo y para cerrar doy gracias a Dios por haber puesto a CIAD en mi caminar.

DEDICATORIA

A mis padres, mi familia y Dios.

CONTENIDO

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCION.....	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Acuicultura de <i>Penaeus vannamei</i>	14
2.2. Uso de Antibióticos en Unidades de Producción de <i>Penaeus vannamei</i>	15
2.3. Tipos de Antibióticos	17
2.4. La Oxitetraciclina como Tratamiento a Enfermedades Bacterianas en Unidades de Producción Acuícolas de México.....	20
2.5. Microbiota Intestinal de <i>Penaeus vannamei</i> y Otras Especies Acuáticas	22
2.6. Resistencia Antibiótica de las Bacterias en los Organismos Acuáticos	25
2.7. Resistoma Bacteriano y Resistencia Ancestral a Antibióticos	28
2.8. Composición de Resistomas en Sitios Impactados por Actividad Antropogénica.....	31
2.9. Mecanismos de Resistencia Antibiótica.....	34
2.10. Genes de Resistencia a Tetraciclinas.....	36
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1. Objetivo General	41
4.2. Objetivos Específicos	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
5.1. Muestreo en el Estero Del Yugo (Mazatlán, Sinaloa).....	42
5.2. Caracterización de sedimento.....	43
5.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	44
5.4. Composición de la Dieta	45
5.5. Calculo para la Concentración de Antibiótico.....	46
5.6. Comprobación de Inhibición de la OTC en la Dieta.	46
5.7. Obtención de los Camarones Silvestres	47
5.8. Sistema Experimental.....	47
5.9. Determinación de la Concentración de OTC Biodisponible.	49
5.10. Extracción de ADN de Heces y Sedimento.....	50
5.11. Pureza de ADN.....	50

CONTENIDO (continuación)

5.12. Preparación de Librerías.....	50
5.13. Limpieza de Lecturas	51
5.14. Análisis Taxonómico.....	51
5.15. Análisis de Genes de Resistencia Antibiótica	53
5.16. Análisis Estadístico	53
6. RESULTADOS.....	54
6.1. Caracterización del Sedimento.....	54
6.2. Análisis para Comprobar la Inhibición por parte de la Dieta.....	54
6.3. Determinación de la Concentración de OTC Biodisponible.	55
6.4. Rarefacción.....	58
6.5. Organismos control	66
6.6. Organismos expuestos a OTC	69
6.7. Genes de Resistencia a Tetraciclinas y Otros Genes de Resistencia Antibiótica.....	80
6.7.1. Organismos Control.....	80
6.7.2. Organismos Expuestos a OTC.....	83
6.8. Genes de Multiresistencia.....	90
6.8.1. Organismos Control.....	90
6.8.2. Organismos Expuestos a OTC.....	91
7. DISCUSIONES.....	97
8. CONCLUSIONES.....	103
9. RECOMENDACIONES.....	105
10. REFERENCIAS	106
11. ANEXOS	113
11.1. Preparación del Alimento.	113
11.2. Extracción de ADN.	113
11.3. Preparación de librerías	114

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Puntos de muestreo de sedimento superficial en estero del yugo (Mazatlán, Sinaloa)...	42
2. Sistema experimental del bioensayo con camarones.....	48
3. Comparación de los halos de inhibición entre antibiótico utilizado como control y los pellets elaborados para la alimentación de los organismos del bioensayo.....	55
4. Comprobación de la linealidad de la modificación del método de Norambuena, <i>et al.</i> , 2013 y Gonzalez-Gaya <i>et al.</i> , 2018 para extracción de OTC ($R^2 = 0.9934$) utilizado con un patrón de tetraciclina para LC-MS/MS.....	56
5. Comprobación de la linealidad de la modificación del método de Norambuena, <i>et al.</i> , 2013 y Gonzales-Gaya <i>et al.</i> , 2018 para extracción de OTC ($R^2 = 0.9934$) utilizado con un patrón de oxitetraciclina para LC-MS/MS.	57
6. Curvas de rarefacción del número de OTUS posterior a la limpieza de las secuencias correspondiente a la microbiota intestinal.	62
7. Curvas de rarefacción del número de OTUS posterior a la limpieza de las secuencias correspondiente a la microbiota de sedimento.....	63
8. Distribución en el PCA de los cambios en la microbiota intestinal de camarón durante el tratamiento con OTC.	64
9. Distribución en el PCA de los cambios en la microbiota del sedimento de camarón durante el tratamiento con OTC.	65
10. Índices de Shannon de los organismos en muestras de heces y sedimento.	68
11. Estructura bacteriana del camarón 01 (control) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento.....	70
12. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 01 (control) en las muestras de heces y sedimento.	71
13. Estructura bacteriana del camarón 03 (expuesto a OTC) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento.....	74
14. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 03 (expuesto a OTC) en las muestras de heces y sedimento.....	75
15. Estructura bacteriana del camarón 10 (expuesto a OTC) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento.....	76
16. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 10 (expuesto a OTC) en las muestras de heces y sedimento.	77
17. Estructura bacteriana del camarón 13 (control) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
18. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 13 (control) en las muestras de heces y sedimento.	79
19. Línea del tiempo de abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas en muestras de heces de <i>Penaeus vannamei</i>	81
20. Línea del tiempo de abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas en muestras de sedimento de <i>Penaeus vannamei</i>	82
21. Imagen virtual extraída de Anvio7 donde se encuentran indicados los splits con los números KO (Kegg) correspondientes a los genes de resistencia a tetraciclina y oxitetraciclina en las diferentes muestras de heces y sedimento de uno de los organismos.	89
22. Genes de resistencia a tetraciclinas identificados en muestras de heces de <i>Penaeus vannamei</i> a lo largo del tratamiento.	93
23. Genes de resistencia a tetraciclinas identificados en muestras de sedimento de <i>Penaeus vannamei</i> a lo largo del tratamiento.	94
24. Bombas de eflujo identificadas en muestras de heces de <i>Penaeus vannamei</i> a lo largo del tratamiento.	95
25. Bombas de eflujo identificadas en muestras de sedimento de <i>Penaeus vannamei</i> a lo largo del tratamiento.	96

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Lista de genes de resistencia a tetraciclinas y oxitetraciclina (<i>tet</i> y <i>otr</i>) identificados de acuerdo con la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).	37
2. Coordinadas de puntos de muestreo exploratorio de sedimento superficial.	43
3. Formulación de la dieta para <i>Penaeus vannamei</i>	45
4. Desglose para la identificación de muestras de heces y sedimento de <i>Penaeus vannamei</i>	52
5. Resultados caracterización de sedimentos del punto seleccionado (%).....	54
6. Concentración de oxitetraciclina detectada en las muestras de sedimento de organismos <i>Penaeus vannamei</i> expuestos a OTC.	57
7. Número de secuencias, individuos, OTUS asignados y secuencias sin clasificar en muestras de heces de <i>Penaeus vannamei</i>	59
8. Número de secuencias, individuos, OTUS asignados y secuencias sin flcaisicar en muestras de sedimento de <i>Penaeus vannamei</i>	60
9. Valores de abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo control (01)	85
10. Valores de abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo control (13).	86
11. Valores de abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo con tratamiento (03).	87
12. Valores de abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo con tratamiento (10).	88
13. Especies identificadas con genes de resistencia a tetraciclinas.....	90
14. Especies identificadas con genes para bombas de eflujo multirresistentes.....	92

RESUMEN

La resistencia antibiótica es la habilidad que tienen ciertos microorganismos de sobrevivir en presencia de un antimicrobiano y resistir los efectos del mismo, proceso que puede ser adquirido por las bacterias o bien encontrarse de forma intrínseca en el genoma bacteriano, la actividad antropogénica y el mal uso de antibióticos como tratamiento ha acelerado la dispersión de genes de resistencia antibiótica (ARG) en ambientes acuáticos, el objetivo del presente estudio fue determinar los cambios estructurales en la microbiota intestinal de *Penaeus vannamei* así como de la microbiota presente en el sedimento circundante por efecto del uso de dos concentraciones de oxitetraciclina en la dieta y al retirar la presión de selección bajo condiciones de laboratorio, así como la identificación de genes de resistencia a tetraciclinas y genes de multiresistencia, para este propósito se utilizó secuenciación de metagenomas (shotgun) en la plataforma Illumina Miniseq. El presente estudio mostró que la microbiota intestinal de *Penaeus vannamei* fue dominada por las familias *Alteromonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Roseobacteraceae* y *Lewinellaceae* mientras que las familias que dominaron la microbiota del sedimento fueron *Myoviridae*, *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Alteromonadaceae*, también se encontró que durante la exposición al antibiótico las familias que se vieron favorecidas debido posiblemente a su capacidad de resistencia fueron *Caulobacteraceae*, *Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Vibrionaceae* en las muestras de contenido intestinal, mientras que en las muestras de sedimento fueron *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Myoviridae* y *Marinifilaceae*, también se identificaron genes de resistencia a tetraciclinas como los genes *tet35* y *tetR* así como genes multiresistentes principalmente en las especies *Agarivorans gilvus*, *Burkholderia cepacia* y *Vibrio parahaemolyticus* a pesar de los cambios estructurales no hubo diferencia significativa en la abundancia relativa entre tiempos ni matrices.

Palabras clave: Resistencia antibiótica, microbiota *Penaeus vannamei*, *Agarivorans gilvus*, resistencia a tetraciclinas, microbiota sedimento.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is the ability that some microorganisms have to survive in presence of an antimicrobial and resist the effects of it, process that can be acquired by bacteria or being intrinsically in the bacterial genome, anthropogenic activity and misuse of antibiotics has accelerated the spread of antibiotic resistance genes (ARG) in aquatic environments, the aim of this study was to determine the structural changes in intestinal microbiota from *Penaeus vannamei* as well as the microbiota present in the surrounding sediment due to use of two concentrations of oxytetracycline in the diet and by removing the selection pressure under laboratory conditions along with the identification of tetracycline resistance genes and genes associated to multiresistance, for this purpose we used metagenome sequencing (shotgun) in the Illumina Miniseq platform. This study showed that the intestinal microbiota from *Penaeus vannamei* was dominated by the phyla *Alteromonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Roseobacteraceae* y *Lewinellaceae* while the ones that dominated the sediment microbiota were *Myoviridae*, *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Alteromonadaceae*, also it was found that during antibiotic exposure some phyla were promoted possibly due to their resistance ability for example *Caulobacteraceae*, *Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Vibrionaceae* in the shrimp microbiota while in the sediment the ones favored were *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Myoviridae* y *Marinifilaceae*, tetracycline resistance genes were also identified, such as *tet35* and *tetR* genes, as well as multi-resistant genes, mainly in *Agarivorans gilvus*, *Burkholderia cepacia* and *Vibrio parahaemolyticus* despite the structural changes in the microbiota, there as not significant difference in relative abundance between times of treatment or matrices

Key words: antibiotic resistance, *Penaeus vannamei* microbiota, *Agarivorans gilvus*, tetracycline resistance, sediment microbiota.

1. INTRODUCCION

El uso de antibióticos ha cambiado la vida del ser humano ya que se han logrado prevenir y tratar enfermedades causadas por bacterias que en épocas pasadas representaban un peligro para la especie humana. Conforme el pasar del tiempo su uso ha aumentado y se ha diversificado, por lo que hoy en día los antibióticos también se utilizan para tratar enfermedades en animales dedicados al consumo humano y como tratamientos preventivos.

El empleo de antibióticos en la acuicultura se ha asociado con problemas ambientales y de salud humana, entre éstos, se incluyen la resistencia bacteriana (Santiago *et al.*, 2009), dicha resistencia a los antimicrobianos es el término más amplio para la resistencia de diferentes tipos de microorganismos; y abarca la resistencia a los medicamentos antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y fungicidas (Serra, 2017).

La alta disponibilidad al uso de medicamentos antimicrobianos en animales terrestres y acuáticos y en la producción de cultivos ha sido mencionada como un factor para mantener la economía y productividad de estos sectores contribuyendo a la seguridad alimentaria y el bienestar animal al tiempo que protege los medios para la continuidad de la vida y la sostenibilidad de la producción animal y agrícola (FAO, 2016).

Uno de los antibióticos más utilizados en las unidades de producción acuícola no solo en México sino a nivel mundial es la oxitetraciclina (OTC), sin embargo, el uso desmedido de antibióticos como la OTC ha provocado problemas de resistencia antibiótica debido a su alta solubilidad y persistencia en el ambiente acuático a pesar de ser sensible a ciertos factores ambientales como la luz y el pH (Santiago *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2022) por lo que la resistencia antibiótica es un problema creciente a nivel mundial. En América Latina las infecciones bacterianas importantes comienzan a incrementar su resistencia de manera alarmante. Esto significa que las bacterias vienen evolucionando, sobreviviendo y convirtiéndose en cepas más difíciles de tratar, lo que puede causar enfermedades graves asociadas o muerte. (García, 2012) Por ello es importante analizar desde varios puntos críticos las interacciones de los genes de resistencia, así como los efectos del uso de antibióticos en organismos modelo como *Penaeus vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Acuicultura de *Penaeus vannamei*

El crecimiento acuícola en México se debe en buena medida a la producción de camarón de cultivo, y por lo tanto es considerada una especie de gran relevancia para el desarrollo económico nacional, en el país existen alrededor de 1500 unidades de producción dedicadas a la comercialización y distribución de camarón, por lo tanto, es un organismo acuático de alto valor comercial. Como parte del recién aprobado Programa Nacional de Pesca y Acuicultura (PNPA) 2020-2024, la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) estableció como meta lograr el crecimiento en 15.52 por ciento en la producción pesquera y acuícola del país para el 2024 (CONAPESCA, 2021).

El camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei* posee un cuerpo alargado, dividido en cefalotórax (rostro, antena, anténulas y periópodos), abdomen (6 segmentos abdominales y pleópodos) y cola (telson y urópodos), de color blanco translúcido con tonos amarillos. Tienen antenas, periópodos (patas delanteras) y urópodos (cola) pigmentados de color rojizo. Cabeza moderadamente larga con 7 - 10 dientes dorsales y 2 - 4 dientes ventrales, su hábitat son sistemas marinos con temperatura media anual de 20 ° C, toleran un intervalo de salinidad entre 2 - 40 unidades prácticas de salinidad (ups), con un óptimo de 35 ups (Anaya, 2005; Campaña *et al.*, 2009).

La gran mayoría de las unidades acuícolas de México se encuentran localizadas en la costa del Pacífico, principalmente localizadas en tres estados los cuales son Sonora, Sinaloa y Nayarit; los sistemas de producción en México pueden ser comparados dentro de dos espectros básicos, como en otros países del mundo, los sistemas pueden ser agrupados en categorías que van de sistemas con operaciones extensivas a aquellos que son manejados de forma intensiva, sin embargo México también cuenta con la categoría de unidades manejadas por el sector cooperativo o ejidos y el sector privado (DeWal *et al.*, 2005).

Las unidades de producción intensivas generalmente tienen pequeños estanques (1 a 2 ha), usualmente utilizan sistemas de aireación y tienen altas densidad de población, estas unidades

requieren de una gran inversión de capital y pueden alcanzar tasas de producción de 5 a 15 TM/ha; sin embargo la mayoría de los sistemas utilizados en México corresponden a sistemas semi-intensivos donde los estanques tienen generalmente entre 4 y 10 ha de tamaño; la mayoría tiene bombas para regular los intercambios de agua y tienen densidades de población moderadamente altas con rendimientos aproximadamente de 1 a 3 TM/ha (DeWal *et al.*, 2005). mientras que las unidades de producción extensivas generalmente utilizan grandes estanques que a menudo son irregular y están contruidos de una manera relativamente artesanal, mientras que otros pueden ser estructuras meramente naturales o estar establecidos en flujos naturales de agua y por ende el coste de inversión es bajo pero los rendimientos también lo son promediando menos de 1 TM/ha (DeWal *et al.*, 2005).

Existen varios problemas alrededor de la producción de camarón como la destrucción sustancial de manglares en sistemas lagunares, sin embargo al sur del estado los principales efectos sobre los manglares se atribuyen al crecimiento de comunidades rurales y prácticas agrícolas; otro de los problemas atribuidos a la acuicultura de camarón es la contaminación del agua, ya que las tasas de recambio de agua van desde el 5 al 20% por día en la mayoría de unidades acuícolas, el intercambio de agua y el exceso de nutrientes añadidos debido a la sobrealimentación hacen que el agua que es descargada en canales de drenaje eventualmente dañe el ambiente en bahías y lagunas (DeWal *et al.*, 2005).

Las enfermedades han afectado la industria acuícola e México y las unidades de producción de camarón han buscado métodos para prevenir o tratar enfermedades desde que fueron establecidas, se han utilizado desde antibióticos a remedios más caseros como ajo, vitamina C o secar los estanques y aplicar fertilizante nitrogenado y cal, el antibiótico que más se utiliza es la oxitetraciclina por su amplia disponibilidad y precio sin embargo también se utilizan otros antibióticos como la enrofloxacin (DeWal *et al.*, 2005; Lyle *et al.*, 2006; Santiago *et al.*, 2009)

2.2. Uso de Antibióticos en Unidades de Producción de *Penaeus vannamei*

Un antibiótico es una sustancia química producida por microorganismos capaz de matar o inhibir el desarrollo de otros microorganismos, además estos también se pueden producir a escala

industrial y son de uso común en la acuicultura durante los ciclos de producción, tanto en la fase larvaria como en la de crecimiento (Santiago *et al.*, 2009).

El empleo de antimicrobianos en la acuicultura se ha asociado con problemas ambientales y de salud humana, entre éstos, se incluyen la resistencia bacteriana, la persistencia en el ambiente acuático y los efectos sobre la biogeoquímica del sedimento, ya que la presencia de antibióticos en el agua superficial, agua subterránea, agua de mar, sedimentos y lodos puede afectar el desarrollo de vegetales, plantas acuáticas y animales, presentando así retos para los estándares de seguridad alimentaria (Santiago *et al.*, 2009; Rothwal y Shashidhar, 2014).

En la acuicultura, las enfermedades bacterianas y virales han surgido como un problema serio y representan uno de los retos más importantes que enfrenta esta industria, si bien, los virus son de los principales patógenos que afectan este sector en todo el mundo como el virus del síndrome de Taura (TSV), virus de la cabeza amarilla (YHV) y el virus de la mancha blanca (WSSV), que pueden provocar mortalidades de hasta el 100% de los organismos cultivados (Nunan *et al.*, 2014). Una de las enfermedades que más afecta el cultivo de camarón además de ser de las más mortales es la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), esta fue reportada por primera vez en China en 2009 y en México fue reportada en el año 2013 (Nunan *et al.*, 2014), AHPND es una enfermedad altamente virulenta que afecta a varias especies de camarón y es caracterizada por una atrofia severa del hepatopáncreas con tasas de mortalidad cercanas al 100% en los primeros 35 días del estadio post-larva (Hong *et al.*, 2016).

Sin embargo, los microorganismos de tipo bacteriano también pueden ocasionar infecciones que son destructivas para las unidades de producción. Tal es el caso de las enfermedades ocasionadas por bacterias del género *Vibrio*, llamadas vibriosis, así como también la bacteria causante de la enfermedad denominada hepatopancreatitis necrotizante (NHP) que son las principales responsables de las infecciones que afectan a las especies de camarón que se cultivan (Santiago *et al.*, 2009).

La alta disponibilidad al uso de antimicrobianos en animales terrestres y acuáticos y en la producción de cultivos ha sido esencial para mantener la economía y productividad de estos sectores, a su vez contribuye a la seguridad alimentaria y el bienestar animal al tiempo que protege los medios para la continuidad de la vida y la sostenibilidad de la producción animal y agrícola.

A nivel internacional varios antibióticos son permitidos para promover el crecimiento de peces en cultivo, prevenir o tratar enfermedades y esterilizar sistemas acuícolas, estos incluyen la

tetraciclina, oxitetraciclina, florfenicol, sulfadimetoxina, ormetoprim y sulfamerazina, así como aminoglicosidos y amidas. (Zhang *et al.*, 2022).

En México, los antibióticos más utilizados para contrarrestar las enfermedades producidas por bacterias del género *Vibrio* son oxitetraciclina (OTC), florfenicol (FFC), ormetoprim - sulfametoxazol, sarafloxacin (SARA) y enrofloxacin (ENRO). Alrededor del mundo, se emplean además antibióticos como clortetraciclina, quinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido oxolínico, perfloxacina, sulfametazina, gentamicina y tiamulina (Santiago *et al.*, 2009).

La oxitetraciclina se utiliza para tratar enfermedades tales como vibriosis y furunculosis, como se mencionó anteriormente otro de los antibióticos ampliamente usados es la enrofloxacin la cual ha sido probado también en especies de cangrejos (*Scylla serrata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), camarón negro (*Penaeus monodon*), camarón chino (*Penaeus chinensis*) y lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), otro de los antibióticos utilizados es ciprofloxacina y se puede utilizar ante un amplio espectro de bacterias Gram (-) incluyendo los patógenos como *Pseudomonas* y *Serratia marcescens*, mientras que el florfenicol es un potente agente bacteriostático efectivo en el tratamiento a infecciones causadas por *Pasteurella piscicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Edwardsiella tarda* (Bermúdez-Almada y Espinosa Plascencia, 2012).

Sin embargo, existe una creciente preocupación mundial sobre la resistencia a los medicamentos antimicrobianos, a medida que aumenta la producción de camarón por acuicultura, una variedad de problemas ambientales están siendo incrementados exponencialmente incluyendo el deterioro de la calidad del agua, la contaminación del sedimento y la prevalencia de residuos antibióticos y bacterias multirresistentes (Feng *et al.*, 2022) los microorganismos resistentes amenazan con deshacer décadas de avance en atención de la salud humana e impactarán directamente la capacidad de las personas para vivir una vida plena y productiva (FAO, 2016).

2.3. Tipos de Antibióticos

Existen diferentes tipos de antibióticos con distintos mecanismos de acción, a continuación, se presenta una lista con su clasificación:

Betalactámicos: son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico, actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana y constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones, el espectro de los betalactámicos incluye bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmas porque estos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de betalactamasas, probablemente unida a una lenta penetración por las características de la pared. Se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (Seija y Vignoli, 2006).

Glucopéptidos: se trata de antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana. Actualmente hay dos drogas en uso clínico: vancomicina y teicoplanina. La vancomicina es un antibiótico bactericida de espectro reducido (solo actúa sobre bacterias grampositivas), que se obtiene de *Streptomyces* orientales. La teicoplanina tiene una estructura similar a la vancomicina y un perfil de actividad también similar. Los glicopéptidos son activos además sobre *Streptococcus*, corinebacterias, *Bacillus spp.*, algunos actinomicetales y *Clostridium spp.*, incluido *Clostridium difficile*. Mecanismo de acción: los glicopéptidos inhiben la síntesis y el ensamblado de la segunda etapa del peptidoglicano de la pared celular mediante la formación de un complejo con la porción D-alanina-D-alanina del pentapéptido precursor. Además, daña los protoplastos alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y altera la síntesis de ARN. Sus múltiples mecanismos de acción contribuyen a la baja frecuencia de desarrollo de resistencia. Se une rápida y firmemente a las bacterias y ejerce su efecto bactericida sin un período de inducción, pero solo sobre microorganismos en multiplicación activa (Seija y Vignoli, 2006).

Aminoglucósidos: se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria. La incorporación de los aminoglucósidos en el interior de la bacteria, especialmente en los cocos grampositivos, es mayor al administrarse con antibióticos que inhiben la síntesis de la

pared bacteriana, como son los betalactámicos y los glucopéptidos (Seija y Vignoli, 2006).

Macrólidos: se unen a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilos del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación (Seija y Vignoli, 2006).

Quinolonas: se trata de un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular (Seija y Vignoli, 2006).

Tetraciclinas: son moléculas naturales o semisintéticas con un núcleo hidronaftaceno, que contiene cuatro anillos fundidos al que se pueden unir distintos radicales que darán lugar a las diferentes tetraciclinas. Penetran en el citoplasma bacteriano por un proceso dependiente de energía y se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma (proteínas S7, S14, S19), bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-ARN-t, e impidiendo la continuación de la síntesis proteica. Estos compuestos pueden también unirse (aunque menos selectivamente) a los ribosomas 80S de las células humanas y efectuar la misma acción; sin embargo, carecen de los medios de transporte específicos de la membrana bacteriana. Los compuestos más usados son la doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina (Calvo, 2009).

Polimixinas: son antibióticos polipeptídicos, cíclicos y policationicos, con una cadena de ácido graso unido al péptido y se comportan como detergentes catiónicos. Tiene una parte hidrofílica (el péptido) con alta carga positiva que por atracción electrostática se une a la superficie de la membrana, cuya carga neta es negativa. Por otro lado, el extremo lipofílico (la cadena lateral de ácido graso) por interacciones hidrofóbicas se une a los fosfolípidos de la membrana. Como resultado se desorganiza la estructura de la membrana y aumenta su permeabilidad, con la pérdida de metabolitos esenciales. La mayor presencia de fosfolípidos en la membrana de las bacterias gramnegativas hace que éstas sean más sensibles que las grampositivas a la acción de estos agentes (Calvo, 2009).

Ionóforos: son antibióticos polipeptídicos cíclicos como la valinomicina o las tirocidinas A y B. Estos compuestos tienen una estructura circular peculiar, es hidrofóbica en el exterior e hidrofílica o polar en el interior. Los ionóforos incorporan cationes monovalentes en su interior, y les permite

cruzar la bicapa lipídica. La penetración elevada de potasio altera el potencial eléctrico y el gradiente químico existente en la membrana, alterando su función (Calvo, 2009).

Oxazolidinonas: inhiben la síntesis proteica e impiden la formación del complejo de iniciación 70S, formado por formilmetionil-ARNt, ARNm, diversas proteínas y las subunidades ribosómicas 30S y 50S. El linezolid se fija a la subunidad ribosómica 50S, en el centro peptidiltransferasa dentro del ARN ribosómico 23S (dominio V), distorsiona así el punto de unión del formilmetionil-ARNt y evita, por tanto, la formación del complejo de iniciación. Esta familia de antibióticos tiene un mecanismo de acción singular, y al actuar en una diana distinta no hay resistencia cruzada con otros antibióticos que también inhiben la síntesis proteica (Calvo, 2009).

Anfenicoles: El cloranfenicol y su derivado, el tiamfenicol, son antibióticos bacteriostáticos que bloquean la síntesis proteica bacteriana uniéndose reversiblemente a la proteína L16 localizada en la subunidad 50S. Esta proteína es la que media la fijación del ARNt a la enzima peptidiltransferasa, y, por tanto, su bloqueo por el cloranfenicol evita la formación de los enlaces peptídicos (Calvo, 2009).

Hay tres fuentes principales de las que se obtienen los antibióticos: microorganismos, síntesis y semisíntesis. Por ejemplo, bacitracina y polimixina se obtienen de algunas especies de *Bacillus*; estreptomycin, tetraciclinas, etc. De especies de *Streptomyces*; gentamicina de *Micromonospora purpurea*; griseofulvina y algunas penicilinas y cefalosporinas de ciertos géneros de la familia *Aspergillaceas* (*Penicillium*, *Acremonium*); y monobactamicos de *Pseudomonas acidophila* y *Gluconobacter* (Denyer *et al.*, 2012).

El cloranfenicol general se produce mediante un proceso sintético, mientras que en el proceso de semisíntesis una parte de la molécula se produce mediante un proceso de fermentación utilizando el microorganismo apropiado y el producto es entonces modificado posteriormente por un proceso químico (Denyer *et al.*, 2012).

2.4. La Oxitetraciclina como Tratamiento a Enfermedades Bacterianas en Unidades de Producción Acuícolas de México

La oxitetraciclina (OTC) forma parte de la familia de las tetraciclinas, estas presentan propiedades físico-químicas similares ya que son compuestos polares, solubles en: ácidos, bases, alcoholes,

disolventes orgánicos polares y agua e insolubles en hidrocarburos saturados, así mismo son antibióticos de amplio espectro frente a las bacterias Gram –, Gram +, Mycoplasmas, Rickettsias entre otros (Sosa *et al.*, 2013).

La OTC, ha sido utilizada ampliamente en la acuicultura debido a su bajo costo y su amplio espectro de actividad antibacterial; en el cultivo de camarón la OTC es utilizada en el tratamiento de infecciones como vibriosis, NHP y furunculosis en el caso de peces, la cual actúa principalmente como bacteriostático y ejerce su efecto antimicrobiano a través de la inhibición de la síntesis proteica (Zhang *et al.*, 2022).

Su acción se da a nivel del ribosoma bacteriano manteniendo una difusión pasiva por la membrana celular exterior de los poros hidrofílicos, una vez en el interior de la célula bacteriana, se liga a la subunidad 30S de los ribosomas, impidiendo el acceso del aminoacil ARNt al sitio receptor del complejo ribosoma; esto tiene como consecuencia la falta de adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Santiago *et al.*, 2009).

Durante el año 2001 hubo un aumento de casos de infección en gran parte de las unidades acuícolas del estado de Sinaloa, las enfermedades más frecuentes eran aquellas relacionadas a gregarinas, vibriosis y WSSV, durante el tiempo que ocurrían las enfermedades la primera acción fue incrementar la cantidad del intercambio de agua, mientras que otras medidas fueron limitarse solo al uso de probióticos y antibióticos, la mayoría de los acuicultores consideraron las estaciones de otoño e invierno como las principales en cuanto la cantidad de contagios (Lyle *et al.*, 2006).

Cuando las infecciones ocurrían, la mayoría de los productores utilizaban antibióticos mezclados con el alimento mientras que otros preferían no suministrar ningún tipo de tratamiento, los antibióticos más utilizados fueron oxitetraciclina, enrofloxacin y monensina sódica (Lyle *et al.*, 2006), de igual forma se han reportado concentraciones de 15.163 mg/L de OTC en estanques de larvas de camarón en unidades acuícolas de China (Chen *et al.*, 2015) por lo que es importante mencionar que el estrés selectivo por OTC promueve la proliferación y la propagación de genes de resistencia incluso en concentraciones bajas de OTC (Zhang *et al.*, 2022).

Existen tratamientos alternativos para el control de enfermedades como los postbióticos, un postbiótico es un metabolito obtenidos por procesos fermentativos o liberados después de la lisis bacteriana, por ejemplo los ácidos grasos de cadena corta son ácidos orgánicos que contienen aldehído y uno o más grupos carboxilo como el ácido propiónico y el ácido butírico los cuales son comúnmente utilizados como sales en la acuicultura y se ha analizado la suplementación con sales

de propionato y butirato en *Penaeus vannamei* y en Dorada (*Sparus aurata*) como tratamientos alternativos a antibióticos ya que muestran modulación en la microbiota intestinal protegiendo a los hospedadores de enfermedades infecciosas como enteritis o enfermedades causadas por *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela* (Yao *et al.*, 2020).

También se ha utilizado la vitamina c para mejorar la respuesta inmune (específica y no específica) y disminuir la resistencia infecciosa en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), rohu (*Labeo rohita*), dorada (*Sparus aurata*), mrigal (*Cirrhinus mrigala*) y pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Yao *et al.*, 2020).

2.5. Microbiota Intestinal de *Penaeus vannamei* y Otras Especies Acuáticas

La microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado, como el intestino humano o de organismos acuáticos como es *Penaeus vannamei*, mientras que el microbioma es el conjunto formado por los microorganismos, sus genes y metabolitos en un nicho ecológico dado. (Sebastián, 2018).

La colonización de la microbiota intestinal está influenciada por diversos factores como el tipo de hábitat, dieta y condiciones fisiológicas del organismo, en especies de invertebrados acuáticos algunos de los factores que han sido reportados que afectan la presencia de bacterias intestinales son: la estructura y revestimiento del intestino, el tipo de dieta, condiciones físicas y químicas tales como temperatura, pH y salinidad, también se incluye la fisiología del huésped y la estacionalidad, por ejemplo se ha identificado que factores como la temperatura, el fósforo total y la cantidad de oxígeno disuelto pueden afectar la microbiota intestinal en especies de camarón como *Macrobrachium nipponense* favoreciendo a géneros como *Atopostipes* y *Clostridium* dependiendo de las condiciones ambientales (Enciso, 2016; Zhao *et al.*, 2018).

La comunidad de la microbiota intestinal de animales acuáticos y terrestres puede estar compuesta por arqueas, bacterias, hongos, protozoarios, virus y bacteriófagos. Las comunidades han co-evolucionado junto a sus hospedadores afectando su digestión, absorción de nutrientes, mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, el desarrollo de la inmunidad y la inmunomodulación, el metabolismo de xenobioticos y la resistencia a enfermedades (García, 2019).

También se ha identificado entre los principales factores que afectan la estructura taxonómica de la comunidad microbiana en el tracto intestinal de peces, se encuentran la dieta, el nivel trófico, el hábitat y probablemente la filogenia, la salinidad es un factor que tiene una influencia en la microbiota de peces, diferencias significativas han sido encontradas en la microbiota intestinal de peces de agua dulce y marina, al igual que la alimentación la cual es reconocida como el principal factor que influye en la diversidad y en la estructura de la comunidad microbiana en el tracto digestivo de los peces (Gómez *et al.*, 2017).

Hanifah y colaboradores (2018) analizaron el microbioma del camarón blanco del Pacífico, tomaron en consideración los intestinos de los organismos, así como el agua de cultivo en unidades acuícolas de Vietnam y Malasia, la mayoría de las lecturas que se recuperaron de los intestinos de camarón y estanques fueron asignados a miembros de la phyla *Proteobacteria*, *Actinobacterias*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria*. Diferencias significativas en la abundancia relativa del phyla se observaron entre las muestras aisladas de agua de tanques y aquellas tomadas de los intestinos de los organismos, *Actinobacterias* y *Bacteroidetes* fueron más abundantes en los estanques, mientras que los intestinos de camarón tuvieron una mayor abundancia relativa de *Proteobacterias*.

Se encontró que un total de seis familias de microorganismos (*Alcaligenaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Acidimicrobiaceae* y *Rhodobacteraceae*) fueron compartidas entre los camarones y el agua de cultivo, también se encontró que la diversidad microbiológica varía dependiendo la zona geográfica ya que se encontraron diferencias entre las muestras obtenidas en Malasia a las muestras de origen vietnamita, también se encontró que *Microbacteriaceae* y *Flavobacteriaceae* son más abundantes en el agua de cultivo, mientras que *Vibrionaceae* se encuentra en altas cantidades en los intestinos de camarón.

Holt y colaboradores (2020), encontraron que los taxones más abundantes en juveniles de *Penaeus vannamei* cultivados son *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Actinobacterias*, mientras que en organismos adultos predominan *Proteobacterias* y *Cianobacterias*, en su investigación compararon el índice de infección y los cambios existentes en la microbiota intestinal de organismos expuestos a WSSV y AHPND y demostró estar significativamente alterada en asociación con la infección por WSSV.

Sharma y colaboradores (2021) analizaron las diferencias en la microbiota intestinal de *Penaeus vannamei* obtenidos de diversas localizaciones geográficas del mundo (Estados Unidos, Ecuador e India) y encontraron que los camarones criados en unidades acuícolas de Ecuador comparados con

aquellos silvestres de los Estados Unidos albergaban una mayor abundancia de *Proteobacteria* y *Planctomyces* además de presentar una menor abundancia de *Tenericutes* y *Bacteroidetes*, siendo la localización geográfica uno de los factores que puede influir en la colonización de las bacterias en el tracto intestinal de los organismos acuáticos como lo es el camarón.

Enciso (2016) estudió las diferencias en la comunidad bacteriana de *Penaeus vannamei* en presencia y ausencia de sedimento, encontró que los organismos al ser alimentados con calamar y en presencia de sedimento las familias *Chromatiaceae*, *Vibrionaceae* y *Pseudoalteromonadaceae* presentaron diferencia significativa en su abundancia relativa, también reportó índices de shannon para la microbiota intestinal inicial con un valor de 6.13 ± 0.267 , valor ligeramente menor al 7.28 que reportó Cornejo *et al.*, (2017) en intestinos de organismos saludables.

Por su parte Yukgehnaish y colaboradores (2020) mencionan los efectos de la microbiota intestinal y su influencia fisiológica en peces y la emergencia de bacterias resistentes a antimicrobianos (AMR) que provocan enfermedades difíciles de curar e indican el posible uso de la microbiota intestinal como un efecto positivo para los organismos y por lo tanto demuestran un uso de los microorganismos como probióticos ya que, el uso generalizado de antibióticos ha provocado graves problemas biológicos y ecológicos sobre todo en la aparición de ARG's en la microbiota intestinal de organismos acuáticos.

Gómez y colaboradores, (2017) mencionan que es importante conocer si los organismos acuáticos tienen una microbiota en común, lo que se denomina “core gut microbiota” o microbiota núcleo en el intestino. En peces, tanto marinos como dulceacuícolas, se ha determinado que *Proteobacteria* es el phylum dominante seguido de *Firmicutes*, *Fusobacteria* y *Bacteroidetes*, y éstos comprenden hasta el 90 % de los grupos bacterianos presentes en el tracto digestivo. También mencionan que en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) se ha encontrado que la microbiota residente es más diversa que la transitoria y se atribuye a la menor presencia de bacterias asociadas al mucus.

Zhao y colaboradores (2018) efectuaron un análisis entre la microbiota del sedimento de estanques en unidades acuícolas productoras de *Macrobrachium nipponense* en China y su microbiota intestinal, en general, la comunidad bacteriana de las muestras de sedimento mostró un mayor nivel de diversidad y estabilidad que las muestras de contenido intestinal y de agua de estanque e identificaron que el phylum de mayor abundancia fue *Proteobacteria* en ambas matrices (intestinos y sedimentos), seguido de *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* y *Actinobacteria*; al comparar los resultados con los obtenidos en muestras de agua concluyeron que a pesar de la variación en la

abundancia relativa de la comunidad bacteriana, la microbiota intestinal fue más cercana a la comunidad del sedimento que del agua.

Los organismos infectados con WSSV tuvieron un aumento de *Proteobacterias* y *Fusobacterias* en el intestino, incluyendo aquellas bacterias que son potencialmente patógenas pertenecientes al género *Arcobacter*, dentro de este género se pueden encontrar patógenos como *Arcobacter skirrowi* y *Arcobacter butzleri* patógenas para el ser humano (Calvo, 2013); con la reducción de bacterias del género *Bacteroidetes* y *Tenericutes*.

2.6. Resistencia Antibiótica de las Bacterias en los Organismos Acuáticos

La resistencia es la habilidad de las bacterias para replicarse y no solamente sobrevivir en presencia de un fármaco y es definida como la habilidad de un microorganismo de resistir los efectos de los antibióticos, puede ser una característica inherente de la bacteria o una habilidad que se adquiere mediante procesos infecciosos (Giono *et al.*, 2020; Balaban *et al.*, 2019).

Las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos ya sea por mutaciones genéticas o adquiriendo genes de resistencia a los antibióticos (ARG, por sus siglas en inglés), las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos (BRA, por sus siglas en inglés) tienen tasas más altas de mortalidad y morbilidad y resultan en estadías hospitalarias más prolongadas en seres humanos (Amarasiri *et al.*, 2020)

La forma más común de medir el nivel de resistencia es la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), la cual es la concentración mínima que se necesita de un antibiótico para prevenir la replicación de las bacterias, una mayor MIC corresponde un mayor nivel de resistencia (Balaban *et al.*, 2019). La resistencia a los antimicrobianos es el término más amplio para la resistencia de diferentes tipos de microorganismos y abarca la resistencia a los medicamentos antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y fungicidas (Serra, 2017).

Los fenómenos de tolerancia y persistencia a antimicrobianos son similares, ya que ambos provocan el incremento de la sobrevivencia en presencia de un antibiótico sin aumentar la MIC. En los estudios que se centran solamente en el entendimiento cualitativo de los mecanismos moleculares, los dos términos son en ocasiones intercambiables, sin embargo, la persistencia es el

atributo que afecta solamente una subpoblación de células mientras que la tolerancia se refiere a la habilidad de la bacteria de mantener su actividad a partir de la regulación de su metabolismo en condiciones adversas (Zhang *et al.*, 2022) y esta habilidad en la población les ayuda a sobrevivir periodos largos de tratamiento, por ejemplo, con una tasa de muerte menor sin cambio alguno en la MIC (Balaban *et al.*, 2019).

Sharma y colaboradores (2021) en su análisis de *Penaeus vannamei* obtuvieron muestras de camarón cultivado en los Estados Unidos y las compararon con muestras de camarones importados de distintos puntos a nivel internacional y encontraron que los organismos producidos en los Estados Unidos eran distintos a aquellos importados ya que albergaban una comunidad distinta en la microbiota intestinal y una mayor prevalencia de genes de resistencia a los antibióticos en sus intestinos.

También mencionan que los datos mostraron que los organismos mostraban una mayor resistencia a tetraciclina y cloranfenicol, además mencionan que la oxitetraciclina es ampliamente utilizada en las unidades de producción alrededor del mundo y en el estudio asocian la resistencia a tetraciclinas a especies como *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus faecalis*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* y *Vibrio parahaemolyticus* en organismos importados de India, Vietnam e Indonesia.

Almeida y colaboradores (2021) expusieron organismos de *Danio rerio* a una concentración de 10,000 µg/L de OTC durante 60 días y posterior a ello, retiraron la presión selectiva durante 30 días más, durante la exposición a OTC, se afectó significativamente la abundancia relativa de 11 géneros en la microbiota intestinal en los primeros días de tratamiento (cinco días), géneros como *Gemmobacter*, *Pseudomonas* y *Mesorhizobium* aumentaron su abundancia relativa, mientras que cinco géneros disminuyeron *Cetobacterium*, *Crenobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus* y *Shewanella*.

Después de transcurridos los dos meses de exposición a OTC, cinco géneros fueron significativamente afectados: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Shewanella* y dos géneros sin identificar relacionados a *Enterobacterias* y *Proteobacterias*, el microbioma del agua fue más afectado por OTC en comparación con el microbioma intestinal ya que existió una diferencia significativa en géneros como *Acidovorax*, *Emticicia*, *Haliscomenobacter*, *Roseicitreum*, *Labilithrix* y *Reichenowia*. En el momento dos meses de exposición aumentaron significativamente géneros como *Shingomonas*, *Pelomonas*, *Acidovorax*, *Emticicia* y *Runella*, mientras que otros géneros disminuyeron tales como *Haliscomenobacter* y *Labilithrix*.

Durante el bioensayo de Almeida y colaboradores (2021) retiraron la presión de selección por OTC

después de un tratamiento de 60 días, este cese al tratamiento afectó significativamente la abundancia relativa de géneros como *Pelomonas* y *Chromatiaceae*, *Labilithrix*, *Reichenowia*, *Gemmobacter* y dos géneros afiliados a *Rhodobacteraceae* y *Proteobacteria* disminuyeron su abundancia.

Almeida y colaboradores discuten sobre la capacidad de los organismos de recuperarse fisiológicamente además de la capacidad de recuperación en su microbioma después de la exposición a químicos como en este caso antibióticos tales como la oxitetraciclina, esto es importante ya que se logra estimar la capacidad de recuperación de poblaciones ante escenarios de contaminación intermitentes.

También mencionan que el incremento en la abundancia de *Cetobacterium* está comúnmente reportada después de la exposición a concentraciones bajas de antibiótico en peces, al igual que uno de los grupos que aumentó en el intestino durante el experimento fue el género *Bacteroides*, los cuales son importantes para modular la expresión de genes relacionados con absorción de nutrientes, la mucosa y el metabolismo xenobiótico.

De igual forma se discute que el incremento de bacterias que participan en el ciclo del nitrógeno se puede relacionar al amonio producido por los peces el cual puede tener influencia sobre la selección de ciertos tipos de bacterias y que las bombas de eflujo son sistemas no específicos de resistencia antibiótica y dicha estrategia podría explicar la disminución en la abundancia relativa de genes *tet* ya que estos dan resistencia específica.

Avunje y colaboradores (2021) administraron distintas dosis de oxitetraciclina a *Penaeus vannamei* durante 14 días, y mencionan que a partir de la segunda semana la diversidad se vio reducida, también observaron una drástica reducción de la diversidad intestinal durante el tratamiento de OTC y se reportó una alteración transitoria la cual se recuperó 14 días después del tratamiento, esto puede deberse a que se reportó una media de vida muy corta por parte del antibiótico al interior del organismo debido a una rápida recuperación a pesar de contar con una sobredosis de OTC.

La resistencia a los antimicrobianos plantea un desafío para lograr la cobertura sanitaria universal y obstaculiza el logro de los objetivos de desarrollo sostenibles relacionados con la salud, la seguridad alimentaria, el agua potable y el saneamiento. Asegurar la salud y el bienestar de los animales criados para consumo es una obligación ética y a la vez crítica porque los antibióticos son parte importante de los programas de salud animal en muchos países del mundo sobre todo para países en vías de desarrollo, pero estos programas se han puesto bajo escrutinio debido al aumento

de la resistencia antibiótica (Singer, 2019).

El potencial de transmisión de ARGs del ambiente a bacterias en humanos se conoce como accesibilidad humana (human accessibility), estos se pueden transferir del ambiente a los humanos vía bacterias hospedadoras y tienen un impacto negativo en la salud, los únicos ARGs que pueden infectar humanos son aquellos cuyo hospedador posee un riesgo a la salud humana, frecuentemente los genes de resistencia se mueven por transferencia horizontal de no patógenos a patógenos, y esta actividad ha contribuido a la evolución de la resistencia a antibióticos en patógenos (Zhang *et al.*, 2022).

2.7. Resistoma Bacteriano y Resistencia Ancestral a Antibióticos

En el ambiente existen especies diferentes conviviendo en constante competencia, en este escenario es evidente la razón por la cual la capacidad de producir genes antimicrobianos confiere una gran ventaja, y es por ello que se ha seleccionado positivamente, siendo común encontrar una alta concentración de antimicrobianos en el ambiente, sin embargo la evolución funciona para ambas partes, el microorganismo que inhibe y el que es inhibido, de esta forma gracias a un proceso de coevolución de especies con actividad antimicrobiana y cepas resistentes surge el resistoma bacteriano.

El resistoma se define como la colección de todos los genes que pueden contribuir a la resistencia fenotípica antibiótica (Gobernado, 2015) y la comparación entre los resistomas encontrados en muestras ambientales de zonas aisladas o con poco o bien nulo contacto con el ser humano y muestras de zonas altamente impactadas permitirían dilucidar la influencia de la actividad humana en la presencia de bacterias multiresistentes (Costa, 2019).

Sin embargo, existe conocimiento emergente del papel fundamental que desempeña el microbioma ambiental y su relación con la regulación de la salud y las enfermedades del hospedador, es necesaria una comprensión más profunda de como la competencia entre especies modula la resistencia a antibióticos, esto no solamente con el objetivo de comprenderla sino para identificar y generar nuevas estrategias de tratamiento (Letten *et al.*, 2021).

La resistencia a los antimicrobianos es un proceso natural que se ha observado desde que se

descubrieron los primeros antibióticos (O'Neill, 2016) y puede ser posible que la abundancia de ARGs sea un indicador de los niveles de polución de antibióticos, sin embargo, algunos tipos de antibióticos son componentes naturales en el ambiente para los cuales las bacterias han adoptado ciertos genes de resistencia como mecanismo de protección (Lu *et al.*, 2021).

Una especie que es un buen competidor de nicho puede ser un mal competidor en otro, ya que la resistencia tiene un costo biológico dependiendo de la identidad de los miembros de la comunidad y la propensión a las interacciones competitivas entre ellos, una gran pérdida en la capacidad competitiva puede ser insignificante en una comunidad pobre y libre de competidores, mientras que, por el contrario, una pequeña pérdida en la capacidad competitiva puede tener implicaciones importantes para la supervivencia en un sistema más saludable y diverso (Letten *et al.*, 2021)

Es importante tomar en cuenta que la resistencia antibiótica no solamente está presente en bacterias patógenas, sino que afecta también el resistoma de aquellas bacterias que no lo son, se ha calculado que los primeros genes de resistencia para antibióticos como daptomicina vancomicina, eritromicina y estreptomicina aparecieron hace cientos de millones de años, incluso la resistencia a β -lactámicos surgió de la transferencia del gen de la isopenicilina-N-sintetasa de bacterias a hongos cuando se diferenciaron las bacterias gram positivas de las gram negativas hace aproximadamente mil millones de años (Surette y Wright, 2017).

En el extremo, si dos especies se superponen por completo en el uso de recursos (y comparten los mismos depredadores) en el espacio y el tiempo, entonces necesitarían tener una capacidad competitiva idéntica para coexistir, e incluso entonces solo de manera neutral, sin embargo, cuanto más se diferencian las especies en el uso de recursos, mayor es el rango de diferencias en la capacidad competitiva y más incompatibles con la coexistencia, hasta que se llega al otro extremo donde dos especies que tienen cero superposición de nicho (es decir, no usan ninguno de los mismos recursos en el espacio tiempo) pueden coexistir a pesar de diferencias infinitamente grandes en la capacidad competitiva (Letten *et al.*, 2021).

Una población puede encontrarse con un cambio ambiental que elimine o reduzca una presión selectiva que antes era importante para el mantenimiento de un rasgo. Por lo tanto, la adaptación al nuevo entorno puede afectar la aptitud de un organismo en su entorno anterior, esto puede estar correlacionado a la descomposición funcional de los rasgos no utilizados con el tiempo, o, por el contrario, a su mantenimiento a pesar de una presión de selección relajada, es decir presente pero no tan alta como al inicio. Sin embargo, los procesos evolutivos que impulsan estas respuestas a

menudo son difíciles de desentrañar porque se debe confiar en estudios retrospectivos e inferencias históricas (Card *et al.*, 2019).

Entonces, ¿cómo podría la separación de la aptitud relativa en la capacidad competitiva y los componentes de superposición de nicho contribuir a la comprensión de la evolución de la resistencia a los antibióticos?, la idea crítica es que los costos de la resistencia pueden surgir únicamente de una pérdida en la capacidad competitiva o junto a un cambio en la superposición de nichos (Letten *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, los costos de la resistencia se han interpretado principalmente a través del lente de una capacidad competitiva (por ejemplo, una reducción en la tasa de crecimiento o el rendimiento de un recurso determinado). Esto podría ser razonable, bajo ciertas suposiciones, si se centra solamente en la aptitud relativa de una especie que mutó para generar resistencia y tiene un ancestro susceptible a los antibióticos, pero en presencia de una comunidad de múltiples especies no se pueden ignorar las limitaciones en la superposición de nichos (Letten *et al.*, 2021).

Las compensaciones a menudo son causadas por la pleiotropía antagónica, fenómeno el cual ocurre cuando una mutación que es beneficiosa en un entorno es perjudicial en el otro. Este proceso puede tener importantes consecuencias para la salud pública cuando las mutaciones de resistencia a los antibióticos o los genes de resistencia adquiridos imponen costos en el crecimiento bacteriano y la competitiva en relación con sus contrapartes sensibles en ausencia de medicamentos (Card *et al.*, 2019).

Incluso cuando las bacterias no tienen un historial de exposición de antibióticos, pueden tener un bajo nivel de resistencia a algunos fármacos debido a características estructurales o funcionales intrínsecas, incluida la envoltura celular y las bombas de eflujo. Como consecuencia, la resistencia intrínseca puede disminuir en ausencia de exposición al fármaco si los genes relevantes acumulan mutaciones ya sea por selección o derivada de entornos permisivos (Card *et al.*, 2019)

Particularmente, los genes de resistencia antibióticos en el ambiente de la acuicultura pueden ser adquiridos por las bacterias patógenas de humanos, ya que los ambientes acuáticos son reconocidos como uno de los reservorios y rutas de transición para la diseminación de la resistencia a los antibióticos (Amarasiri *et al.*, 2020) también lugares como los ecosistemas acuáticos urbanos son zonas para la propagación de ARGs, ya que los sedimentos no solamente actúan como vertederos, sino también se convierten en fuentes secundarias de contaminación de ARGs (Wang *et al.*, 2021).

Se espera que esta situación se intensifique en el futuro, estimulada por un rápido crecimiento de

la industria acuícola, de este modo significan una amenaza severa para la salud pública a pesar de los esfuerzos significativos que se han aplicado en la regulación estricta de los antibióticos (Lu *et al.*, 2021), uno de los factores que ha sido reconocido por promover la resistencia antibiótica en ambientes acuáticos es la acumulación de metales como mercurio, zinc, cobre y cadmio (Amarasiri *et al.*, 2020).

Evidencia adicional sugiere que un millón de bacterias pueden estar presentes en 1ml de agua de mar y en un cultivo de organismos acuáticos el nitrógeno, fósforo y materia orgánica son abundantes, haciendo de la acuicultura un medio ideal para la proliferación de microorganismos y por esta razón se asume que la diversidad de microorganismos dentro de las unidades acuícolas podría ser aún mayor (Martínez y Vargas, 2015).

2.8. Composición de Resistomas en Sitios Impactados por Actividad Antropogénica

Se ha estudiado la composición de resistomas en zonas impactadas por actividad antropogénica, como es la crianza de ganado dedicado al consumo humano o bien a la producción de leche, Rovira y colaboradores (2019) compararon los resistomas de corrales de vacas en unidades de producción intensiva en América del Norte y vacas dedicadas a la producción de leche, además de hacer una comparación entre animales considerados “raised without antibiotics” (criados sin antibióticos u orgánicos), los cuales son animales sin exposición a antibióticos durante su crianza, y aquellos criados de manera convencional y expuestos a antibióticos.

Encontraron que solo dieciséis grupos de tipos de resistencia fueron compartidos entre muestras de heces, agua tratada y suelo, dichos grupos fueron correspondientes a multidrogas (*MexK*, *HNS*, *Msr*, *Sme*, *EmrE*), tetraciclinas (*TetA*, *TetL*, *TetX*, *TetZ*), MLS (*MphE*, *MyrA*, *Erm*) aminoglucosidos (*Aph6*, *Aph3-dprime*), fenicol (*Cat*) y b-lactámicos (*AmpR*). De igual manera detectaron que las secuencias más prevalentes en muestras de agua fueron las que codifican a tetraciclinas, MLS (macrolidos, lincosamidas, streptograminas) y sulfonamida.

En comparación, los genes que codifican a resistencia a tetraciclina y MLS fueron más abundantes en granjas intensivas (con antibióticos) que en heces de granjas lecheras, mientras que los genes para b-lactamasas fueron más abundantes en heces de vacas de unidades lecheras (Rovira *et al.*,

2019), durante el mismo experimento se encontró que *Proteobacterias* y *Actinobacterias* aumentaron su abundancia relativa en muestras de suelo en comparación a las heces y agua, también se identificó una mayor abundancia de *Proteobacterias* en agua que en heces así mismo que las muestras provenientes de la crianza intensiva vs aquellas provenientes de unidades lecheras mostraron una mayor riqueza en clases, mecanismos y grupos de resistencia antibiótica.

Rovira *et al.*, (2019) mencionan que el ambiente, dieta, origen del ganado, las prácticas de manejo y localización de las granjas se han citado como factores que tienen relación entre el uso de antibióticos y la prevalencia de resistencia antimicrobiana, también mencionan que altas concentraciones de metales pesados como zinc y cobre, usualmente incluidos en la dieta de animales criados sin antibióticos comparados con aquellos criados de manera convencional son para remplazar antibióticos y puede resultar en la aparición de poblaciones bacterianas co-resistentes a metales y antibióticos. También se menciona que las tetraciclinas han sido usadas en agricultura por décadas en América del Norte, esto sugiere la conexión entre el uso de tetraciclina y el enriquecimiento de bacterias resistentes a ellas, y el detener su uso en animales criados sin antibióticos no causa la reducción automática de su resistencia.

Perry y colaboradores (2016) mencionaron que los orígenes de la resistencia clínica pueden ser encontrados en el ambiente, la mayoría de antibióticos que se utilizan en el área médica y agrícola son derivados o producidos por un grupo de bacterias en el suelo llamados *Actinomicetos* o *Actinobacterias*, y por lo tanto estos microorganismos deben ser resistentes a sus propios metabolitos o de lo contrario mueren.

Lu y colaboradores (2021) estudiaron la relación entre los genes de resistencia, elementos genéticos móviles, factores de virulencia e incidencia de bacterias patógenas en distintos gradientes de contaminación por antibióticos en una unidad acuícola productora de camarón, en total, se detectaron 55 ARGs, clasificados en 17 subtipos, los ARGs, *cat3*, *sil2* y *bacA* se encontraron en todas las muestras con abundancias que variaban desde los 0.3 rpkm a los 52.3 rpkm (Reads Per Kilobase million), el subtipo más abundante fueron aquellos que conferían resistencia a bacitracina, seguido de aquellos resistentes a sulfonamida, fluoroquinolona, polimixina y cloranfenicol.

Encontraron que el mayor mecanismo de resistencia fueron las bombas de eflujo en sitios con bajos niveles de contaminación, en contraste con las bacterias presentes en lugares con una alta toxicidad por antibióticos, donde variaron entre mecanismos como modificación de la ruta, modificación de la diana o la inactivación del antibiótico, las bombas de eflujo aumentaron su

abundancia conforme la contaminación disminuía al contrario de la modificación de la diana mecanismo el cual muestra un comportamiento opuesto.

De igual manera detectaron que la contaminación por antibióticos aumentó sustancialmente la diversidad de elementos genéticos móviles comparados con el sitio control y se detectaron 46 especies de 21 géneros bacterianos, entre los cuales *Burkholderia* y *Mycobacterium* fueron las más abundantes, el patógeno oportunista *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*) y el taxa *Staphylococcus* se enriquecieron en los sitios contaminados.

En un estudio de lagos perturbados por contaminación con antibióticos y metales, Wang *et al.*, (2021) encontraron genes de resistencia que pertenecían principalmente a aminoglucosidos, β -lactámicos, multidrogas y macrolido-lincosamida-streptogramina (MLSB), por parte del alineamiento taxonómico, indicaron que en las muestras de sedimento superficial los phyla más abundantes fueron *Bacteroidetes*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Synergistetes* y *Actinobacteria* con un porcentaje del 14.6%, 13.1%, 10.2%, 8.7%, 7.9%, 7.2%, 4.7%, 4.7%, 3.5% y 3.3% del total de los genes 16srRNA secuenciados, respectivamente.

Desulfomicrobium (*Deltaproteobacteria*), DMER64 (*Bacteroidetes*), *Paludibacter* (*Bacteroidetes*), *Clostridium_sensu_stricto_1* (*Firmicutes*), *Methanosaeta* (*Euryarchaeota*), *Methanospirillum* (*Euryarchaeota*) y *Thermovirga* (*Synergistetes*) estuvieron cercanamente asociados a resistencia por aminoglucosidos (por ejemplo, genes *aadA*, *aadA2* y *aac* (6')-Ib), multidrogas (por ejemplo, *qacEdelta1* y *ereA*) y MLSB (*ermF*).

Durante un muestreo en unidades productoras de peces en la provincia de Hainan, China, He y colaboradores (2022) encontraron que los genes de resistencia a sulfonamida eran los genes de resistencia que dominaban agua y sedimento (*sul1* y *sul2*), las concentraciones de los genes de resistencia variaron a lo largo de los puntos de muestreo. Los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* fueron los más abundantes en los sistemas acuícolas de peces, el phylum *Chloroflexi* fue muy abundante en las muestras de sedimento; también mencionan que los antibióticos de tipo tetraciclinas son extremadamente propensos a la hidrólisis en el agua y son sensibles al pH, la temperatura y la luz.

Los ríos, lagos y demás ecosistemas acuáticos son reservorios de genes de resistencia antibiótica, estos ambientes tienen densidades bacterianas generalmente más bajas que los suelos, sin embargo, en los sedimentos de los cuerpos acuáticos suelen acumularse gran diversidad de microorganismos

(Surette y Wright, 2017). Las actividades antropogénicas como la actividad farmacéutica y otras industrias contaminantes aumentan drásticamente la carga de resistencia antibiótica en el ambiente, se ha demostrado la existencia de ambientes altamente contaminados debido a la actividad industrial, además de la contaminación en sedimentos los cuales son reservorio de bacterias multiresistentes en comparación con lugares menos impactados.

Además se ha estudiado el viroma en ambientes acuáticos, Lekunberri y colaboradores (2017) analizaron información extraída de bases de datos públicas y analizaron los viromas de muestreos realizados en diferentes matrices (agua, suelos, muestra clínicas, etc.) y encontraron que los viromas de agua dulce estaban dominados por genes que codifican para transportadores de división celular de nodulación de resistencia (RND) y fosfotransferasas.

También se encontró que todos los viromas acuáticos estaban dominados por genes que codifican resistencia a múltiples fármacos (al menos a tres clases de antibióticos) y que los viromas de aguas residuales también estaban dominados por genes que codificaban para resistencia a macrolidos y tetraciclinas, mientras que los viromas de agua dulce fueron dominados por genes que codificaban para resistencia a aminoglucósidos (Lekunberri *et al.*, 2017)

Los fagos que se encuentran en entornos acuáticos como agua dulce y aguas residuales albergan una diversidad de genes de resistencia antibiótica relativamente alta, existiendo así evidencias convincentes de que los genomas de fagos de diferentes entornos pueden portar ARGs. En consecuencia, su papel en la adquisición y propagación de ARG en la naturaleza no debe subestimarse dado que tienen una amplia distribución, debido a la abundancia de bacterias y fagos en entornos naturales se puede facilitar la interacción bacteria – fago y con ello llevarse a cabo una transferencia de genes dado la frecuencia de fenómenos de transferencia como es la transducción (Lekunberri *et al.*, 2017).

2.9. Mecanismos de Resistencia Antibiótica

La transferencia de material genético entre bacterias se puede dar de diversas formas, cuando los genes de resistencia se encuentran en elementos móviles como plásmidos, transposones o integrones y cassettes génicos, la transferencia de esos elementos desde una bacteria a otra dará

lugar a una amplia distribución de los genes incluso entre especies o géneros distintos, dando origen a la transferencia horizontal (Oyarce, 2012) como los plásmidos, transposones y bacteriófagos (González y Cardona, 2018), existe una creciente preocupación sobre la relación entre los genes de resistencia a antibióticos y las bacterias que son conocidas como patógenas, por ejemplo, se ha reportado que en cepas de *Vibrio harveyi* (patógena para la acuicultura) preserva ARGs que provienen de unidades acuícolas productoras de camarón y exhiben resistencia múltiple. (Li *et al.*, 2021).

La conjugación consiste en el intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptora) mediante contacto físico entre ambas. En bacterias Gram negativas la unión entre donante y receptor se efectúa mediante los pili conjugativos que posee el donante. La conjugación requiere de elementos genéticos replicativos llamados plásmidos conjugativos, los cuales incluyen transposones conjugativos, estos elementos genéticos codifican proteínas que facilitan su propia transferencia y la del ADN celular desde la célula donadora que lleva el plásmido, a una célula receptora que carece del plásmido o de elementos conjugativos integrados. Mientras en bacterias Gram positivas los plásmidos y los transposones no usan pili. La transferencia de ADN entre bacterias, resulta ser un punto crítico para la diseminación de la resistencia y los plásmidos han demostrado ser el vehículo ideal para la difusión de los genes involucrados (Oyarce, 2012).

La transferencia de genes de resistencia a bacterias ambientales necesita ser analizada desde varios puntos críticos, incluyendo la conexión ambiental, la causa de origen, y el costo biológico de expresar y mantener los genes de resistencia en ausencia de presión de selección, por lo tanto la presencia de genes de resistencia o bacterias resistentes en un ambiente acuático en particular quizás pueda no proveer la evidencia conclusiva de la transferencia de resistencia antibiótica a cepas silvestres (Amarisiri *et al.*, 2020).

Para antibióticos de tipo betalactámicos existe el mecanismo de resistencia betalactamasas, las cuales son enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico, los genes implicados en dicha resistencia son genes que codifican betalactamasas: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCARB*, *blaOXA*, *blaCTX-M* y *blaGES*, el mecanismo de resistencia para antibióticos de tipo quinolonas son mutaciones puntuales como el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico, sistemas de expulsión y presencia de genes plasmidicos con resistencia a antibióticos, los mecanismos de resistencia a quinolonas son contenidos en genes de mutaciones a nivel de *gyrA* (gen que codifica una subunidad de la ADN

girasa) y *parC* (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV) de acuerdo a Mosquito *et al.*, (2011)

Para tetraciclinas el mecanismo molecular de resistencia es la presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas y son codificadas por genes *tet* como *tetA* y *tetB*, otros genes de resistencia antibiótica como *cat* provoca resistencia a cloranfenicol, este gen codifica a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa, también existen genes de resistencia como *sul1* y *sul2* que generan resistencia a antibióticos como Trimetoprim – Sulfametoxazol (Mosquito *et al* 2011).

2.10. Genes de Resistencia a Tetraciclinas

Es importante tomar en cuenta que el resistoma propio de las tetraciclinas no solamente se encuentra presente en bacterias patógenas, sino que también puede encontrarse en microorganismos ambientales que normalmente no están asociados a enfermedades normalmente y esto incluye por ejemplo a aquellos que producen antibióticos y deben desarrollar al mismo tiempo resistencia a su producción para así evitar auto-toxicidad (Thaker *et al.*, 2010).

La resistencia se ha incrementado rápidamente en muchas especies bacterianas como resultado del intercambio horizontal de genes de resistencia en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, como para la mayoría de antibióticos, la resistencia a tetraciclinas puede ocurrir a través de un vasto número de mecanismos, estos incluyen bombas de eflujo activas, la producción de proteínas protectoras en el ribosoma, la disminución de la permeabilidad del medicamento, la mutación de la diana y la degradación enzimática de antibióticos (Thaker *et al.*, 2010).

Se han descrito a lo menos 43 genes relacionados con los mecanismos de resistencia a tetraciclinas: tres genes (denominados *otr*) asociados con la resistencia para oxitetraciclinas y 40 (39 denominados *tet* y uno *tcr*) con mecanismos de resistencia para tetraciclinas (Oyarce, 2012) (ver Cuadro 1), es importante mencionar que los genes de resistencia a tetraciclina han sido relacionados a la resistencia a oxitetraciclina, Dang y colaboradores (2007) identifican a los genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(D)* y *tet(M)* como potenciales para multiresistencia a oxitetraciclina y otros antibióticos.

Entre los genes *tet* se han descrito 12 clases que codifican proteínas de protección ribosomal, el que es detectado con mayor frecuencia es *tet (M)*, este gen está ampliamente distribuido entre las

bacterias Gram (+), destacando su presencia por sobre otros. Por su parte, en bacterias Gram (-) se han descrito genes como *tet(A)*, *tet(E)*, *tet(G)* y *tet(H)* con mayor frecuencia. Sin embargo, *tet(A)*, junto con los genes *tet(B)*, *tet(M)* y *tet(O)* (Cuadro 1.), son los que se han caracterizado de mejor forma y se han encontrado con mayor distribución tomando un papel de relevancia en otorgar resistencia a las tetraciclinas entre ellas oxitetraciclina (Thaker *et al.*, 2010; Oyarce, 2012).

Cuadro 1. Lista de genes de resistencia a tetraciclinas y oxitetraciclina (*tet* y *otr*) identificados de acuerdo con la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG)

ID (KO)	Nombre del gen	Mecanismo
K08168	<i>tetB</i>	Bomba de eflujo
K08151	<i>tet(A/B/C/D/E/G/H/J/Y/Z/30/31/33/39/41/42)</i>	Bomba de eflujo
K18214	<i>tetA(P)/tet(40)</i>	Bomba de eflujo
K18215	<i>tet(V)</i>	Bomba de eflujo
K18218	<i>tet(35)</i>	Bomba de eflujo
K18216	<i>tetA(46)</i>	Bomba de eflujo
K18217	<i>tetB(46)</i>	Bomba de eflujo
K19542	<i>otr(B)/tcr</i>	Bomba de eflujo
K18233	<i>otr(C)</i>	Bomba de eflujo
K18220	<i>tet(M/O/Q/S/T/W/32/36/44)/tetB(P)/otr(A)/tet</i>	Protección ribosomal
K18221	<i>tet(X)</i>	Gen de inactivación
K18476	<i>tetR</i>	Represor de tetraciclina
K19047	<i>tetC</i>	Represor de tetraciclina

Las bombas de eflujo son proteínas de membrana encargadas del transporte de distintos compuestos desde el interior de las bacterias al exterior, contribuyendo de esta forma a la resistencia bacteriana. En los procariotas, estas proteínas están presentes tanto en Gram positivas como en Gram negativas y están relacionadas con multirresistencia a antibióticos y a otros procesos celulares como el transporte de lípidos, resistencia frente al estrés, regulación de la homeostasis o virulencia (Sainz, 2014) entre otros. Dang y colaboradores (2007) mencionan a los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(D)* como potenciales para la resistencia a oxitetraciclina, dichos genes codifican para bombas de eflujo específicas para tetraciclina pero que funcionan en el papel de resistencia a OTC. Se ha utilizado la metagenómica para observar la prevalencia de genes de resistencia en el intestino y en el agua de cultivo de camarón en unidades acuícolas de China; por ejemplo Zhao y

colaboradores (2018) utilizaron metagenómica para investigar la abundancia y diversidad de distintos tipos de antibióticos y ARG's así como su relación con las comunidades bacterianas en el intestino y en el ambiente dinámico del camarón y se encontró que las tetraciclinas con mayores concentraciones en el agua de cultivo fueron tetraciclina y oxitetraciclina las cuales tuvieron concentraciones que alcanzaron los 6.42 y 4.08 mg/L respectivamente, también mencionan que la aplicación de antibióticos en el cultivo de animales ha promovido la transferencia de ARG's entre las bacterias, incrementando así el riesgo de que se generen bacterias resistentes a antibióticos y en particular aquellas que resultan patógenas no solamente para organismos acuáticos sino para el ser humano.

Zhang (2019) y colaboradores reportaron tolerancia a OTC en bacterias encargadas del proceso anamox, dicho proceso lleva a cabo la conversión de amonio y nitrito a nitrógeno en forma gaseosa, esto en condiciones anaerobias, esta tolerancia se vio enriquecida por el aumento de genes de resistencia (*tetC*, *tetG*, *tetX* e *intl1*).

Zhang y colaboradores (2022) utilizaron biorreactores con sedimento expuesto a distintas concentraciones de OTC, encontraron que los phylum más dominantes durante un largo periodo de estrés por OTC fueron *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes*, el phylum que más tolerancia demostró a OTC fue *Proteobacteria*, mientras que los phylum *Chloroflexi* y *Bacteroidetes* se adaptaron rápidamente a los cambios de concentración del antibiótico. Detectaron uno de los genes integrasa (*intl1*), como un elemento genético móvil el cual podría inducir la transferencia horizontal de genes de resistencia, identificaron tres mecanismos por los cuales los microorganismos en el experimento pudieron incrementar su resistencia: 1) la descarga del antibiótico al exterior de la célula a través de bombas de eflujo para reducir el contenido de antibiótico al interior, 2) el antibiótico fue inactivado por degradación o el remplazo de grupos activos y 3) el antibiótico no pudo unirse a la diana, aumentaron genes de resistencia para bombas de eflujo (*tetA*, *tetC*, *tetE* y *tetG*), gen para la modificación enzimática (*tetX*) y gen para la protección ribosomal (*tetM*).

Sin embargo los antibióticos también están siendo estudiados como factores para la remoción de otros contaminantes, ya que al expresarse genes de resistencia antibiótica en pequeñas cantidades se podría favorecer la expresión de otros genes que permitan eliminar otro tipo de estresores ambientales, Feng y colaboradores (2022) utilizaron algas que fueron expuestas a OTC con el objetivo de utilizar la oxitetraciclina en concentraciones traza (500 ug/L) como un factor para la remoción del nitrato y analizar los cambios en el resistoma de sedimento, encontraron 33 subtipos

de genes de resistencia a tetraciclinas (TRGs), la coexistencia de las algas con la oxitetraciclina promovió más los genes de resistencia a tetraciclinas comparado con el tratamiento solamente del resto de antibióticos, los TRGs con mayor abundancia fueron *tetPB*, *tetW*, *otrA*, *tetT*, *tetM*, *tet37*, *tcmA*, *tetS*, *tet34* y *tetO* en las muestras de sedimento y el de mayor abundancia fue el gen *tetPB*.

Suzuki *et al.*, (2014) seleccionaron 11 antibióticos que cubrían un amplio espectro de acción (cefoperazona, cefixima, amikacina, neomicina, doxiciclina, cloranfenicol, azitromicina, trimetoprim, enoxacina, ciprofloxacina, colistina) incluyendo antibióticos que inhiben la pared celular, síntesis proteica, biosíntesis del ácido fólico y la replicación de ADN, los resultados demostraron que adquirir resistencia a un medicamento cambió la resistencia y susceptibilidad a otro tipo de medicamentos lo cual sugiere que los cambios en el fenotipo que surgieron en las cepas resistentes no siempre están restringidos a factores específicos, como la modificación de la estructura de la proteína diana.

Suzuki y colaboradores (2014) también mencionan que el incremento en la expresión de *acrB* es conocido por contribuir a la resistencia de varios medicamentos, *ompF* codifica a un precursor de porinas lo cual permite la difusión pasiva de pequeñas moléculas, es conocido que una disminución de *ompF* es provocado por la disminución del medicamento consumido, lo cual deriva en resistencia antibiótica, decenas de mutaciones fueron encontradas en genes relacionados a bombas de eflujo (*acrAB*), porinas (*ompF*), cadena de respiración (*cyo*, *nuo* y genes *hem*), mientras que cambios comunes en la expresión de genes relacionados a estas funciones sugieren su contribución a la resistencia. Se demostró que la resistencia a un medicamento puede cambiar drásticamente la resistencia y susceptibilidad a otros, por ejemplo, la expresión de *oppA* es regulada por quinolonas y betalactámicos, *oppA* codifica a un péptido que es esencial para el transporte de oligopeptidos, algunos estudios previos discutieron que el eliminar *oppA* contribuye a la resistencia a aminoglicosidos.

Se ha identificado la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas no solamente en organismos acuáticos, sino también en insectos, Surette y Wright (2017) describen que la microbiota normal de abejas de miel americanas presentan genes de resistencia a tetraciclinas *tetB*, *tetC* y *tetW* mientras que abejas americanas expuestas a oxitetraciclina para tratamiento de plagas en colmenas presentan los primeros tres además de los genes *tetD*, *tetH*, *tetY*, *tetM*, *tetL*. Lo que indica que su microbiota al ser expuesta a presión selectiva ha logrado expresar genes de resistencia a ese antibiótico en particular.

3. HIPÓTESIS

El uso de oxitetraciclina en el alimento para camarones altera la microbiota intestinal y del sedimento circundante, favoreciendo algunos phyla como *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* e incrementa la abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas (*tet*) que codifican para bombas de eflujo específicas, protección ribosomal o inactivación del antibiótico y otros genes de resistencia antibiótica, esto debido a la lixiviación de heces y alimento no consumido.

Una vez que la exposición a oxitetraciclina se elimina, la composición y las poblaciones bacterianas en la microbiota deben recuperarse y la abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas y otros genes de resistencia antibiótica deberán ir disminuyendo al eliminar dicha presión de selección.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estimar el efecto de la oxitetraciclina en el resistoma de *Penaeus vannamei* bajo condiciones de laboratorio.

4.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar la abundancia relativa de genes del resistoma en heces y sedimento de camarones *Penaeus vannamei* bajo condiciones de laboratorio tratados con oxitetraciclina.
- Cuantificar la abundancia relativa de genes de resistencia en heces de camarones y en el sedimento, al eliminar oxitetraciclina de la dieta.
- Comparar y analizar los cambios de diversidad de la microbiota intestinal y de sedimento durante la exposición a oxitetraciclina y al eliminarla de la dieta.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestreo en el Estero Del Yugo (Mazatlán, Sinaloa)

Se hizo un muestreo exploratorio de sedimento superficial para escoger el punto adecuado a utilizar en las unidades experimentales y así proporcionarle al organismo las condiciones lo más cercanas posibles a su entorno natural, se muestrearon cinco puntos aleatorios del estero del Yugo ubicado en Mazatlán (Sinaloa, México) (Figura 1) con las siguientes coordenadas (Cuadro 2), de acuerdo al protocolo propuesto por Herranz *et al.*, (2007), se seleccionó este sitio debido a que gracias a su ubicación es un cuerpo de agua poco impactado por la actividad antropogénica además de tener un fácil acceso; se recolectaron muestras de 500 g a una profundidad de 10 cm y se colocaron en bolsas resellables, a las muestras recolectadas de estos puntos se les hizo granulometría para así escoger el sitio con la composición más adecuada para el camarón de acuerdo a Rendon (2015).

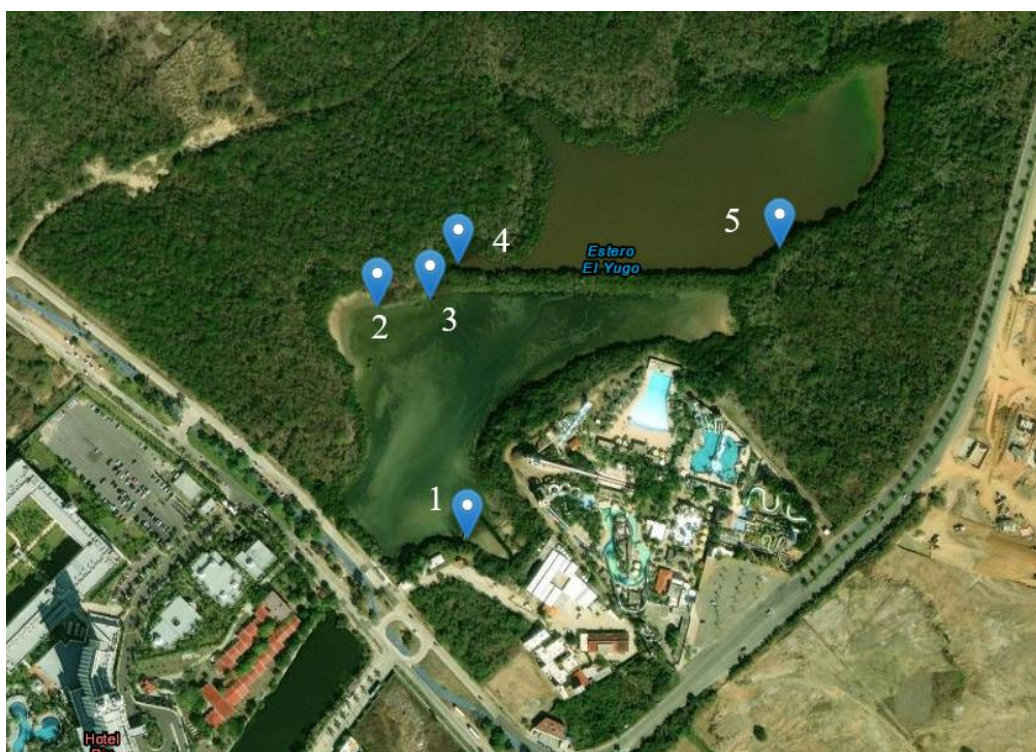


Figura 1. Puntos de muestreo de sedimento superficial en estero del yugo (Mazatlán, Sinaloa).

Cuadro 2. Coordenadas de puntos de muestreo exploratorio de sedimento superficial

Punto	Coordenadas
1	Lat: 23° 18' 08" N, Lon: 106° 28' 59" W
2	Lat: 23° 18' 14" N, Lon: 106° 29' 02" W
3	Lat: 23° 18' 16" N, Lon: 106° 28' 59" W
4	Lat: 23° 18' 16" N, Lon: 106° 28' 50" W
5	Lat: 23° 18' 15" N, Lon: 106° 29' 00" W

5.2. Caracterización de sedimento

Se caracterizó de acuerdo al protocolo de Keith (1991), se removieron piedras o palos muy grandes que pudieran alterar el volumen de la muestra, se tomó una cantidad mínima de entre 100 y 150 g de sedimento superficial, se tomó una alícuota representativa de aproximadamente 25 g para estimar el peso seco, se tomó una segunda alícuota de 20 g, se colocó la muestra de sedimento en un recipiente y se le añadieron 20mL de peróxido de hidrogeno al 30% y se dejó reposar hasta que el burbujeo se detuvo, una vez cesa el burbujeo se añadieron 10 ml más de peróxido y se continua agregando porciones de 10 ml de peróxido hasta que cese el burbujeo, se hirvió la muestra para remover el exceso con cuidado para no perder muestra al hervir, posterior a esto se realizó un tamizado húmedo este paso separa los granos mayores de 62.5 μm (ej. arena y grava) de los menores de 62.5 μm (ej. limos y arcillas), se colocó un tamiz de 62.5 μm en un embudo, con un recipiente graduado a 1L debajo, se coloca la muestra en el tamiz con agua destilada y se lava el sedimento con una piseta y rocío suave, los grumos se removieron suavemente con una espátula de goma, el agua de lavado no debe exceder los 950 ml. La fracción gruesa se pasa con agua destilada a un crisol de 50 ml previamente pesado, se secó la fracción a peso constante en horno a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se enfrió a temperatura ambiente en desecador; para la fracción de limo y arcilla se utilizan los índices de sedimentación de las partículas, se agregarán 10 ml de la muestra en las probetas graduadas de 1L y se mezcló la suspensión con inversión y agitación y se dejó reposar durante 2 horas, se aforó el volumen a 1L con agua destilada, después de 20s se retiró una alícuota de 20 ml a una profundidad de 20cm por debajo de la superficie y se transfirió a un crisol pre-pesado de 50 ml, se enjuagó la pipeta y se tomaron alícuotas de 20mL a una profundidad de 10cm con los tiempos de retiro de Folk (1968) y Buchanan (1984), todas las alícuotas se transfirieron a crisoles pre-

pesados y se secaron a peso constante con una temperatura de $90\pm 2^{\circ}\text{C}$, se enfriaron las muestras secas en desecador y se pesaron en balanza analítica.

Seguidamente se determinó la materia orgánica con el protocolo de Sadzawka y Zagal (2007), para esto las muestras deben mantenerse refrigeradas a 4°C hasta el análisis, posterior a ello las muestras de lodos se secan a $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y libre de materiales inertes y carbonatos, para detectar la presencia de carbonatos añadir HCl concentrado (modificación) donde la aparición de burbujas indica presencia de carbonatos, si la muestra de lodo no contiene carbonatos, se calcula el contenido de materia orgánica a partir de los sólidos volátiles, si la muestra contiene carbonatos colocar entre 10 y 20g de muestra seca de lodo o suelo en un crisol o capsula pre-pesado, agregar HCl hasta que cese el burbujeo y secar en estufa a 105°C durante 2 horas, se recolectó nuevamente muestra la ubicación número 5 (Lat $23^{\circ} 18' 15''$ N Lon $106^{\circ} 29' 00''$ W) (Figura 1).

5.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Se determinó la MIC a las muestras de sedimento obtenidas del punto escogido (cinco) con el objetivo de conocer la cantidad mínima de antibiótico a utilizar para inhibir la mayor cantidad de colonias posibles, esto se hizo bajo el protocolo propuesto por Horna *et al.*, (2005) el cual consiste en diluciones seriadas de antibiótico en caldo Mueller – Hinton adicionado con NaCl. Primeramente, se diluyó 1 g de muestra de sedimento del punto número 5 (Cuadro 2) en solución salina estéril al 2.5% y se sembró por microgota en placas de agar marino para permitir crecer la mayor diversidad de colonias posible.

Posteriormente se tomó un inóculo de la mayor cantidad de poblaciones bacterianas posibles del cultivo en agar marino, en su mayoría colonias puntiformes de tonalidades amarillo, blanco y naranja y se sembraron por triplicado en caldo Mueller – Hinton donde se probaron concentraciones de antibiótico (OTC) que variaron desde $350\ \mu\text{g/ml}$ a $6000\ \mu\text{g/ml}$, se observó la turbidez y fue solamente en las concentraciones donde no se presentó turbidez donde se procedió a una segunda siembra en agar marino para contabilizar las unidades formadoras de colonias (UFC) después de 24 horas, la MIC determinada fue de $3000\ \mu\text{g/ml}$ ($386\ \text{UFC} \pm 21$), se utilizó este valor debido a que el propósito del experimento era observar el comportamiento de las poblaciones bacterianas a través del tiempo, por lo tanto la concentración de oxitetraciclina debía ser lo suficientemente alta

para eliminar el mayor número de colonias posibles sin eliminar todas en su totalidad, el antibiótico utilizado para el análisis fue OTC marca sigma (Dihydrate SigmaUltra).

Una vez la MIC fue determinada se escogió otra concentración de OTC que representará una exposición baja de antibiótico para las colonias encontradas en las muestras, se seleccionó la concentración de 400 µg/ml debido a que es cercana a la utilizada por otros autores en experimentos similares (Soto-Rodriguez *et al.*, 2019) para posteriormente preparar la dieta a ofrecer a los organismos.

5.4. Composición de la Dieta

La formulación y elaboración del alimento para camarones se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición acuícola de CIAD Mazatlán, se utilizó la dieta para *Penaeus vannamei* propuesta por Hernández *et al.*, (2008) (Cuadro 2) la cual cumple con los requerimientos nutricionales de la especie, primeramente, se hicieron los análisis proximales de los ingredientes para formular el contenido al 32% de proteína y 8% de lípidos (Lee y Jun, 2018).

Cuadro 3. Formulación de la dieta para *Penaeus vannamei*.

Ingrediente	Dieta control	Inclusión (baja concentración OTC)	Inclusión (alta concentración OTC)
			g/kg
Harina de sardina	459	459	459
Harina de soya	64.4	64.4	64.4
Harina de trigo	260	260	260
Hidrolizado subproducto de atún	20	20	20
Aceite de pescado	13.1	13.1	13.1
Lecitina de soya	17.5	17.5	17.5
Vitamina C	2	2	2
Mezcla de vitaminas	15	15	15
Mezcla de minerales	15	15	15
Alginato	20	20	20
Colesterol	5	5	5
Almidón	109	107	94
Oxitetraciclina	0	2	15

5.5. Calculo para la Concentración de Antibiótico

Se tuvieron dos concentraciones de antibiótico: 3000 µg/ml (MIC obtenida) y 400 µg/ml (concentración baja de antibiótico), las concentraciones fueron multiplicadas cinco veces para así obtener la cantidad de antibiótico a añadir en el alimento, se multiplicó por cinco para compensar la pérdida de antibiótico durante la elaboración del alimento.

$$400\mu\text{g/ml} \times 5 = 2000 \quad \mu\text{g de OTC por g de alimento}$$
$$\times 1000 \quad \text{por kg}$$

2000000 µg de OTC por kg de alimento

$$3000\mu\text{g/ml} \times 5 = 15000 \quad \mu\text{g de OTC por g de alimento}$$
$$\times 1000 \quad \text{por kg}$$

15000000 µg de OTC por kg de alimento

Las concentraciones reales de antibiótico en el alimento fueron determinadas por LC/MS-MS, metodología que es indicada más adelante en este documento, se elaboró el alimento de acuerdo a Arriaga *et al.*, (2021), el procedimiento viene indicado en el anexo 1.

5.6. Comprobación de Inhibición de la OTC en la Dieta.

Se cultivó la cepa de referencia *Escherichia coli* CAIM 21 (ATCC 25922) en medio TSA, después se obtuvo 1g de pellet con OTC y se colocó el pellet por encima del cultivo en condiciones estériles, se cultivó durante 24 horas y se comprobó la inhibición además de medir el halo de inhibición.

5.7. Obtención de los Camarones Silvestres

Se colectaron organismos silvestres adultos de *Penaeus vannamei* (peso $25\text{g} \pm 4\text{g}$) en el sistema lagunar Huizache Caimanero con ubicación geográfica $23^{\circ} 0'46.31'' \text{ N}$; $106^{\circ} 9'5.28'' \text{ O}$.

Al lote de camarones recolectados se le realizó diversos análisis para conocer el estado de salud de los ejemplares, los análisis de enfermedades, , el resto de los análisis se procesaron en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular (LDM), de CIAD, A.C., para AHPND/EMS el resultado fue no detectado, para White spot syndrome virus (WSSV) no detectado, síndrome de taura (TSV) no detectado, necrosis hepatopancreática (NHPB) no detectado, necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) el resultado fue detectado, sin embargo, no hay evidencia de mortalidad en el camarón *P. vannamei* solamente puede afectar en crecimiento haciéndolo más lento o bien presentarse deformaciones corporales (Genics, 2020).

5.8. Sistema Experimental

Los tratamientos consistieron en acuarios de vidrio cuyas dimensiones fueron 30 cm x 15 cm x 25.5 cm de alto (11.47 L de capacidad) de 1 organismo por unidad experimental con 5 réplicas para cada tratamiento, el acuario contó con 1cm de sustrato de sedimento que fue colectado del punto número 5 (Figura 1). Se hicieron recambios parciales del 50% de agua diariamente mediante sifón para mantener las condiciones apropiadas para los organismos, y se realizó con sumo cuidado para evitar estados de estrés en los organismos. Se tuvo una oxigenación constante que varió entre los 5.48 mg/mL y los 6.00 mg/mL de O_2 disuelto y se monitorearon los parámetros de amonio, nitritos, nitratos y pH con tiras reactivas marca Acua Biomar diariamente y se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad durante todo el bioensayo y una temperatura de 26°C .

Todos los organismos fueron alimentados con 1g de la dieta control que representa un 4% de biomasa del promedio de peso ($25\text{g} \pm 4\text{g}$) durante la primera semana de tratamiento (Figura 2), posterior a ello 5 organismos fueron expuestos a la dieta con una baja concentración de OTC (2mg/g concentración teórica) y el resto de los organismos continuaron con consumiendo la dieta

control, una vez transcurrido la semana de tratamiento, los 5 organismos que fueron alimentados con la dieta que incluía OTC fueron alimentados con alimento de una concentración mayor durante la siguiente semana (15mg/g teórico) y el resto de los organismos continuaron con la dieta control, al paso de la tercera semana todos los organismos, incluyendo aquellos tratados con OTC volvieron a ser alimentados con la dieta control durante 2 semanas más, el bioensayo duró un total de 35 días de inicio a fin; se llevaron a cabo muestreos de heces y sedimento antes del cambio de cada dieta, siendo así 5 puntos de muestreo.

La toma de muestra de heces se llevó a cabo de acuerdo a Enciso (2016) en los días siete, catorce, veintiuno y treinta y cinco de tratamiento, con ayuda de pinzas de disección se colectaron las muestras inmediatamente de que salieron del tracto intestinal del organismo, posteriormente se colocaron en tubos eppendorf con capacidad de 1.5mL con 1mL de etanol al 96% para su conservación. Para el muestreo de sedimento se sifoneó el fondo y se obtuvieron 5g de sedimento recolectado en tubos falcón de 15 ml con etanol al 96% y se conservaron a -20°C hasta su análisis, para las muestras utilizadas en espectrometría de masas la recolección fue sin etanol al 96% debido a la solubilidad de OTC en solventes, solamente se recolectaron muestras de sedimento en tubos eppendorf con capacidad de 1.5.

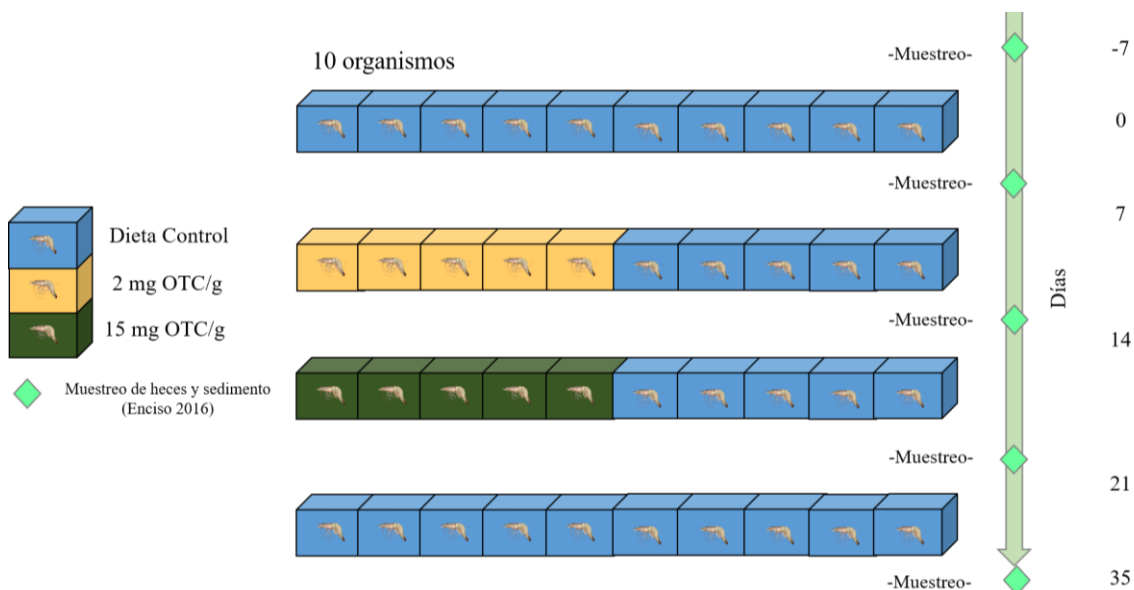


Figura 2. Sistema experimental del bioensayo con camarones.

5.9. Determinación de la Concentración de OTC Biodisponible.

Se determinó la concentración de OTC en el alimento y el sedimento en el laboratorio de plaguicidas (LANIIA-CIAD) de CIAD Unidad Culiacán, se utilizó un protocolo para la detección de tetraciclina y oxitetraciclina en sedimento marino y alimento para peces (basado en Norambuena *et al.*, 2013 y Gonzalez-Gaya *et al.*, 2018) que involucra la extracción con ácido oxálico 0.01M en metanol y determinación LC-MS/MS.

Para preparar las curvas de validación para el protocolo de extracción, dado que fue en base a dos protocolos ya existentes, se pesó en tubo falcón de 50 ml, 3.0 ± 0.01 g de la muestra molida y homogeneizada y se agregó un volumen de la disolución de fortificación y se adicionaron 12 mg de Na₂EDTA como agente quelante para evitar la formación de enlaces entre la molécula del antibiótico y los metales presentes en el sedimento. Posteriormente la muestra se extrajo con 30 ml de ácido oxálico 0.01M en metanol + 30 μ l de ácido fórmico, se agitó en vortex por 30 segundos y luego fueron agitados por 30 min en baño ultrasónico, después se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y el sobrenadante fue transferido a un matraz bola para rotavapor, se evaporó a sequedad, posterior a ello fue reconstituido con 3 ml de mezcla formiato de amonio 5mM/Acetonitrilo (75/25).

El extracto reconstituido fue centrifugado a 4000 rpm por 5 min con la finalidad de precipitar proteínas presentes y coaguladas por el acetonitrilo. Finalmente, 1 ml del sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de PDVF de 0.22 μ m y se inyectaron de 5 -10 μ l del extracto final en el sistema LC-MS/MS.

Las muestras fueron inyectadas de forma automática a través de un sistema Sample Manager-FTN Acquity de Waters a un UPLC Acquity serie H equipado con columna Acquity UPLC BEH Phenyl 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm, en un volumen de 5 μ l. Las condiciones empleadas fueron establecidas por el laboratorio durante el desarrollo del método cromatográfico, quedando como fase móvil A (formiato de amonio 5 mM, pH 3.0) y fase móvil B (Metanol + formiato de amonio 5 mM + 0.1% de ácido fórmico).

Con un tiempo total de corrida de 8.0 minutos. La identificación y cuantificación se realizó mediante sonda ESI (+/-) en un espectrómetro de masas Xevo TQ-S de Waters y estación de trabajo MassLynx. Los iones fueron monitoreados usando MRM (Multiple Reaction Monitoring) “barrido del ion producto” para al menos dos transiciones.

5.10. Extracción de ADN de Heces y Sedimento.

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) de acuerdo a Enciso (2016) y se llevó a cabo con el procedimiento indicado en el anexo 2.

5.11. Pureza de ADN.

Para determinar la concentración y pureza del ADN de acuerdo a Enciso (2016) se usó el espectrofotómetro DeNovix DS-11, donde se colocará 1 µl de la muestra en el orificio lector y se registra la concentración (ng/ml) y relación 260/280 nm. Posteriormente se realizó una dilución de 1:10, una vez determinada la concentración se checó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.12. Preparación de Librerías

Las librerías son bibliotecas donde se guarda la información de los genomas de un organismo y su preparación se llevó a cabo en la plataforma IlluminaMiniSeq siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante (Anexo 3) y de acuerdo a Enciso (2019). El código de las muestras se organizó de la siguiente manera (Cuadro 4):

C01S01 – C01F01, la primera letra (C) corresponde a la dieta suministrada, en este caso C corresponde a control, el resto de las letras (L y H) significan Low y High siendo Low la dieta de 2mg/g de OTC mientras que High corresponde a la dieta de 15 mg/g de OTC, S y F corresponden al tipo de muestra, S para las muestras de sedimento y F para las muestras de heces; y por último la combinación 01 indica el día de muestreo (Cuadro 4).

5.13. Limpieza de Lecturas

Para checar la calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación se utilizó el programa FastQC, se eliminaron secuencias con una calidad inferior a Q20 y se hicieron cortes para eliminar las lecturas cortas, así como los adaptadores (<150 bases) con la opción `fastx_trimmer` de FASTX-Toolkit.

5.14. Análisis Taxonómico

El análisis taxonómico se llevó a cabo en el servidor Biobacter de CIAD Unidad Mazatlán en lenguaje linux, para el análisis se utilizó el programa Kaiju (Menzel y Krogh, 2016), el cual es un programa sensible para la clasificación taxonómica de secuenciación, y se puede utilizar para lecturas del genoma completo o experimentos de metagenómica. Cada lectura de la secuenciación es asignada a un taxón. Kaiju utiliza la clasificación a nivel proteico y tiene mayor sensibilidad comparado con otros métodos basados en la comparación de nucleótidos (Menzel y Krogh, 2016). Se utilizó la base de datos nr+euk, este programa se ha utilizado anteriormente para análisis taxonómicos y funcionales como lo realizado por Beraud *et al.*, (2020), donde utilizaron el programa Kaiju para la clasificación taxonómica con la base de datos de progenomes.

Se analizaron los taxones más abundantes de cada muestra hasta nivel especie en muestras de heces de camarón y sedimento recolectado durante el bioensayo. Se obtuvo el índice Shannon-Wiener el cual es un indicativo de los niveles de riqueza, a través de una serie de comandos ya establecidos en el sistema Linux. Para generar las gráficas de rarefacción y los PCA se utilizó el paquete `ampvis2` de RStudio 2021.09.1+372 con las opciones `amp_rarecurve` y `amp_ordinate`, mientras que para representar las familias de mayor abundancia se utilizó el paquete `phyloseq` con el que se creó un objeto donde se incluyera la Cuadro de otus, de taxonomía y metadata, junto a los paquetes `microbiome`, `ggplot2` y `dyplr` de la misma versión de Rstudio. También se calcularon los índices de diversidad de Shannon de cada muestra y se compararon para analizar si existía diferencia significativa o no.

Cuadro 4. Desglose para la identificación de muestras de heces y sedimento de <i>Penaeus vannamei</i>									
Identificación de muestras									
Matriz	Tratamiento	Día	Organismo	Código	Matriz	Tratamiento	Día	Organismo	Código
Heces	Control	1	1	C01F01	Sedimento	Control	1	1	C01S01
Heces	Control	7	1	C07F01	Sedimento	Control	7	1	C07S01
Heces	Control	14	1	L14F01	Sedimento	Control	14	1	L14S01
Heces	Control	21	1	H21F01	Sedimento	Control	21	1	H21S01
Heces	Control	35	1	C35F01	Sedimento	Control	35	1	C35S01
Heces	Control	1	13	C01F13	Sedimento	Control	1	13	C01S13
Heces	Control	7	13	C07F13	Sedimento	Control	7	13	C07S13
Heces	Control	14	13	L14F13	Sedimento	Control	14	13	L14S13
Heces	Control	21	13	H21F13	Sedimento	Control	21	13	H21S13
Heces	Control	35	13	C35F13	Sedimento	Control	35	13	C35S13
Heces	Antibiótico	1	3	C01F03	Sedimento	Antibiótico	1	3	C01S03
Heces	Antibiótico	7	3	C07F03	Sedimento	Antibiótico	7	3	C07S03
Heces	Antibiótico	14	3	L14F03	Sedimento	Antibiótico	14	3	L14S03
Heces	Antibiótico	21	3	H21F03	Sedimento	Antibiótico	21	3	H21S03
Heces	Antibiótico	35	3	C35F03	Sedimento	Antibiótico	35	3	C35S03
Heces	Antibiótico	1	10	C01F10	Sedimento	Antibiótico	1	10	C01S10
Heces	Antibiótico	7	10	C07F10	Sedimento	Antibiótico	7	10	C07S10
Heces	Antibiótico	14	10	L14F10	Sedimento	Antibiótico	14	10	L14S10
Heces	Antibiótico	21	10	H21F10	Sedimento	Antibiótico	21	10	H21S10
Heces	Antibiótico	35	10	C35F10	Sedimento	Antibiótico	35	10	C35S10

5.15. Análisis de Genes de Resistencia Antibiótica

Para el análisis de los genes de resistencia de las muestras secuenciadas se utilizó el programa Anvio7, la cual es una plataforma integral que reúne muchos aspectos de las estrategias computacionales de vanguardia en microbiología donde se reúnen datos de genómica, metagenómica, metatranscriptómica, pangenómica, metapangenómica, filogenómica y genética de poblaciones microbianas en un entorno integrado y fácil de usar y con visualización interactiva, para el análisis en anvio las muestras fueron agrupadas en contigs con MEGAHIT Genome Assembly v1.0.2 (Li *et al.*, 2015), se limpiaron las ambigüedades y los headers para continuar con el proceso) de anvio con un script (metagenomic_workflow.v0.4.1.sh, de Bioinformática microbiana, 2022) que simplifica el mapeo de las secuencias y el crear la base de datos de los contigs para directamente generar un archivo interactivo a usar en la plataforma de anvio, en dicho archivo interactivo se buscó el KO (Kegg orthology) de los mecanismos de resistencia a tetraciclina (Cuadro 1) de acuerdo a la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG), una vez identificados se agruparon en bins de acuerdo al mecanismo de resistencia seleccionado y una vez agrupado se observó la abundancia relativa del gen en la muestra y se identificó a que taxon pertenecía el contig asignado.

5.16. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un análisis multivariado permutado de la varianza (PERMANOVA) el cual es un modelo utilizado en ecología y biología para explicar comunidades con variables ambientales y se basa en permutaciones de matrices de distancia (XLstat, 2022) y un análisis de varianza de dos vías con una prueba *posthoc* de Tukey para conocer si existe diferencia entre matrices y grupos, además de dos análisis de componentes principales (PCA) de cada matriz para conocer qué tan estrecha es la relación entre las muestras, todo el análisis estadístico se hizo en el programa de R 2021.09.1+372 con los paquetes rstatix y vegan.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización del Sedimento

El punto de muestreo seleccionado del Estero del Yugo Mazatlán, Sinaloa presentó una composición del 90.1% de arena, 7.10% de limo y una parte del 2.80% de arcilla, mientras que el valor obtenido de materia orgánica fue de 6.75%, los valores obtenidos en este estudio son muy cercanos a los obtenidos por Rendon (2015) en zonas cercanas a unidades productoras de camarón en otro estero de la ciudad de Mazatlán (estero de Urías), sin embargo, en este casi el sitio de muestreo seleccionado es un sitio poco impactado por la actividad antropogénica.

Cuadro 5. Resultados caracterización de sedimentos del punto seleccionado (%)

Arena	Limo	Arcilla	Materia orgánica
90.10	7.10	2.80	6.75

6.2. Análisis para Comprobar la Inhibición por parte de la Dieta

Se cultivó la cepa de referencia *E.coli* CAIM 21 (ATCC 25922) y se observó que el pellet de alimento provocara un halo de inhibición, este halo se comparó con el halo producido por los discos con la concentración control de antibiótico preparada con OTC de Sigma, se puede observar en la figura 3 el halo de inhibición en ambas dietas por lo tanto se comprobó que durante la elaboración del alimento no se eliminó la oxitetraciclina.

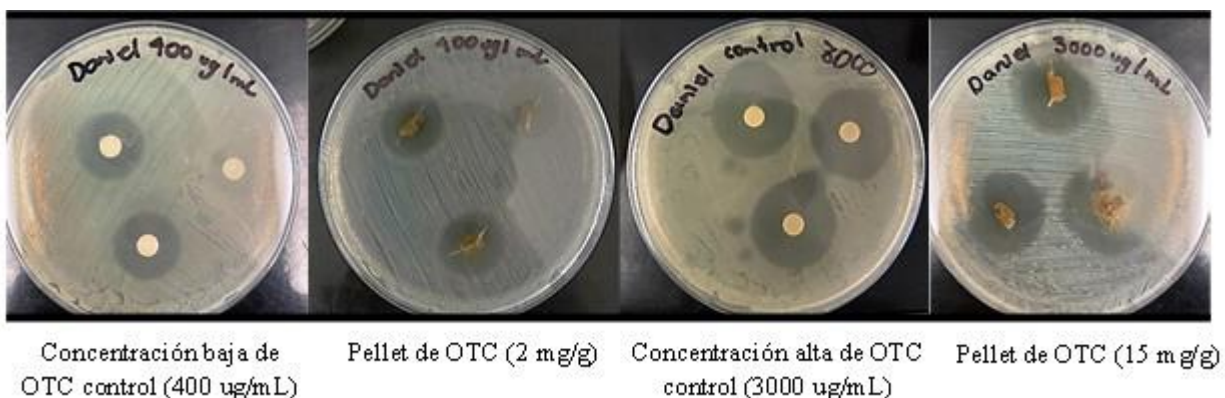


Figura 3. Comparación de los halos de inhibición entre antibiótico utilizado como control y los pellets elaborados para la alimentación de los organismos del bioensayo.

6.3. Determinación de la Concentración de OTC Biodisponible.

Se determinó la concentración de OTC disponible con una modificación en el método de Norambuena *et al.*, 2013 y Gonzalez-Gaya *et al.*, 2018, para comprobar que el método de recuperación de OTC era apropiado para el tipo de muestras a analizar (heces y sedimento) se comprobó la linealidad del método y se obtuvo una $R^2 = 0.9934$, mientras el valor de R^2 sea más ajustado 1 mayor será el ajuste de la línea y por lo tanto el método utilizado recupera la mayor cantidad de antibiótico posible (Figura 4). Para el análisis de OTC por espectrometría de masas se utilizaron 10 muestras de sedimento y las 9 muestras de alimento correspondiente a las diferentes dietas utilizadas (control, baja concentración de OTC y alta concentración de OTC).

La ecuación de la regresión para la recuperación de tetraciclina con una exactitud de recobro (%) de 87.38 ± 12.07 es:

$$y = 165.533x + 11.157$$

Con un límite de detección (mg/kg) de 0.004 y un límite de cuantificación (mg/kg) de 0.011.

Mientras que la ecuación obtenida para oxitetraciclina con una exactitud de recuperación (%) de 95.42 ± 16.45 es:

$$y = 3511.03x + 1953.85$$

Con un límite de detección (mg/kg) de 0.003 y un límite de cuantificación (mg/kg) de 0.008.

Una vez comprobado el método se hicieron extracciones con patrones de tetraciclina y oxitetraciclina junto a la matriz utilizada (sedimento y alimento) para comprobar el método y evitar interferencias por el cambio de matriz (Figura 4 y Figura 5).

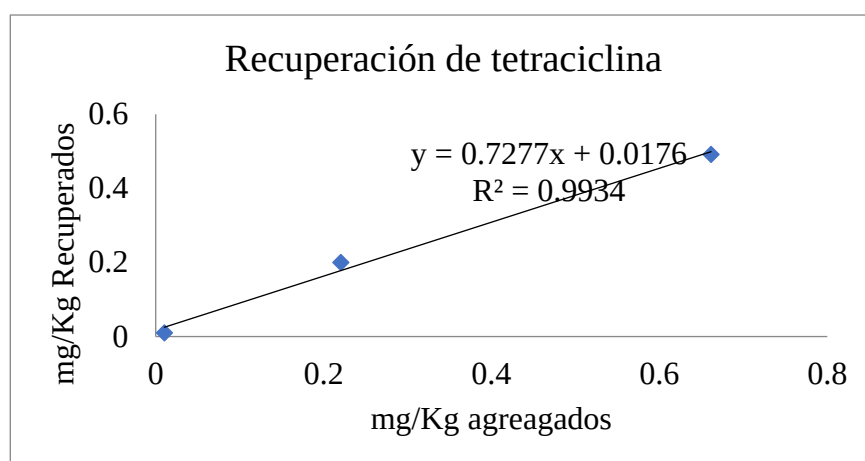


Figura 4. Comprobación de la linealidad de la modificación del método de Norambuena, *et al.*, 2013 y Gonzalez-Gaya *et al.*, 2018 para extracción de OTC ($R^2 = 0.9934$) utilizado con un patrón de tetraciclina para LC-MS/MS.

Para la extracción del patrón de tetraciclina se obtuvo una $R^2=0.9928$ mientras que para la extracción del patrón de oxitetraciclina se obtuvo una $R^2= 0.9934$

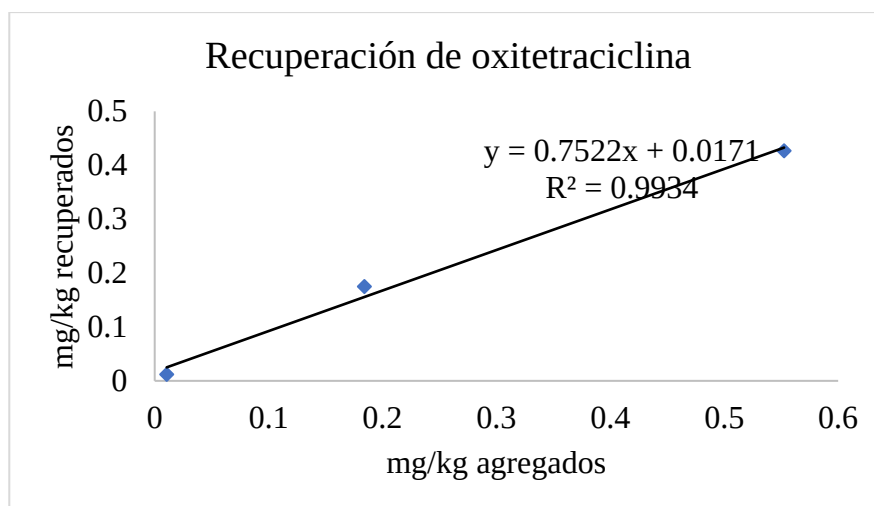


Figura 5. Comprobación de la linealidad de la modificación del método de Norambuena, *et al.*, 2013 y Gonzales-Gaya *et al.*, 2018 para extracción de OTC ($R^2 = 0.9934$) utilizado con un patrón de oxitetraciclina para LC-MS/MS.

No se detectó la presencia de oxitetraciclina en muestras de sedimento con organismos control (sin exposición al antibiótico), es importante mencionar que el límite de detección de la técnica fue de 0.003 mg/kg como fue mencionado anteriormente, se descartó contaminación entre sistemas ya que al momento de aplicar el antibiótico (día siete y catorce) no hubo un aumento considerable en la concentración de oxitetraciclina en ninguno de los momentos de muestreo en ambos sistemas (Cuadro 6)

Cuadro 6. Concentración de oxitetraciclina detectada en las muestras de sedimento de organismos *Penaeus vannamei* expuestos a OTC.

Tiempo (Días)	mg de OTC/g de sedimento control	mg de OTC/g de sedimento con tratamiento
1	0.00	0.00
7	0.00	0.00
14	0.00	0.32
21	0.00	0.35
35	0.00	0.06

En el caso de las muestras que fueron expuestas a oxitetraciclina se puede observar un aumento en

la concentración de antibiótico en el día catorce, el cual fue el momento en el que termina una semana de tratamiento con la dieta de menor concentración de OTC (Cuadro 6).

También se hicieron análisis en muestras de alimento para comprobar la presencia de oxitetraciclina y corroborar que el antibiótico no se degradó durante el proceso de elaboración de la dieta, se obtuvieron las siguientes concentraciones reales, para la dieta control no se detectó la presencia de OTC, mientras que para la dieta con la menor concentración de oxitetraciclina se detectó 1.56 ± 0.04 mg de OTC por g de alimento, y para la dieta de mayor concentración que se estimaba en 15mg/g se obtuvo una concentración real de 10.78 ± 0.1 mg de OTC por g de alimento.

6.4. Rarefacción

Se obtuvieron un total de 159 muestras (9 de alimento, 50 de heces y 100 de sedimento), para los análisis metagenómicos se utilizaron 20 muestras de heces y 20 muestras de sedimento y cuatro de organismos (Cuadro 7 y Cuadro 8), el número de individuos y los OTUS asignados, además del número de secuencias sin clasificar posterior a la clasificación con Kaiju.

La mayoría de las muestras (87.5%) tuvieron un número de secuencias mayor a un millón, solamente cinco estuvieron por debajo del millón y todas fueron muestras de heces (Cuadro 7 y Cuadro 8). El número de OTUS observados también está indicado en las curvas de rarefacción para el contenido intestinal de heces (Figura 6) y sedimento (Figura 7). Las curvas de rarefacción comparan la cantidad de especies observadas con respecto a las secuencias obtenidas, en el caso de las muestras provenientes de heces de *Penaeus vannamei* se obtuvo un promedio de $6,334 \pm 2,402$ OTUS (Min= 1,489, Max = 8,913, n = 20) mientras que para las muestras de sedimento el promedio registrado fue de $11,409 \pm 2,402$ OTUS (Min = 6,260, Max = 14,215, n = 20).

Cuadro 7. Número de secuencias, individuos, OTUS asignados y secuencias sin clasificar en muestras de heces de *Penaeus vannamei*

Muestra	Secuencias	Número de individuos	Número de OTUS	OTUS asignados				Secuencias sin clasificar
				Arquea	Bacteria	Eukaryota	Virus	
C01F01	1,518,436	154947	5861	284	12854	268	44	474832 (31%)
C01F03	1,367,536	128141	4873	241	9063	367	57	464821 (34%)
C01F10	815,910	148055	1741	6	1937	94	13	159317 (20%)
C01F13	1,271,174	133969	5565	378	11958	260	55	372550 (29%)
C07F01	1,067,390	88655	5946	535	13070	192	72	364733 (34%)
C07F03	1,620,740	266571	4355	89	8277	621	68	378664 (23%)
C07F10	1,446,472	124802	5738	289	12463	350	37	493945 (34%)
C07F13	851,844	131362	3090	51	4778	96	38	194240 (23%)
C35F01	933,456	212544	2769	18	4007	71	17	145051 (16%)
C35F03	1,242,686	105580	5540	302	11639	199	45	422267 (34%)
C35F10	1,146,652	83799	5759	337	11959	217	39	414593 (36%)
C35F13	1,040,282	119898	4061	74	7647	171	25	289155 (28%)
H21F01	1,348,324	104426	5867	306	12863	260	39	480693 (36%)
H21F03	1,174,670	137049	4613	119	9186	221	36	321988 (27%)
H21F10	1,277,870	101122	5976	553	13420	204	46	451320 (35%)
H21F13	700,168	59556	3130	52	5193	98	54	227995 (33%)
L14F01	1,444,108	125234	5898	333	12872	278	42	482692 (33%)
L14F03	1,263,208	114877	5642	547	11226	211	48	430325 (34%)
L14F10	1,157,066	172700	3250	50	5241	73	37	205955 (18%)
L14F13	895,114	121026	3450	60	6025	166	48	234356 (26%)

Cuadro 8. Número de secuencias, individuos, OTUS asignados y secuencias sin clasificar en muestras de sedimento de *Penaeus vannamei*

Muestra	Secuencias	Número de individuos	Número de OTUS	Arquea	Bacteria	Eukaryota	Virus	Secuencias sin clasificar
C01S01	2,979,426	232924	12594	828	18640	365	126	1048868 (35%)
C01S03	2,691,848	131166	11063	817	16238	340	86	1074321 (40%)
C01S10	3,715,234	229777	13317	866	19596	454	104	1410152 (38%)
C01S13	1,887,240	97248	9650	721	14389	219	64	748109 (40%)
C07S01	2,779,474	274853	11016	511	16222	407	57	865684 (31%)
C07S03	4,707,924	436781	11095	594	16218	512	79	1630683 (35%)
C07S10	3,277,848	327765	11807	578	17387	409	94	1073065 (33%)
C07S13	1,256,874	116622	6260	143	9195	189	39	416885 (33%)
C35S01	5,766,434	569157	13423	551	19680	590	96	1929466 (33%)
C35S03	6,971,868	469145	13727	688	20149	574	76	2509071 (36%)
C35S10	4,533,914	272690	12519	595	18376	499	73	1751635 (39%)
C35S13	6,755,971	543757	14215	649	20718	682	101	2394204 (35%)
H21S01	3,950,030	275305	11866	502	17233	660	90	1478469 (37%)
H21S03	3,432,614	240363	11256	543	16410	554	66	1290003 (38%)
H21S10	6,145,884	488581	13223	615	19414	561	102	2184911 (36%)
H21S13	1,494,386	114698	7922	303	11680	282	34	540840 (36%)
L14S01	3,832,848	353248	11733	527	17070	538	85	1253017 (33%)
L14S03	4,363,988	317807	12811	618	18627	602	92	1612755 (37%)
L14S10	3,075,689	112299	7811	351	11551	195	41	589936 (19%)
L14S13	3,642,758	223477	10873	440	15956	388	67	1383212 (38%)

En el diagrama de componentes principales (PCA) se puede observar (Figura 8) la separación entre las diferentes muestras provenientes de la microbiota intestinal y del sedimento de *Penaeus vannamei* en los distintos momentos de tratamiento. Las muestras intestinales se mantuvieron dispersas entre los cuadrantes, sin embargo, durante el tratamiento con oxitetraciclina en el día veintiuno solamente los organismos tratados con antibiótico se agruparon en el cuadrante izquierdo mientras que las muestras control estuvieron agrupados al lado derecho de la gráfica ACP, al retirar la presión de selección todas las muestras se agruparon en el cuadrante derecho.

En cuanto a las muestras de sedimento (Figura 9) las muestras se agruparon en su mayoría en el cuadrante derecho, solamente las muestras iniciales se agruparon del lado opuesto. Se hizo una anova de dos vías y una prueba de Tukey en R 2021.09.1+372 con el paquete rstatix, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos control – antibiótico ($P = 0.51 > 0.05$), ni entre matrices ($P = 0.9 > 0.05$).

Se hizo un análisis multivariado permutado de la varianza (PERMANOVA) con el paquete Vegan en R 2021.09.1+372 a cada una de las matrices (heces y sedimento) para heces y sedimento no se encontró diferencia significativa entre tiempos de tratamiento $P = 0.959 > 0.05$ y $P = 0.9 > 0.05$ respectivamente.

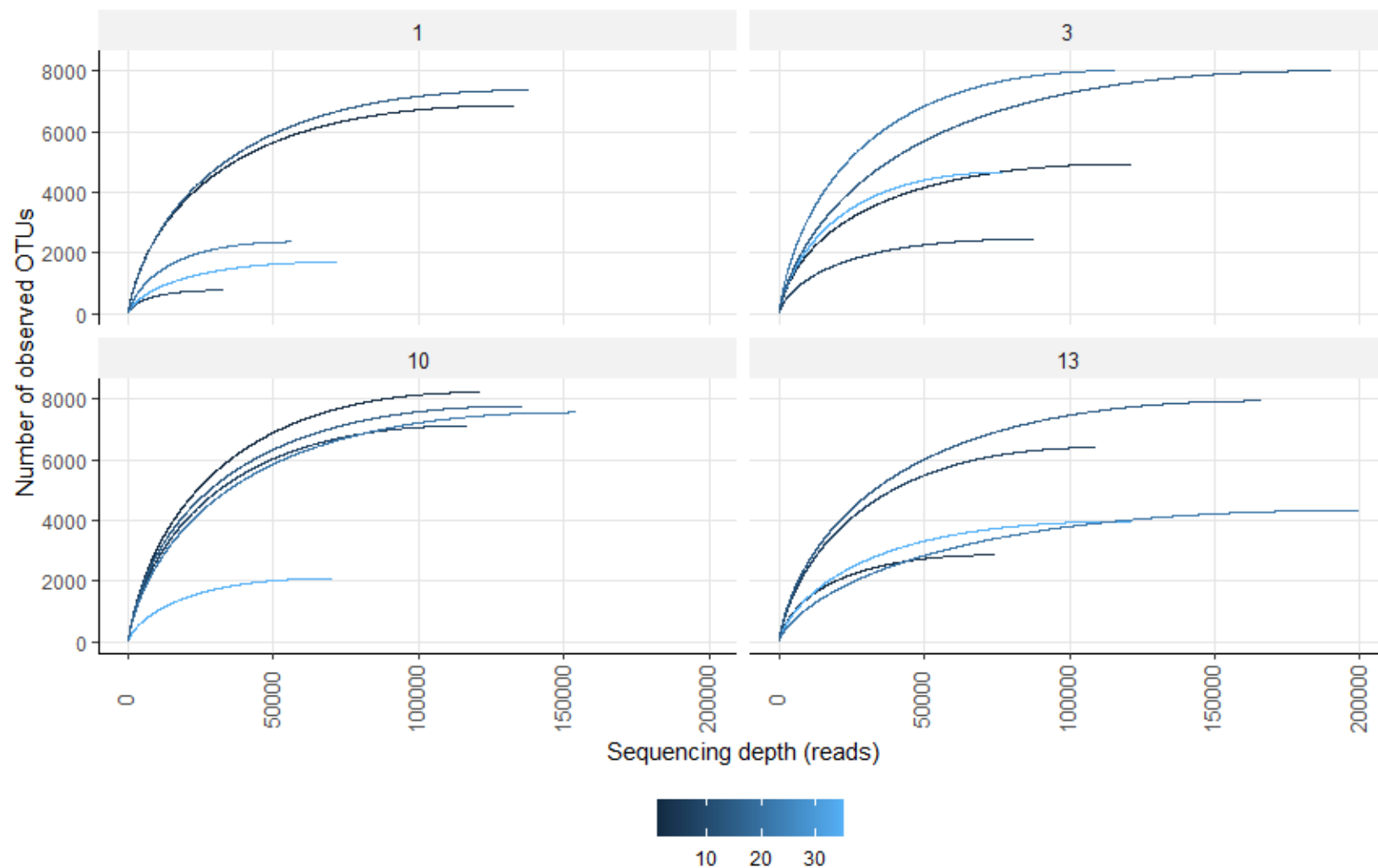


Figura 6. Curvas de rarefacción del número de OTUS posterior a la limpieza de las secuencias correspondiente a la microbiota intestinal, el color indica el momento en que la muestra fue tomada, color más oscuro inicio del tratamiento y color más claro final del experimento.

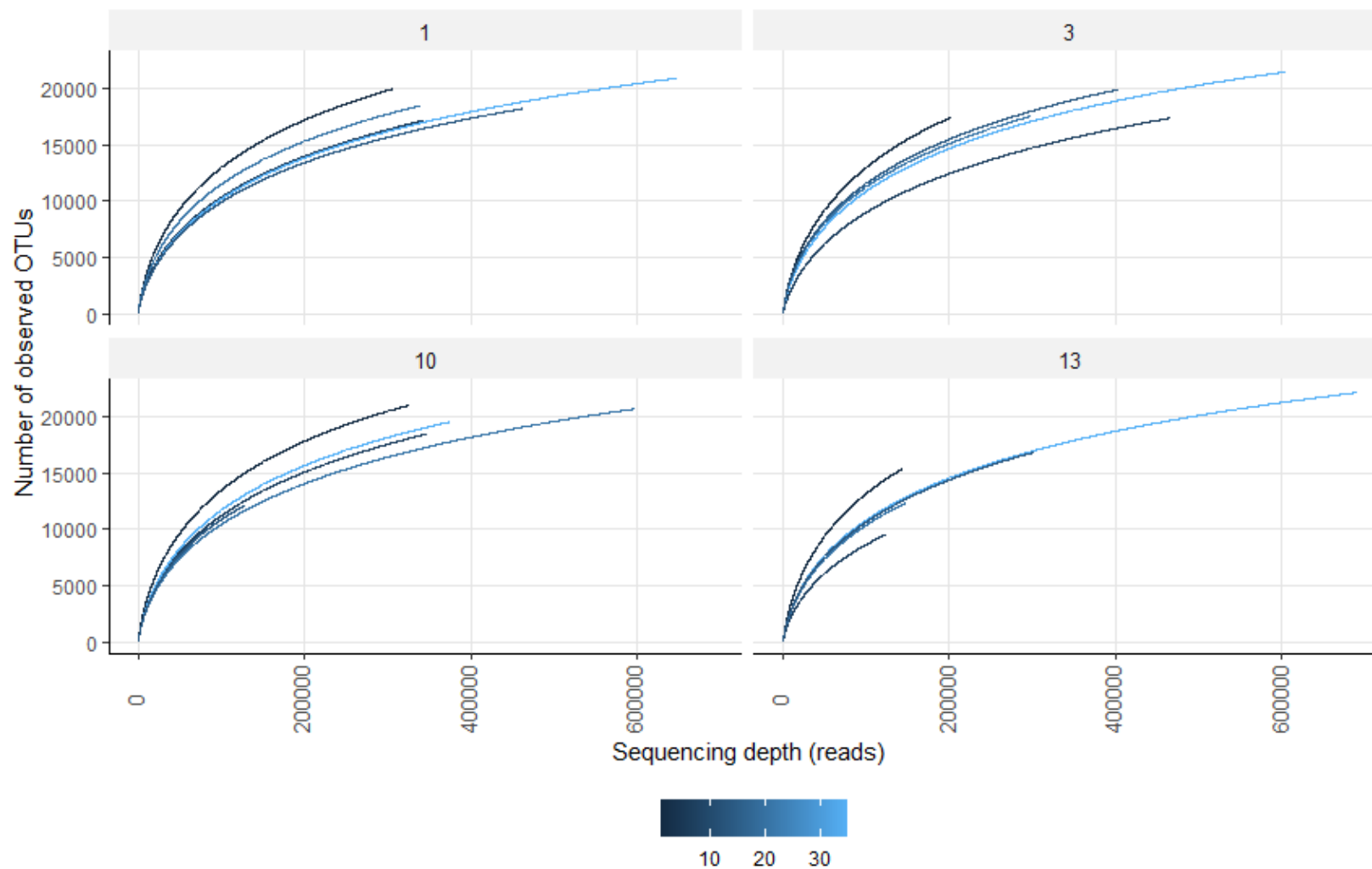


Figura 7. Curvas de rarefacción del número de OTUS posterior a la limpieza de las secuencias correspondiente a la microbiota de sedimento, el color indica el momento en que la muestra fue tomada, color más oscuro inicio del tratamiento y color más claro final del experimento.

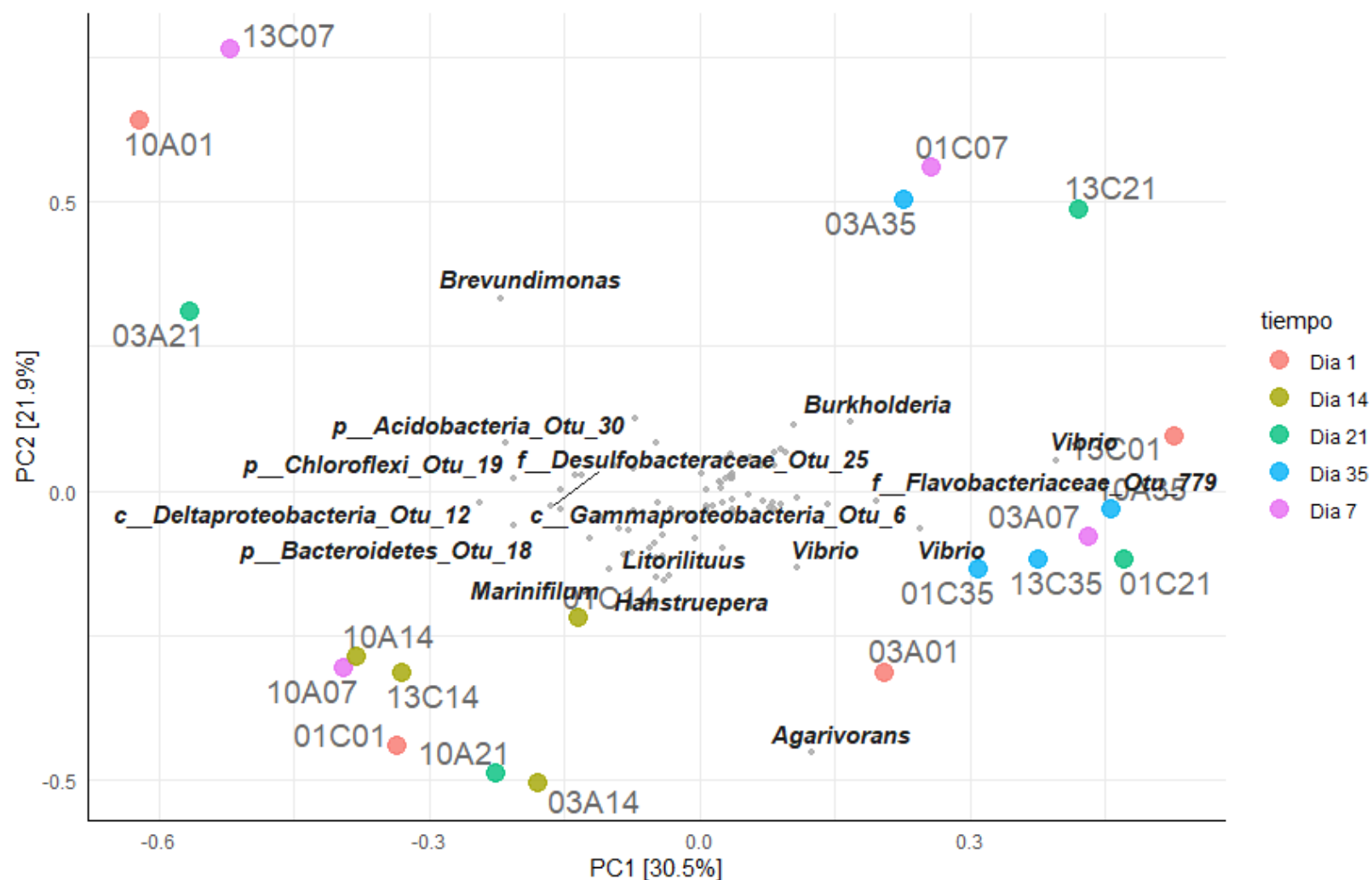


Figura 8. Distribución en el PCA de los cambios en la microbiota intestinal de camarón durante el tratamiento con OTC, los números 01 y 13 corresponden a organismos control (C) mientras que 03 y 10 son organismos bajo tratamiento (A), el tiempo viene indicando por días transcurridos y marcado con tonos azules más claro con el pasar del tratamiento.

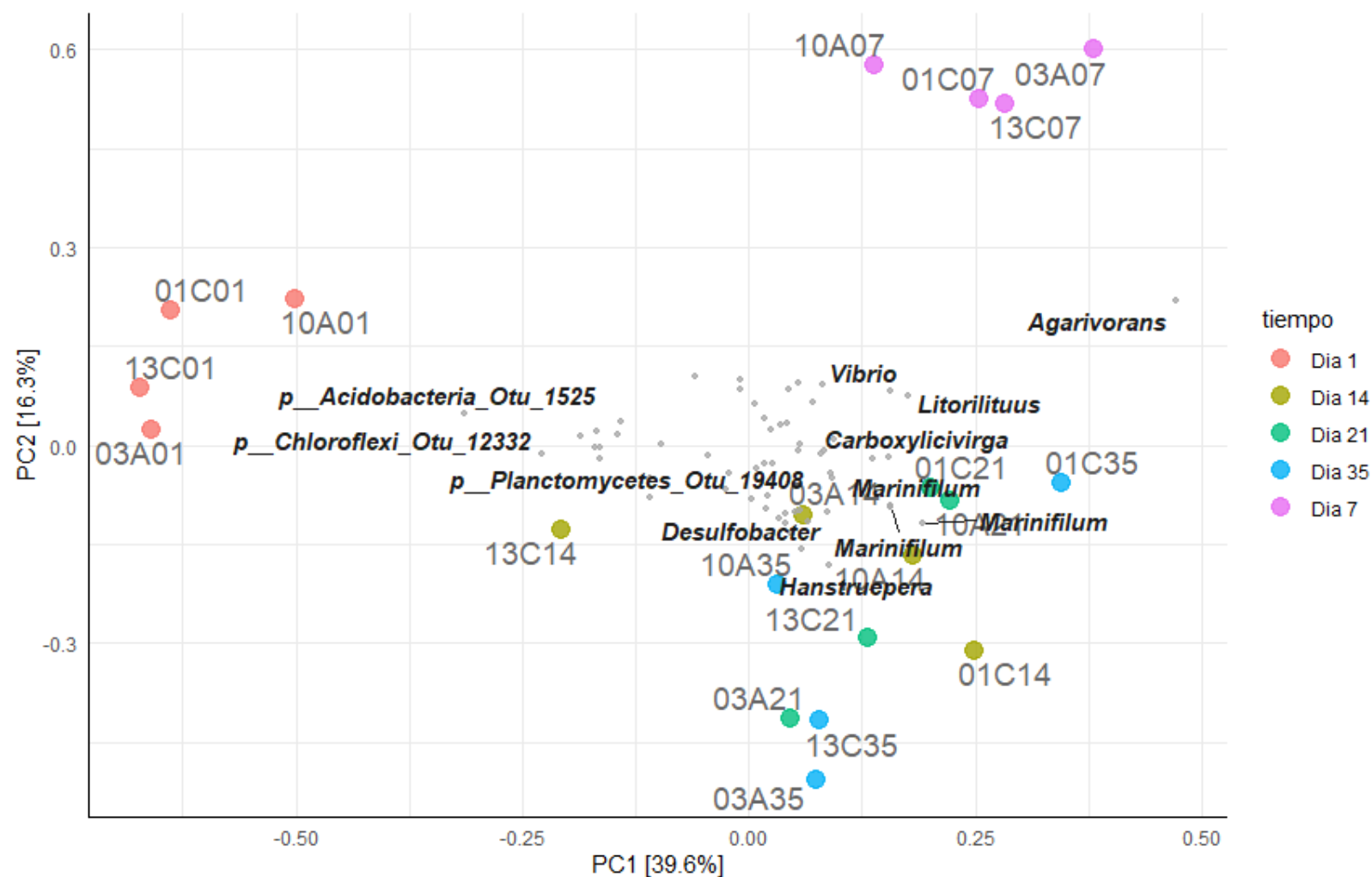


Figura 9. Distribución en el PCA de los cambios en la microbiota del sedimento de camarón durante el tratamiento con OTC, los números 01 y 13 corresponden a organismos control (C) mientras que 03 y 10 son organismos bajo tratamiento (A), el tiempo viene indicando por días transcurridos y marcado con tonos azules más claro con el pasar del tratamiento.

En el caso de los índices de diversidad de Shannon pertenecientes a los organismos control (Figura 11) el promedio de los índices fue de 6.5 ± 1.2 con un valor máximo registrado de 8.07 y lo obtuvo la muestra C07F01 correspondiente a heces, mientras que el valor mínimo fue de 4.371 para la muestra L14S13 cuya matriz fue sedimento, los índices de diversidad tuvieron una desviación estándar (s) de 1.2.

En el caso de los índices de diversidad de Shannon pertenecientes los organismos con tratamiento (Figura 10) el promedio de los índices fue de 6.9 ± 1.5 con un valor máximo registrado de 8.1 y lo obtuvo la muestra C01S10 correspondiente a sedimento, mientras que el valor mínimo fue de 1.9 para la muestra H21S10 cuya matriz fue sedimento, los índices de diversidad tuvieron una desviación estándar (s) de 1.5 y no se encontró diferencia significativa entre tratamientos control - antibiótico ($P > 0.05$).

6.5. Organismos control

La estructura bacteriana de los organismos control (camarón 01 y camarón 13) presentó algunos cambios durante el bioensayo, en el caso de la microbiota intestinal inicial (Cuadro 9) de *Penaeus vannamei* en los organismos control las familias dominantes fueron *Alteromonadaceae* y *Flavobacteriaceae* con 11 y 12% de abundancia relativa respectivamente (figura 11 y figura 17), seguidas de las familias *Desulfobacteraceae*, *Roseobacteraceae* y *Lewinellaceae* con 13, 7 y 8% de abundancia relativa respectivamente (Cuadro 10).

Durante el bioensayo existieron algunos picos en el incremento de la abundancia relativa de algunas familias tales como *Vibrionaceae*, *Pseudoalteromonadaceae* y *Burkholderiaceae* quienes tuvieron una abundancia relativa de 21,22 y 22% respectivamente al día treinta y cinco; otras de las familias que presentaron este tipo de comportamiento fueron *Vibrionaceae* y *Alteromonadaceae* al día catorce con una abundancia relativa del 39 y 15% respectivamente

Mientras que, la estructura bacteriana en el sedimento fue dominada por las familias *Myoviridae*, *Rhodobacteraceae*, *Prolixibacteraceae* *Flavobacteriaceae* y *Desulfobacteraceae* con 5, 7 y 5, 12 y 10% de abundancia relativa respectivamente (figura 11 y figura 17). Durante el bioensayo algunas familias incrementaron su abundancia relativa de forma considerable, tales como

Alteromonadaceae y *Flavobacteriaceae* con un 21 y 10% de abundancia relativa al día siete, otra familia que tuvo un comportamiento similar fue la familia *Myoviridae* quien incrementó su abundancia relativa en el día veintiuno hasta un 43%, la familia *Vibrionaceae* dominó la microbiota del sedimento en el día catorce con un 36%, mientras que la familia *Alteromonadaceae* mantuvo su abundancia relativa en 23% desde el día catorce y hasta el día treinta y cinco.

En cuanto a las especies predominantes en las muestras control tanto de heces (figura 12) como de sedimento (figura 18) de los organismos *Penaeus vannamei* (camarón control 01 y 13) se puede observar en muestras de contenido intestinal que especies como *Agarivorans gilvus*, *Pseudoalteromonas spongiae*, *Litorilittus sediminis* y *Hanstruepera neustonica* tuvieron dominancia en la microbiota intestinal inicial de los organismos, otras especies que también mostraron dominancia en la microbiota inicial fueron *Deltaproteobacteria bacterium*, *Lewinella sp. W8* e *Hyphomonas sp. Mor2*.

Durante el bioensayo algunas especies incrementaron su abundancia relativa de forma considerable a pesar de no haber sido expuestas a antibióticos, tales especies como *Agarivorans gilvus* y *Vibrio sp. Hep-1b-8* quienes incrementaron su abundancia relativa a 13 y 14% respectivamente para el día catorce de bioensayo, hacia el final del experimento las especies que dominaron la microbiota inicial fueron *Pseudoalteromonas spongiae*, *Agarivorans gilvus*, *Vibrio sp. Hep-1b-8* y *Flavobacteriaceae bacterium UJ101* con abundancias relativas del 15, 15, 16 y 14% respectivamente.

En el caso del comportamiento de las especies en las muestras de sedimento, ejemplos como *Acidobacteria bacterium* y *Chloroflexi bacterium* dominaron la microbiota inicial del sedimento, al igual que otras especies tales como *Agarivorans gilvus*, *Desulfuromonas sp.* Y *Hanstruepera neustonica*, algunas especies tuvieron incrementos considerables en su abundancia relativa en algún momento del bioensayo a pesar de que el sedimento no fue expuesto al tratamiento, por ejemplo, *Agarivorans gilvus* incrementó su abundancia relativa hasta un 13% al día siete y mostró dominancia hasta el día treinta y cinco.

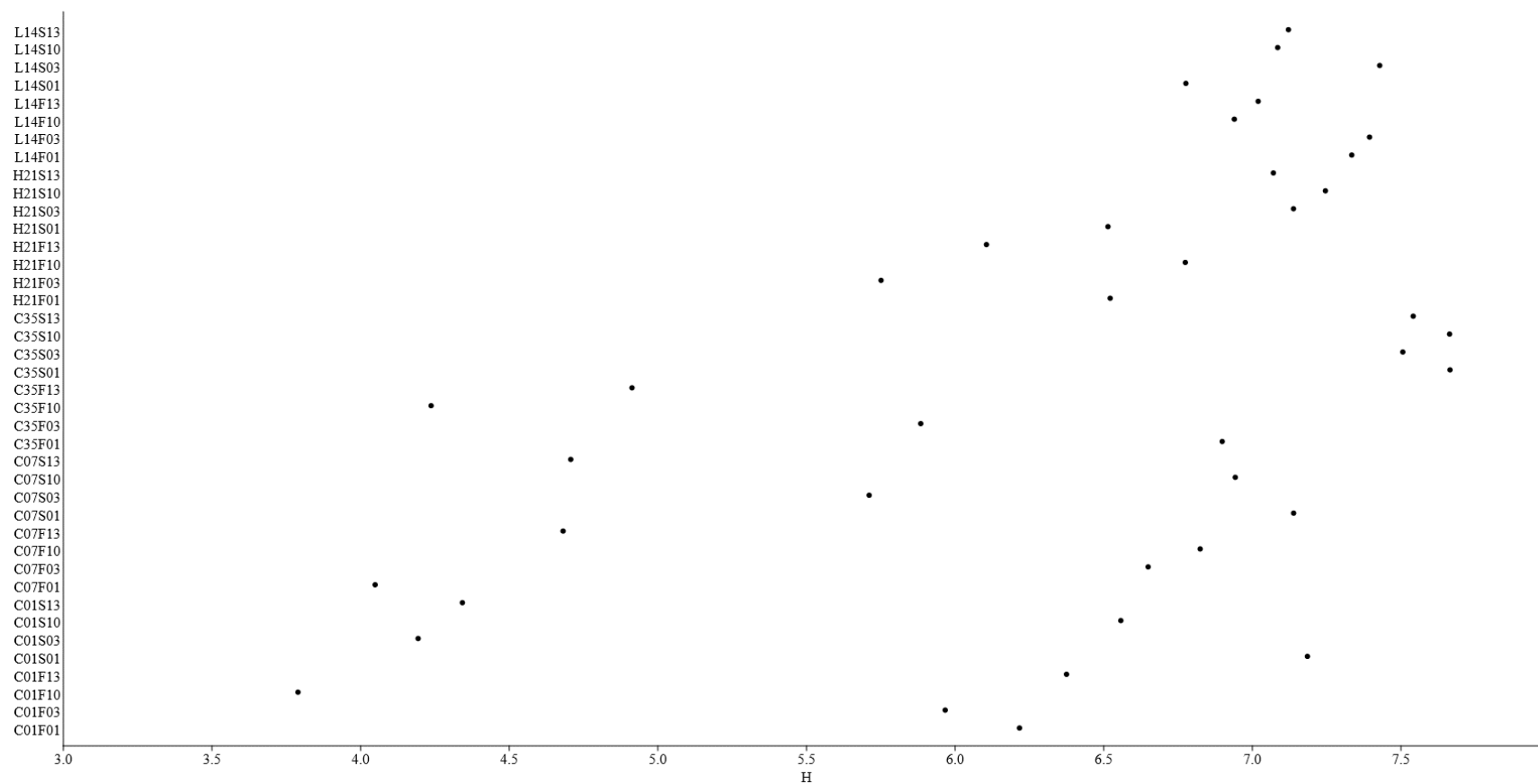


Figura 10. Índices de Shannon de los organismos en muestras de heces y sedimento. El eje vertical indica el valor del índice de diversidad mientras que el eje horizontal las muestras, C= dieta control, H= dieta con alta concentración de OTC, L= dieta con baja concentración de OTC, F= heces, el primer número indica el día de tratamiento y el ultimo el número de organismo (controles= 01 y 13, tratamiento= 03 y 10).

6.6. Organismos expuestos a OTC

Por otra parte, la estructura bacteriana de los organismos expuestos a antibiótico (figura 13 y figura 15) mostró cambios importantes a lo largo del tratamiento, la microbiota intestinal inicial de estos organismos (camarón 03 y camarón 10) fue dominada por familias como *Burkholderiaceae*, *Vibrionaceae* y *Rhodobacteraceae* con un 58, 18 y 10% de abundancia relativa respectivamente, sin embargo en el momento previo a la exposición a oxitetraciclina las familias que dominaron las muestras de contenido intestinal fueron *Vibrionaceae* y *Flavobacteriaceae* con un 44% y 10% de abundancia relativa respectivamente.

Una vez los organismos fueron expuestos al tratamiento con antibiótico las familias que dominaron la microbiota intestinal de *Penaeus vannamei* fueron *Caulobacteraceae* con un 25%, *Alteromonadaceae* con un 16% y *Vibrionaceae* con un 46% de abundancia relativa, sin embargo, algunas otras familias disminuyeron su abundancia relativa tales como *Rubrobacteraceae* y *Desulfobacteraceae* quienes presentaban una abundancia relativa del 7% y al ser expuestas a OTC disminuyeron a menos del 0.2%.

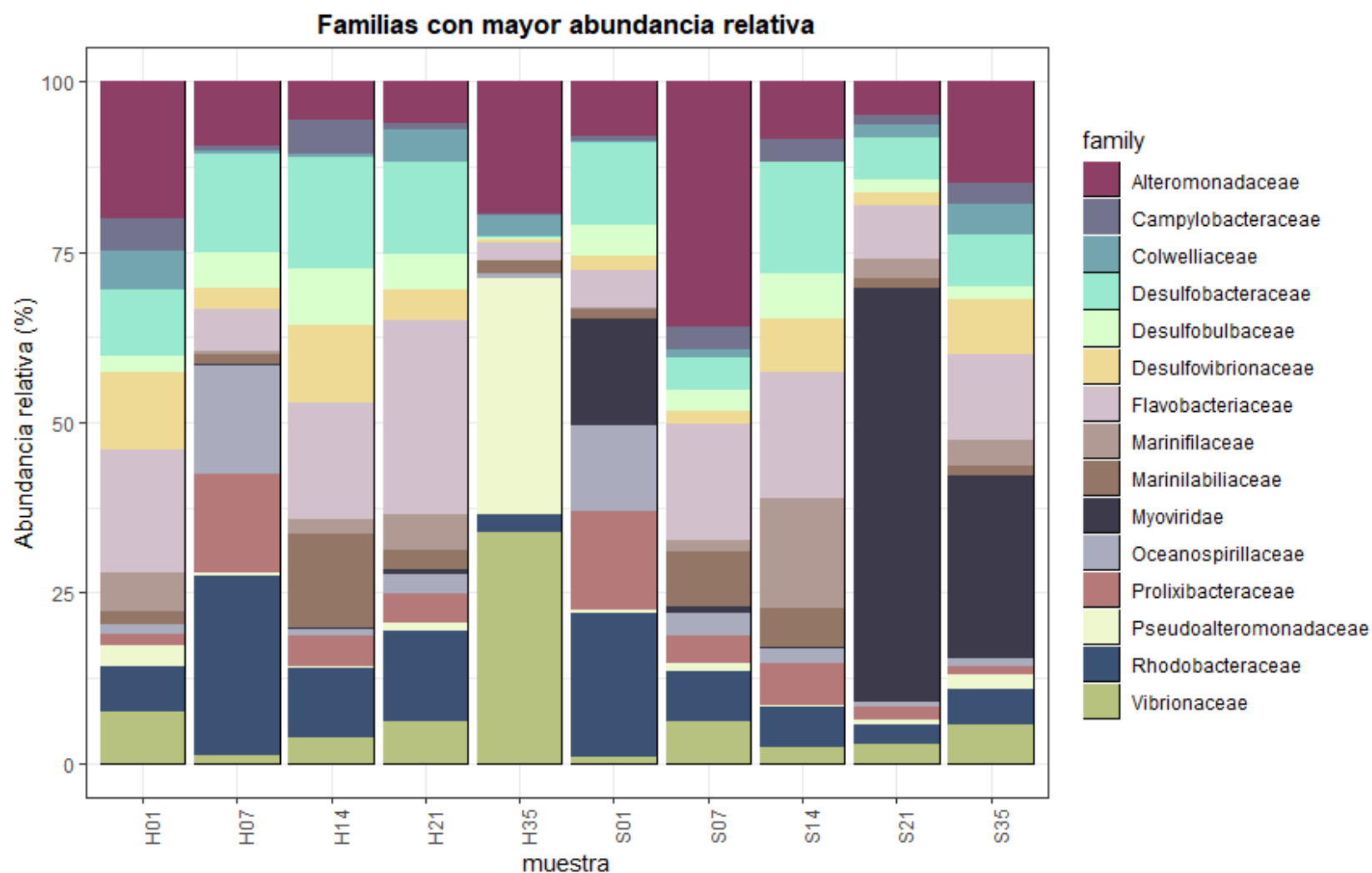


Figura 11. Estructura bacteriana del camarón 01 (control) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento, las muestras indicadas con H corresponden a heces y aquellas representadas con S a sedimento, mientras que el número corresponde al día de tratamiento.

	HC					SC				
Uroviricota; f__Myoviridae_Otu_36680 -	0.021	0.034	0.022	0.21	0	3.355	0.38	0.026	35.116	14.827
Proteobacteria; Agarivorans_gilvus -	8.781	0.004	1.718	1.07	10.623	0.004	13.028	2.968	2.321	7.374
Proteobacteria; Pseudoalteromonas_spongiae -	0.766	0.021	0.008	0.137	15.088	0.017	0.238	0.006	0.22	0.621
Proteobacteria; Deltaproteobacteria_bacterium -	1.175	1.821	1.617	2.218	0.111	1.743	2.6	1.556	0.959	1.054
Bacteroidetes; Bacteroidetes_bacterium -	0.915	1.323	2.318	1.699	0.13	1.305	2.501	1.858	1.357	0.802
Proteobacteria; Vibrio_tubiasii -	1.381	0.003	0.189	0.279	6.861	0.003	0.316	0.202	0.544	1.19
Acidobacteria; Acidobacteria_bacterium -	0.621	2.891	0.633	1.127	0.109	2.705	0.708	0.521	0.482	0.545
Chloroflexi; Chloroflexi_bacterium -	0.749	2.051	0.961	0.849	0.111	1.995	0.737	0.699	0.822	0.626
Planctomycetes; Planctomycetes_bacterium -	0.766	1.453	0.652	2.112	0.189	1.364	0.633	0.494	0.45	0.679
Proteobacteria; Litorilittus_sediminis -	2.582	0.004	0.012	1.183	1.508	0.003	0.09	0.005	0.643	2.347
Proteobacteria; Burkholderia_contaminans -	0.152	0.069	0.007	0.006	8.067	0.046	0.007	0.003	0.002	0.005
Bacteroidetes; Hanstruepera_neustonica -	3.913	0.004	0.02	0.599	0.6	0.003	0.017	0.024	0.017	3.029
Proteobacteria; Gammaproteobacteria_bacterium -	1.293	0.961	0.65	0.945	0.205	0.923	0.57	0.487	0.813	1.111
Bacteroidetes; Carboxylicivirga_sp._N1Y132 -	0.34	0.013	2.721	0.185	0.557	0.014	1.755	0.678	0.27	0.26
Proteobacteria; Vibrio_paraahaemolyticus -	0.63	0.013	0.276	0.324	3.616	0.014	0.242	0.17	0.234	0.479
Bacteroidetes; Marinilabiliaes_bacterium -	0.311	0.163	1.118	0.445	0.014	0.18	0.474	2.615	0.365	0.252
Bacteroidetes; Marinifilum_fragile -	0.999	0.004	0.236	0.524	0.003	0.004	0.18	2.567	0.543	0.766
Proteobacteria; Desulfobacteraceae_bacterium -	0.507	0.728	0.906	0.787	0.024	0.725	0.346	0.746	0.546	0.441
Verrucomicrobia; Verrucomicrobia_bacterium -	0.405	1.11	0.269	0.494	0.062	1.122	0.319	0.295	0.232	0.355
Bacteroidetes; Carboxylicivirga_sp._M1479 -	0.208	0.014	1.648	0.146	0.364	0.015	1.048	0.455	0.191	0.186
	H01	H07	H14	H21	H35	S01	S07	S14	S21	S35

Figura 12. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 01 (control) en las muestras de heces y sedimento, colores naranjas indican una mayor abundancia relativa.

Posterior a la dieta de 2mg de OTC, los organismos fueron alimentados a partir del día catorce y hasta el día veintiuno con la dieta de mayor concentración de oxitetraciclina (15mg/g), algunas de las familias que aumentaron su abundancia relativa en el día veintiuno respecto al día catorce en las muestras de contenido intestinal fueron *Caulobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Alteromonadaceae*, sin embargo otras familias disminuyeron su abundancia como lo fue *Burkholderiaceae* ya que su abundancia relativa disminuyó del 10% antes del tratamiento con una alta concentración de OTC a 1%. Las familias bacterianas que mostraron una recuperación una vez se eliminó la presión de selección por el antibiótico desde el día veintiuno y hasta el día treinta y cinco fueron *Flavobacteriaceae*, *Alteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Rhodobacteraceae*.

Por otra parte, las familias que tuvieron una mayor presencia en las muestras de sedimento inicial fueron *Desulfobacteraceae*, *Myoviridae*, *Prolixibacteraceae* y *Rhodobacteraceae*, para el día siete el cual fue el momento pre exposición a antibiótico se vio dominada por las familias *Alteromonadaceae* y *Vibrionaceae* con un 16 y 10% de abundancia relativa respectivamente, después de esos siete días, el sedimento fue expuesto a los residuos de la primera dieta con antibiótico además de las heces de los organismos, las familias que incrementaron su abundancia relativa pese al tratamiento con antibiótico fueron *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Myoviridae* y *Marinifilaceae*, mientras que otras familias como *Vibrionaceae*, *Alteromonadaceae* y *Marinilabiliaceae* disminuyeron su abundancia relativa.

Posterior a la primera exposición, el sedimento fue expuesto a partir del día catorce y hasta el día veintiuno a la dieta de mayor concentración de OTC (15mg/g), algunas de las familias que disminuyeron su abundancia relativa fueron *Alteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* y *Marinifilaceae*, la familia que tuvo una mayor abundancia relativa en el sedimento durante la exposición a oxitetraciclina fue la familia *Myoviridae* con una abundancia relativa del 85% (Cuadro 11 y Cuadro 12). Las familias que mostraron una recuperación una vez se detuvo la presión de selección del día veintiuno y hasta el día treinta y cinco fueron *Alteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Prolixibacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* y *Desulfovibrionaceae*.

En cuanto a las especies predominantes de contenido intestinal (figura 14 y figura 16) en los camarones con tratamiento se puede observar que especies como *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Burkholderia contaminans*, *Burkholderia cenocepacia* y *Burkholderia lata* predominaron en la microbiota inicial de *Penaeus vannamei*, en el momento justo antes de la

exposición a oxitetraciclina las especies que se encontraron dominando la microbiota intestinal fueron *Vibrio sp.Hep-1b-8* y *Agarivorans gilvus*.

Una vez los organismos fueron expuestos a oxitetraciclina algunas especies como *Brevundimonas nasdae*, *Agarivorans gilvus* y *Vibrio parahaemolyticus* incrementaron su abundancia relativa un 2% sin embargo *Vibrio parahaemolyticus* incrementó su abundancia relativa en un 28%, no obstante, una vez inició la exposición a una concentración mayor de OTC estas especies disminuyeron su abundancia relativa, mientras que por el contrario otras especies incrementaron su abundancia a pesar de la presión de selección, tales como *Bacteroidetes bacterium*, *Chloroflexi bacterium* y *Acidobacteria bacterium*, una de las especies que mostró una recuperación en su abundancia relativa una vez concluyó el tratamiento con oxitetraciclina fue *Agarivorans gilvus*.

Las especies que dominaron las muestras iniciales de sedimento fueron *Deltaproteobacteria bacterium*, *Bacteroidetes bacterium*, *Chloroflexi bacterium* y *Acidobacteria bacterium*, una vez transcurridos los primeros siete días de bioensayo, las especies que dominaron la microbiota del sedimento justo antes de la exposición a OTC fueron *Agarivorans gilvus* y *Litorilutius sediminis*.

Posterior a ello se expuso a las unidades experimentales a una primera concentración de antibiótico donde algunas de las especies que disminuyeron su abundancia relativa fueron *Agarivorans gilvus*, *Litorilutius sediminis* y *Deltaproteobacteria bacterium*, posterior a esta dieta de 2mg de OTC, los organismos fueron alimentados a partir del día catorce y hasta el día veintiuno con la dieta de mayor concentración de oxitetraciclina (15mg/g) una de las especies que tuvo un incremento en su abundancia relativa pese a una concentración mayor de antibiótico fue *Agarivorans gilvus*, las especies que mostraron una recuperación al eliminar la presión de selección fueron *Agarivorans gilvus*, *Deltaproteobacteria bacterium* y *Marinilabiliales bacterium*.

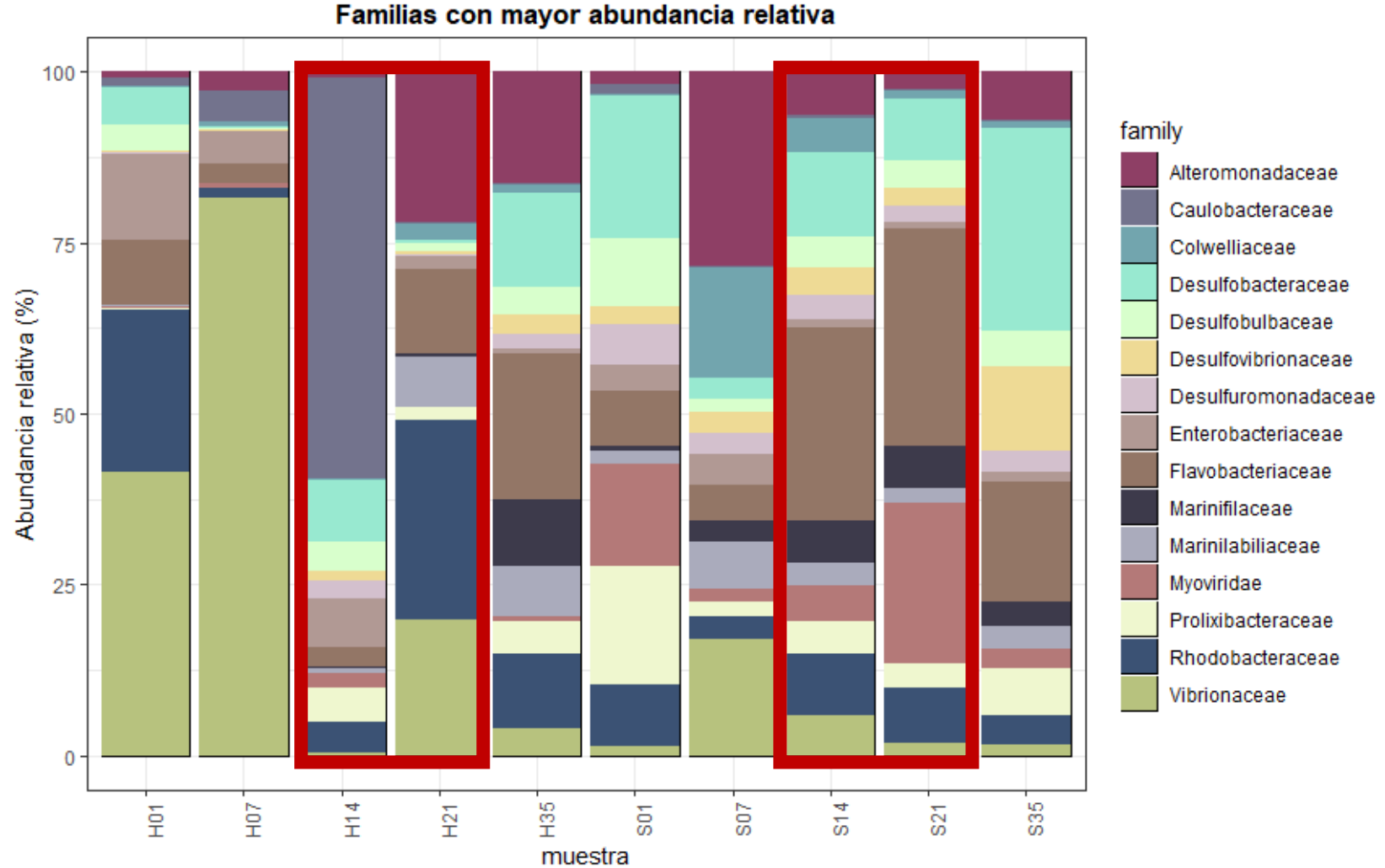


Figura 13. Estructura bacteriana del camarón 03 (expuesto a OTC) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento, las muestras indicadas con H corresponden a heces y aquellas representadas con S a sedimento, mientras que el número corresponde al día de tratamiento. El Cuadro rojo indica el periodo de exposición a OTC.

	HA					SA				
Proteobacteria; Agarivorans_gilvus-	0.055	0.372	0.003	10.546	5.246	0.005	12.546	1.293	0.662	2.058
Proteobacteria; Vibrio_sp._Hep-1b-8-	1.609	17.877	0.001	0.87	0.017	0.001	0.253	0.063	0.012	0.062
Uroviricota; f__Myoviridae_Otu_37365-	0.024	0.295	0.571	0.001	0.184	2.29	0.89	1.661	10.166	1.074
Proteobacteria; Brevundimonas_nasdae-	0.169	1.718	14.475	0.005	0.002	0.012	0.003	0.002	0.003	0.001
Proteobacteria; Deltaproteobacteria_bacterium-	0.921	0.098	1.688	0.241	1.599	2.082	1.017	1.923	1.652	2.048
Bacteroidetes; Bacteroidetes_bacterium-	0.347	0.135	1.228	0.479	2.88	1.826	1.054	1.82	1.455	1.69
Proteobacteria; Litorilittus_sediminis-	0.038	0.122	0.001	0.997	0.312	0.003	7.535	1.36	0.403	0.11
Proteobacteria; Vibrio_parahaemolyticus-	3.328	2.851	0.01	2.685	0.663	0.016	0.49	0.29	0.216	0.068
Chloroflexi; Chloroflexi_bacterium-	0.65	0.075	1.936	0.239	1.5	2.384	0.666	0.896	0.94	1.002
Acidobacteria; Acidobacteria_bacterium-	0.698	0.258	2.332	0.346	0.802	2.662	0.73	0.966	0.744	0.712
Proteobacteria; Photobacterium_damselae-	3.395	6.555	0.001	0.033	0.007	0.002	0.037	0.012	0.005	0.003
Planctomycetes; Planctomycetes_bacterium-	1.082	0.112	1.185	0.78	0.758	1.357	0.448	1.674	0.808	0.677
Proteobacteria; Vibrio_tubiasii-	0.032	1.757	0.001	2.81	0.116	0.001	2.158	0.307	0.086	0.083
Actinobacteria; Rubrobacter_xylanophilus-	1.044	5.552	0.011	0.687	0.005	0.012	0.008	0.005	0.004	0.004
Proteobacteria; Gammaproteobacteria_bacterium-	0.427	0.242	0.621	0.409	0.831	0.746	0.42	0.867	0.756	0.829
Proteobacteria; Desulfobacteraceae_bacterium-	0.271	0.01	0.702	0.054	0.852	1.002	0.338	0.787	0.834	1.234
Bacteroidetes; Marinilabiales_bacterium-	0.013	0.006	0.153	0.072	1.381	0.235	0.728	0.611	0.479	2.132
Bacteroidetes; Hanstruepera_neustonica-	0.001	0.002	0.001	1.547	0.034	0.003	0.012	0.653	2.804	0.686
Actinobacteria; Illumatobacter_fluminis-	0.158	0.024	0.022	3.639	0.115	0.018	0.031	0.759	0.676	0.274
Proteobacteria; Vibrio_atypicus-	4.594	0.367	0.003	0.032	0.004	0.006	0.316	0.028	0.011	0.003
	H01	H07	H14	H21	H35	S01	S07	S14	S21	S35

Figura 14. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 03 (expuesto a OTC) en las muestras de heces y sedimento, colores naranjas indican una mayor abundancia relativa.

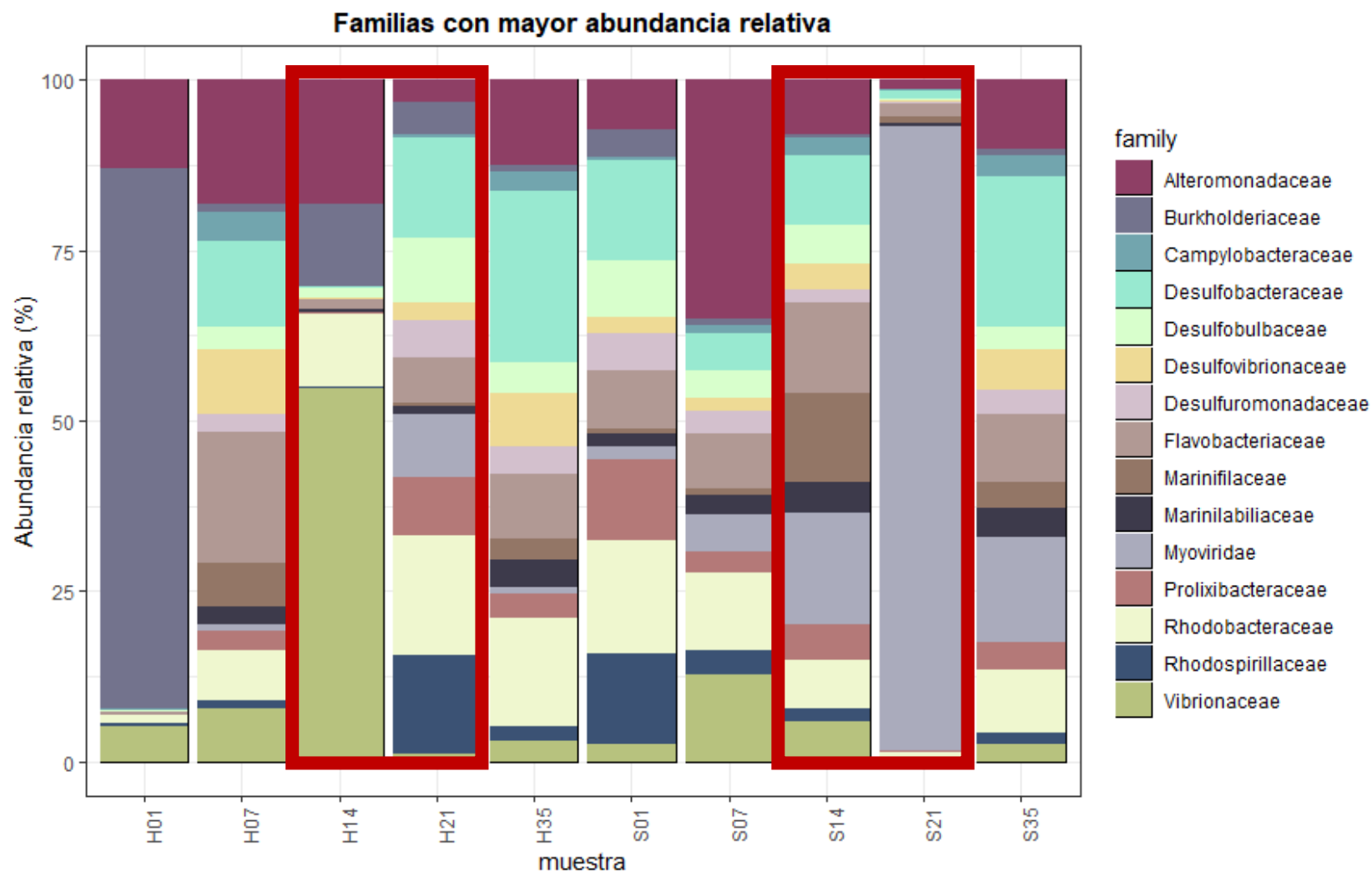


Figura 15. Estructura bacteriana del camarón 10 (expuesto a OTC) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento, las muestras indicadas con H corresponden a heces y aquellas representadas con sedimento, el número corresponde al día de tratamiento.

	Heces con antibiótico					Sedimento con antibiótico				
Uroviricota; f__Myoviridae_Otu_36937 -	0	0.402	0.004	1.279	0.248	0.288	1.85	6.739	80.648	5.067
Proteobacteria; Agarivorans_gilvus -	0.015	6.474	13.125	0.003	3.066	0.617	9.231	2.273	1.005	2.832
Proteobacteria; Burkholderia_contaminans -	20.881	0.101	3.463	0.056	0.009	0.024	0.016	0.006	0.001	0.003
Proteobacteria; Vibrio_parahaemolyticus -	0.269	0.534	21.929	0.012	0.182	0.114	0.508	0.696	0.143	0.168
Proteobacteria; Deltaproteobacteria_bacterium -	0.06	1.341	0.143	1.979	3.611	2.081	3.014	1.662	0.302	2.665
Bacteroidetes; Bacteroidetes_bacterium -	0.043	1.426	0.124	1.07	1.869	1.324	1.878	2.637	0.574	2.038
Acidobacteria; Acidobacteria_bacterium -	0.126	0.684	0.165	3.397	1.084	3.439	1.264	0.713	0.147	0.86
Chloroflexi; Chloroflexi_bacterium -	0.083	0.975	0.391	2.189	1.687	2.221	1.228	0.856	0.271	1.753
Proteobacteria; Burkholderia_cenocepacia -	8.998	0.04	1.575	0.029	0.007	0.012	0.01	0.004	0.001	0.004
Planctomycetes; Planctomycetes_bacterium -	0.045	0.786	0.373	1.525	1.026	1.474	0.809	0.601	0.131	0.784
Proteobacteria; Gammaproteobacteria_bacterium -	0.104	1.266	0.147	1.108	1.16	1.146	0.74	0.56	0.153	1.003
Proteobacteria; Vibrio_tubiasii -	0.015	1.189	3.66	0	0.135	0.018	0.962	0.269	0.025	0.133
Proteobacteria; Burkholderia_lata -	5.13	0.025	0.87	0.013	0.003	0.007	0.004	0.002	0.001	0.002
Proteobacteria; Desulfobacteraceae_bacterium -	0.004	0.638	0.04	0.591	1.124	0.652	0.452	0.669	0.16	1.056
Proteobacteria; Brevundimonas_nasdae -	0.013	0.002	0.072	5.053	0.004	0.007	0.009	0.004	0	0.001
Verrucomicrobia; Verrucomicrobia_bacterium -	0.047	0.386	0.112	1.129	0.469	1.174	0.48	0.329	0.072	0.378
Proteobacteria; Alteromonas_marina -	3.934	0	0.005	0.009	0	0.009	0.324	0.045	0	0.001
Proteobacteria; Burkholderia_cepacia -	3.525	0.012	0.578	0.013	0.005	0.006	0.007	0.002	0.001	0.004
Bacteroidetes; Marinifilum_fragile -	0	0.91	0.007	0.004	0.286	0.013	0.103	1.894	0.266	0.415
Bacteroidetes; Marinilabiales_bacterium -	0.002	0.413	0.011	0.109	0.633	0.163	0.541	0.594	0.277	0.837
	H01	H07	H14	H21	H35	S01	S07	S14	S21	S35

Figura 16. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 10 (expuesto a OTC) en las muestras de heces y sedimento, colores naranjas indican una mayor abundancia relativa

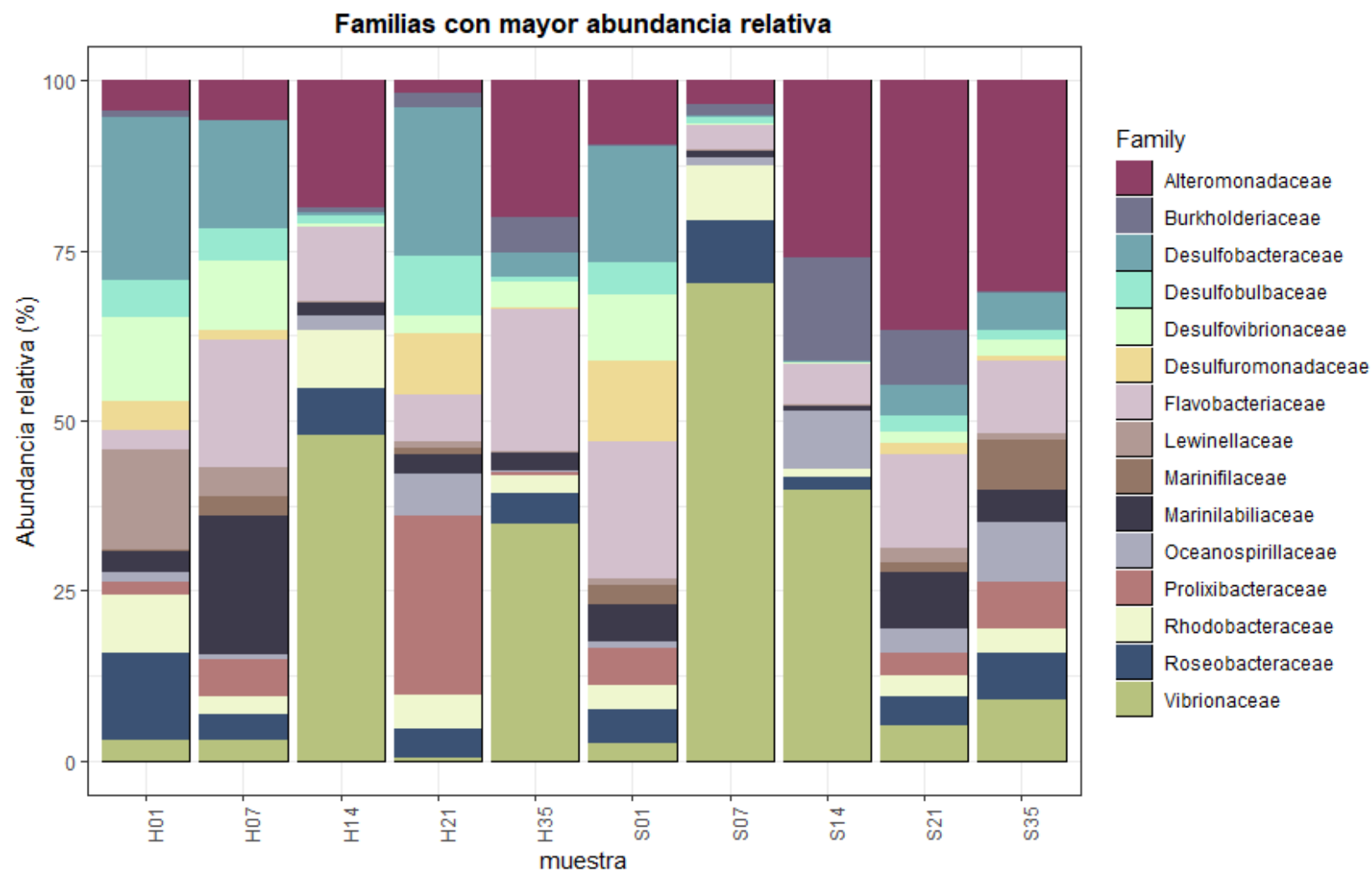


Figura 17. Estructura bacteriana del camarón 13 (control) representada por las 15 familias con mayor abundancia relativa en las muestras de heces y sedimento, las muestras indicadas con H corresponden a heces y aquellas representadas con sedimento, el número corresponde al día de tratamiento.

	Heces control					Sedimento control				
Proteobacteria; Agarivorans_gilvus	1.162	2.46	13.644	0.006	14.613	3.915	2.561	19.138	15.531	13.107
Proteobacteria; Vibrio_sp._Hep-1b-8	0.081	0.048	14.047	0	15.868	0.033	22.811	10.044	0.24	0.377
Bacteroidetes; Flavobacteriaceae_bacterium_UJ101	0.002	0.019	7.735	0.005	13.55	0.012	1.672	3.23	0.025	0.017
Proteobacteria; Vibrio_paraheamolyticus	0.237	0.327	6.811	0.011	2.133	0.27	7.297	2.489	0.206	1.147
5226; 6235	0	0	0	3.695	2.633	0	0	4.875	2.181	4.795
Proteobacteria; Vibrio_sp._B1FLJ16	0.183	0.198	5.306	0	0.042	0.022	6.935	2.377	0.158	0.008
Bacteroidetes; Bacteroidetes_bacterium	1.435	2.409	0.527	2.339	0.202	1.13	0.197	0.221	1.889	4.449
Proteobacteria; Deltaproteobacteria_bacterium	2.805	1.314	0.102	2.381	0.287	1.323	0.111	0.329	2.444	0.84
Proteobacteria; Burkholderia_contaminans	0.094	0.003	0.037	0.014	1.686	0.023	0.504	5.552	2.029	0.036
Proteobacteria; Oleiphilus_messinensis	0.914	2.213	0.86	0.008	0.677	1.108	0.369	0.188	0.551	0.579
Chloroflexi; Chloroflexi_bacterium	1.46	0.829	0.117	2.474	0.106	0.697	0.146	0.075	0.7	0.382
Proteobacteria; Gammaproteobacteria_bacterium	1.094	0.538	0.104	1.077	0.823	1.813	0.148	0.066	0.55	0.337
Proteobacteria; Vibrio_tubiasii	0.155	0.282	1.018	0.003	0.229	0.048	1.634	1.455	0.385	1.306
Bacteroidetes; Carboxylicivirga_linearis	0.085	1.401	0.152	0.043	1.605	0.717	0.056	0.142	1.019	1.123
Acidobacteria; Acidobacteria_bacterium	1.014	0.383	0.08	3.383	0.094	0.428	0.07	0.058	0.558	0.252
Planctomycetes; Planctomycetes_bacterium	1.293	0.494	0.375	1.188	0.303	0.878	0.376	0.144	0.639	0.335
Bacteroidetes; Lewinella_sp._W8	4.492	0.755	0.011	0.004	0.013	0.034	0.117	0.174	0.383	0.015
Proteobacteria; Desulfuromonas_sp.	0.505	0.153	0.009	0.366	0.087	4.26	0.009	0.017	0.255	0.135
Bacteroidetes; Carboxylicivirga_sediminis	0.369	2.544	0.772	0.011	0.077	0.442	0.226	0.121	0.988	0.231
Proteobacteria; Oceanospirillum_sp._D5	0.01	0.006	0	0.013	0.006	0.007	0.004	4.617	0.361	0.325
	H01	H07	H14	H21	H35	S01	S07	S14	S21	S35

Figura 18. Especies con mayor abundancia relativa del camarón 13 (control) en las muestras de heces y sedimento, colores naranjas indican una mayor abundancia relativa.

6.7. Genes de Resistencia a Tetraciclinas y Otros Genes de Resistencia Antibiótica

El análisis de los genes de resistencia a tetraciclinas se llevó a cabo en la plataforma de Anvio 7 (figura 21), en ella se identificaron cinco tipos de genes *tet* (*tetA*, *tetR*, *tet35*, *tetM* y *tetC*) presentes en diferentes abundancias relativas a lo largo del tratamiento, también se identificaron genes de resistencia en microorganismos que no fueron expuestos a oxitetraciclina.

6.7.1. Organismos Control

Los organismos control de *Penaeus vannamei* presentaron genes de resistencia en la microbiota inicial (Figura 19 y Figura 22) siendo uno de los genes de resistencia a tetraciclinas con mayor presencia el gen *tet35* con una abundancia relativa del 0.22% respecto a los genes totales identificados (Figura 19), en el caso de las muestras de sedimento de los sistemas control no se encontraron genes de resistencia a tetraciclinas, sin embargo, para el día siete aumentó la abundancia relativa de los genes *tetA*, *tetR*, *tet35* y *tetC*, para el muestreo del día catorce se encontraron los genes *tetM* y *tetR*, siendo *tetR* gen con mayor abundancia en ese momento en las muestras de sedimento con una abundancia relativa del 0.6% (Figura 23). Algunas de las especies en las que se identificaron genes de resistencia en organismos control fueron *Agarivorans gilvus* y *Burkholderia cepacia*.

Las especies en las que se identificaron genes de resistencia a tetraciclinas en ambas matrices (heces y sedimento) fueron *Pseudodesulfovibrio piezophilus*, *Agarivorans gilvus*, *Pseudoalteromonas spongiae* y *Bacteroides coprosuis*, la presencia del gen *tet35* fue identificada en las especies *Pseudoalteromonas spongiae*, *Pseudodesulfovibrio piezophilus* y *Agarivorans gilvus* mientras que en *Bacteroides coprosuis* se identificó el gen *tetM*.

Línea del tiempo de abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas en muestras de heces de *Penaeus vannamei*

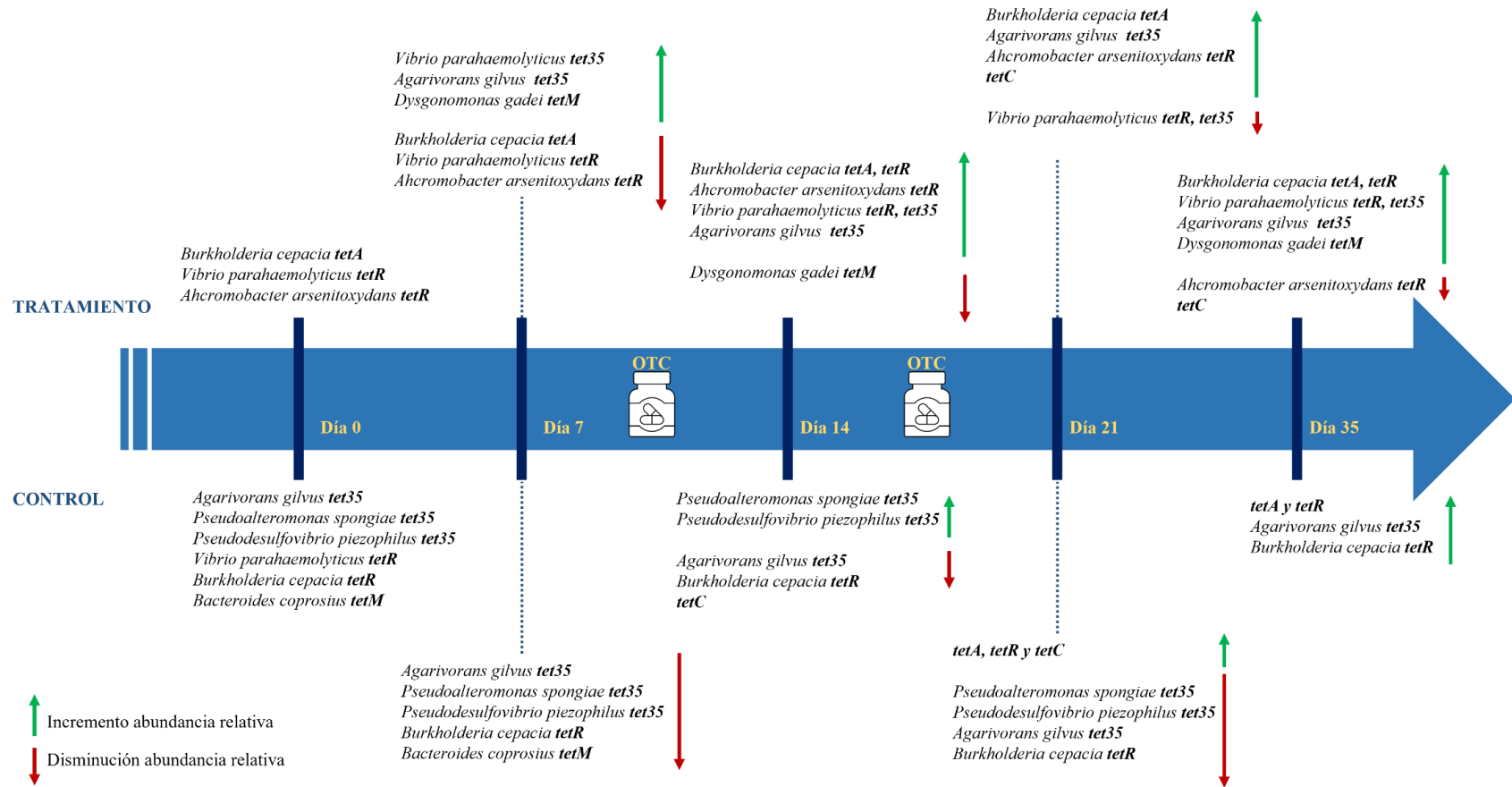


Figura 19. Línea del tiempo de abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas en muestras de heces de *Penaeus vannamei*.

Línea del tiempo de abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas en muestras de sedimento con organismos *Penaeus vannamei*

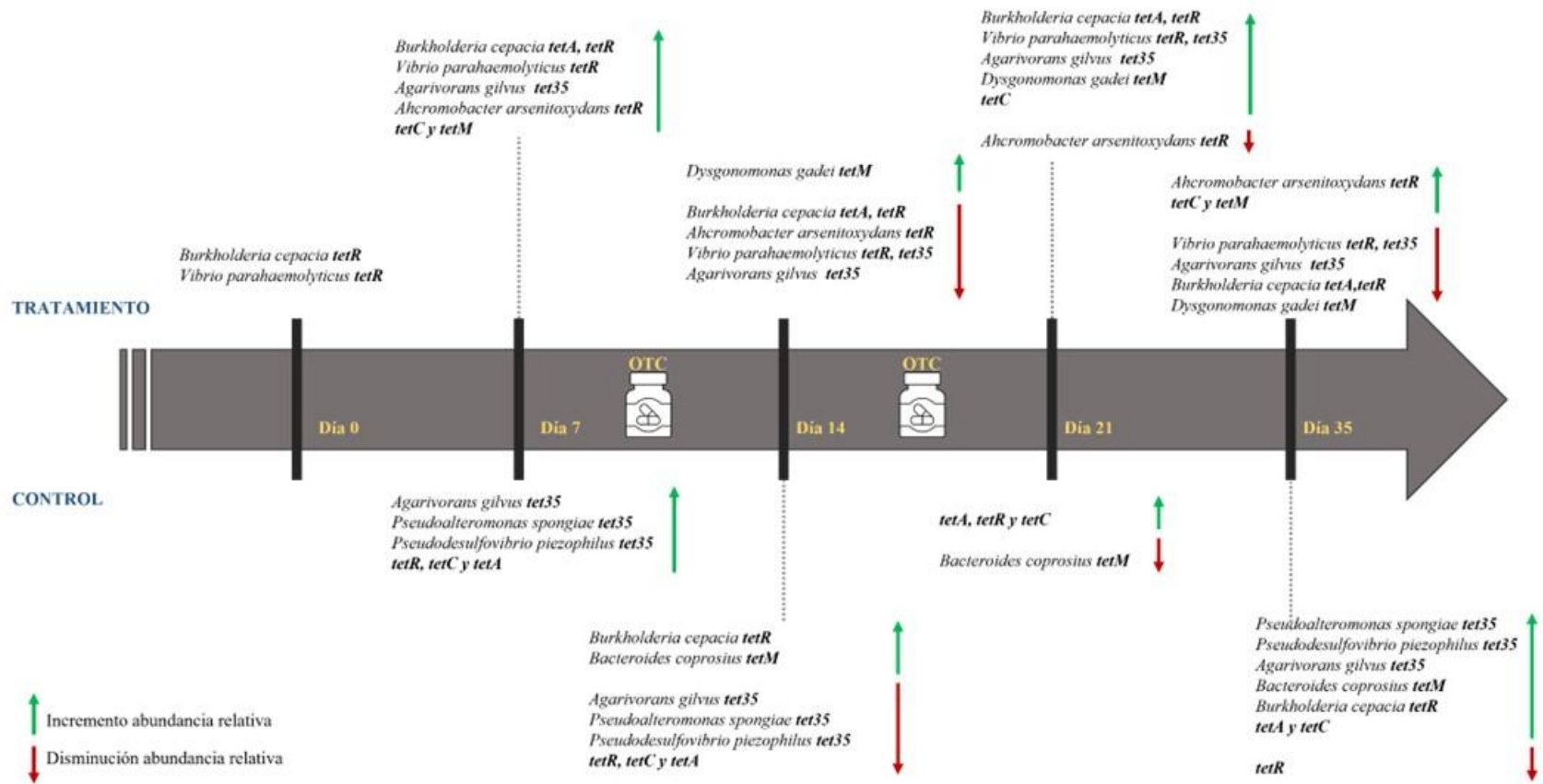


Figura 20. Línea del tiempo de abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas en muestras de sedimento de *Penaeus vannamei*

6.7.2. Organismos Expuestos a OTC

En cuanto a las unidades experimentales expuestas a oxitetraciclina se encontraron genes de resistencia a tetraciclinas en la microbiota intestinal inicial (Figura 19 y Figura 22), en el caso de las muestras de heces se encontraron los genes *tetA* y *tetR* con una abundancia relativa del 0.12 y 0.11% respectivamente, para el momento justo antes de aplicar el primer tratamiento con OTC; una vez aplicado el antibiótico se identificaron solamente dos genes de resistencia *tetA* y *tetR* los cuales aumentaron su abundancia relativa a 0.15 y 0.19% respectivamente, una vez que terminó la exposición de siete días de la dieta con 2mg/g de OTC inició la administración del alimento de mayor contenido de OTC, para este punto los genes *tetA* y *tetR* incrementaron aún más su abundancia a 0.28 y 0.27% respectivamente, sin embargo el gen que se encontró en mayor abundancia fue el gen *tetC* con una abundancia relativa del 0.3%, también se identificó el gen *tet35* con una abundancia del 0.2%.

Después de la exposición al antibiótico se tuvo un tiempo de recuperación donde los organismos no fueron expuestos a oxitetraciclina, una vez retirado el antibiótico del sistema, las abundancias relativas de todos los genes de resistencia a tetraciclinas disminuyeron y solamente el gen *tetM* aumentó su abundancia de 0 a 0.1% de abundancia al día treinta y cinco, siendo el único momento donde se identificó este gen de resistencia; en cuanto a las especies identificadas como resistentes a tetraciclinas en muestras de contenido intestinal se encontró el gen *tetA* en *Burkholderia cepacia*, el gen *tet35* en *Agarivorans gilvus* y el gen *tetR* en *Achromobacter arsenitoxydans*.

Por otro lado, en las muestras de sedimento (figura 19) no se encontraron genes de resistencia a tetraciclinas en el momento inicial del bioensayo, sin embargo, si se encontraron genes en el día siete, justo antes de iniciar el tratamiento con oxitetraciclina, se identificaron los genes *tetA*, *tet35*, *tetM*, *tetR* y *tetC* (figura 20), una vez que transcurrió la exposición con la dieta de menor concentración, la abundancia de todos los genes de resistencia disminuyó, posteriormente el sedimento fue expuesto a la dieta con mayor concentración de antibiótico (figura 21), en este sistema todas los genes de resistencia disminuyeron aún más su abundancia relativa.

En el caso de las muestras iniciales de sedimento (figura 19) se encontró solamente el gen *tetR*, sin embargo para el día siete justo antes de iniciar la exposición a OTC los genes *tetA*, *tetR*, *tet35* y *tetC* incrementaron su abundancia, al día catorce una vez terminó la exposición a la concentración

menor de oxitetraciclina todos los genes de resistencia a tetraciclinas tuvieron una disminución en su abundancia relativa a excepción del gen *tetM* el cual tuvo una abundancia relativa del 0.2%, posteriormente se administró la dieta de mayor presencia de antibiótico, en este punto todos los genes de resistencia a tetraciclinas identificados aumentaron su abundancia, una vez retirada la presión de selección la abundancia relativa de todos los genes disminuyó.

No es necesario encontrar una gran cantidad de genes de resistencia a tetraciclinas para que los microorganismos sean tolerantes al antibiótico, basta con la presencia de algunos cuantos como los genes *tet35*, *tetR*, *tetM* etc. (Jahanthig, *et al.*, 2020; Miranda, *et al.*, 2002). Para que las especies sean capaces de tolerar altas concentraciones del antibiótico.

Cuadro 9. Valores abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo control (01).

Heces					
Familia	C01F01	C07F01	L14F01	H21F01	C35F01
<i>Alteromonadaceae</i>	12.6	2.9	3.1	2.6	12.4
<i>Flavobacteriaceae</i>	11.3	1.9	9.5	12.1	1.7
<i>Myoviridae</i>	0	0.1	0.1	0.3	0
<i>Desulfobacteraceae</i>	6	4.4	9.2	5.7	0.1
<i>Rhodobacteraceae</i>	4.2	8	5.6	5.6	1.7
<i>Vibrionaceae</i>	4.7	0.3	2.1	2.6	21.6
<i>Desulfovibrionaceae</i>	7	0.9	6.3	1.9	0.2
<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	1.9	0.2	0.2	0.5	22
<i>Burkholderiaceae</i>	0.7	1	0.3	0.5	21.8
<i>Prolixibacteraceae</i>	1.1	4.4	2.6	1.8	0.1
<i>Marinifilaceae</i>	3.6	0.1	1.2	2.2	0
<i>Marinilabiliaceae</i>	1.2	0.4	7.7	1.2	1.2
<i>Desulfobulbaceae</i>	1.5	1.6	4.6	2.2	0.2
<i>Oceanospirillaceae</i>	0.8	4.9	0.6	1.1	0.4

Sedimento					
Familia	C01S01	C07S01	L14S01	H21S01	C35S01
<i>Alteromonadaceae</i>	2.8	21.3	5.3	3.5	10.1
<i>Flavobacteriaceae</i>	1.9	10.2	11.6	5.6	8.4
<i>Myoviridae</i>	5.5	0.5	0.1	43.3	18.3
<i>Desulfobacteraceae</i>	4.3	2.8	10.2	4.6	5.2
<i>Rhodobacteraceae</i>	7.4	4.3	3.7	2.2	3.5
<i>Vibrionaceae</i>	0.3	3.7	1.5	1.9	3.8
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.8	1.2	4.9	1.2	5.6
<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	0.1	0.7	0.1	0.5	1.5
<i>Burkholderiaceae</i>	0.9	0.3	0.3	0.2	0.3
<i>Prolixibacteraceae</i>	5.2	2.4	3.9	1.3	0.8
<i>Marinifilaceae</i>	0.1	0.9	10.2	1.9	2.7
<i>Marinilabiliaceae</i>	0.5	4.8	3.6	1	0.9
<i>Desulfobulbaceae</i>	1.5	1.7	4.2	1.3	1.2
<i>Oceanospirillaceae</i>	4.4	2.1	1.4	0.5	0.8

Cuadro 10. Valores abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo control (13).

Heces					
Family	C01F13	C07F13	L14F13	H21F13	C35F13
<i>Vibrionaceae</i>	1.7	2	39.2	0.2	29.6
<i>Alteromonadaceae</i>	2.5	3.8	15.4	0.6	17.2
<i>Flavobacteriaceae</i>	1.5	12.4	8.9	2.2	17.8
<i>Desulfobacteraceae</i>	13	10.4	0.3	6.9	3.1
<i>Roseobacteraceae</i>	7	2.5	5.7	1.4	3.7
<i>Marinilabiliaceae</i>	1.6	13.4	1.6	0.9	2.2
<i>Rhodobacteraceae</i>	4.7	1.7	6.9	1.6	2.4
<i>Burkholderiaceae</i>	0.5	0.1	0.6	0.7	4.3
<i>Desulfovibrionaceae</i>	6.7	6.6	0.3	0.8	3.1
<i>Prolixibacteraceae</i>	1	3.6	0	8.3	0.3
<i>Oceanospirillaceae</i>	0.8	0.5	1.7	2	0.3
<i>Desulfobulbaceae</i>	3	3.1	1	2.8	0.6
<i>Desulfuromonadaceae</i>	2.3	0.9	0	2.9	0.2
<i>Lewinellaceae</i>	8	2.7	0.2	0.3	0.1
Sedimento					
Family	C01S13	C07S13	L14S13	H21S13	C35S13
<i>Vibrionaceae</i>	1.6	59.6	36.4	3.5	6.8
<i>Alteromonadaceae</i>	5.8	2.9	23.8	24.2	23.6
<i>Flavobacteriaceae</i>	12.4	3.1	5.4	9	8.1
<i>Desulfobacteraceae</i>	10.4	0.2	0.1	3	4
<i>Roseobacteraceae</i>	3.1	7.8	1.7	2.8	5.2
<i>Marinilabiliaceae</i>	3.2	0.7	0.6	5.6	3.5
<i>Rhodobacteraceae</i>	2.2	6.7	1.1	2	2.7
<i>Burkholderiaceae</i>	0.2	1.5	13.8	5.4	0.1
<i>Desulfovibrionaceae</i>	5.9	0.1	0.1	1.1	1.9
<i>Prolixibacteraceae</i>	3.4	0.1	0.1	2.3	5.2
<i>Oceanospirillaceae</i>	0.6	1.1	7.8	2.3	6.7
<i>Desulfobulbaceae</i>	2.9	0.8	0.1	1.5	1.1
<i>Desulfuromonadaceae</i>	7.3	0	0	1.1	0.5
<i>Lewinellaceae</i>	0.6	0.2	0.3	1.5	0.7

Cuadro 11. Valores abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo con tratamiento de OTC (03).

Heces					
Familia	C01F03	C07F03	L14F03	H21F03	C35F03
<i>Vibrionaceae</i>	18.5	44.4	0.2	11.8	2.1
<i>Flavobacteriaceae</i>	4.2	1.5	1.3	7.4	11.6
<i>Rhodobacteraceae</i>	10.6	0.8	2	17.2	5.9
<i>Alteromonadaceae</i>	0.4	1.5	0.4	13	8.8
<i>Desulfobacteraceae</i>	2.5	0.1	3.9	0.4	7.3
<i>Caulobacteraceae</i>	0.5	2.4	25.2	0.2	0.2
<i>Myoviridae</i>	0.1	0.4	0.9	0	0.3
<i>Burkholderiaceae</i>	9.7	3.2	2	5.1	0.5
<i>Prolixibacteraceae</i>	0.1	0	2.1	1.2	2.7
<i>Enterobacteriaceae</i>	5.6	2.6	3	1.1	0.3
<i>Desulfobulbaceae</i>	1.6	0.2	1.9	0.6	2.3
<i>Marinilabiliaceae</i>	0	0	0.3	4.3	4.1
<i>Marinifilaceae</i>	0	0	0.1	0.3	5.3
<i>Colwelliaceae</i>	0.1	0.5	0.1	1.3	0.7

Sedimento					
Familia	C01S03	C07S03	L14S03	H21S03	C35S03
<i>Vibrionaceae</i>	0.41	10.11	2.61	1.11	0.92
<i>Flavobacteriaceae</i>	2.32	3.06	12.76	18.37	9.26
<i>Rhodobacteraceae</i>	2.54	1.92	4.07	4.63	2.24
<i>Alteromonadaceae</i>	0.52	16.88	2.88	1.46	3.78
<i>Desulfobacteraceae</i>	6	1.82	5.54	5.29	15.69
<i>Caulobacteraceae</i>	0.39	0.12	0.19	0.14	0.13
<i>Myoviridae</i>	4.27	1.09	2.41	13.65	1.6
<i>Burkholderiaceae</i>	0.91	0.79	0.44	0.33	0.4
<i>Prolixibacteraceae</i>	5	1.37	2.17	2.05	3.57
<i>Enterobacteriaceae</i>	1.07	2.75	0.53	0.57	0.71
<i>Desulfobulbaceae</i>	2.85	1.14	2.07	2.37	2.85
<i>Marinilabiliaceae</i>	0.56	4.12	1.45	1.27	1.74
<i>Marinifilaceae</i>	0.19	1.78	2.78	3.62	1.9
<i>Colwelliaceae</i>	0.08	9.62	2.24	0.67	0.43

Cuadro 12. Valores abundancia relativa de las familias más representativas de cada muestra (%) en organismo con tratamiento de OTC (10)

Heces					
Familia	C01F10	C07F10	L14F10	H21F10	C35F10
<i>Myoviridae</i>	0	0.6	0	2.2	0.4
<i>Burkholderiaceae</i>	57.9	0.6	10.1	1.1	0.5
<i>Alteromonadaceae</i>	9.6	9.9	15.2	0.7	5.7
<i>Vibrionaceae</i>	3.7	4.2	45.7	0.3	1.3
<i>Desulfobacteraceae</i>	0.1	6.8	0.2	3.5	11.5
<i>Rhodobacteraceae</i>	0.8	3.9	9.1	4.1	7.3
<i>Flavobacteriaceae</i>	0.4	10.5	1.1	1.6	4.3
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0	5.1	0.2	0.6	3.6
<i>Desulfobulbaceae</i>	0	1.8	1.1	2.2	2
<i>Marinifilaceae</i>	0	3.5	0	0.1	1.4
<i>Prolixibacteraceae</i>	0	1.6	0.1	2	1.6
<i>Rhodospirillaceae</i>	0.4	0.7	0.2	3.4	1
<i>Caulobacteraceae</i>	0.2	0.1	0.2	10	0.2
<i>Marinilabiliaceae</i>	0	1.4	0.3	0.3	1.8

Sedimento					
Familia	C01S10	C07S10	L14S10	H21S10	C35S10
<i>Myoviridae</i>	0.5	2.6	9.4	85.6	7.7
<i>Burkholderiaceae</i>	1.1	0.5	0.3	0.1	0.4
<i>Alteromonadaceae</i>	2	16.3	4.5	1.2	5.1
<i>Vibrionaceae</i>	0.7	6	3.4	0.3	1.3
<i>Desulfobacteraceae</i>	4	2.6	5.9	1	10.9
<i>Rhodobacteraceae</i>	4.6	5.3	4	0.8	4.6
<i>Flavobacteriaceae</i>	2.3	3.7	7.6	1.7	4.9
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.7	0.9	2.1	0.2	3
<i>Desulfobulbaceae</i>	2.2	1.8	3.2	0.3	1.7
<i>Marinifilaceae</i>	0.2	0.5	7.3	0.8	2
<i>Prolixibacteraceae</i>	3.2	1.4	3	0.4	2
<i>Rhodospirillaceae</i>	3.6	1.6	1.1	0.1	0.8
<i>Caulobacteraceae</i>	0.6	0.2	0.1	0	0.2
<i>Marinilabiliaceae</i>	0.5	1.3	2.6	0.6	2.1

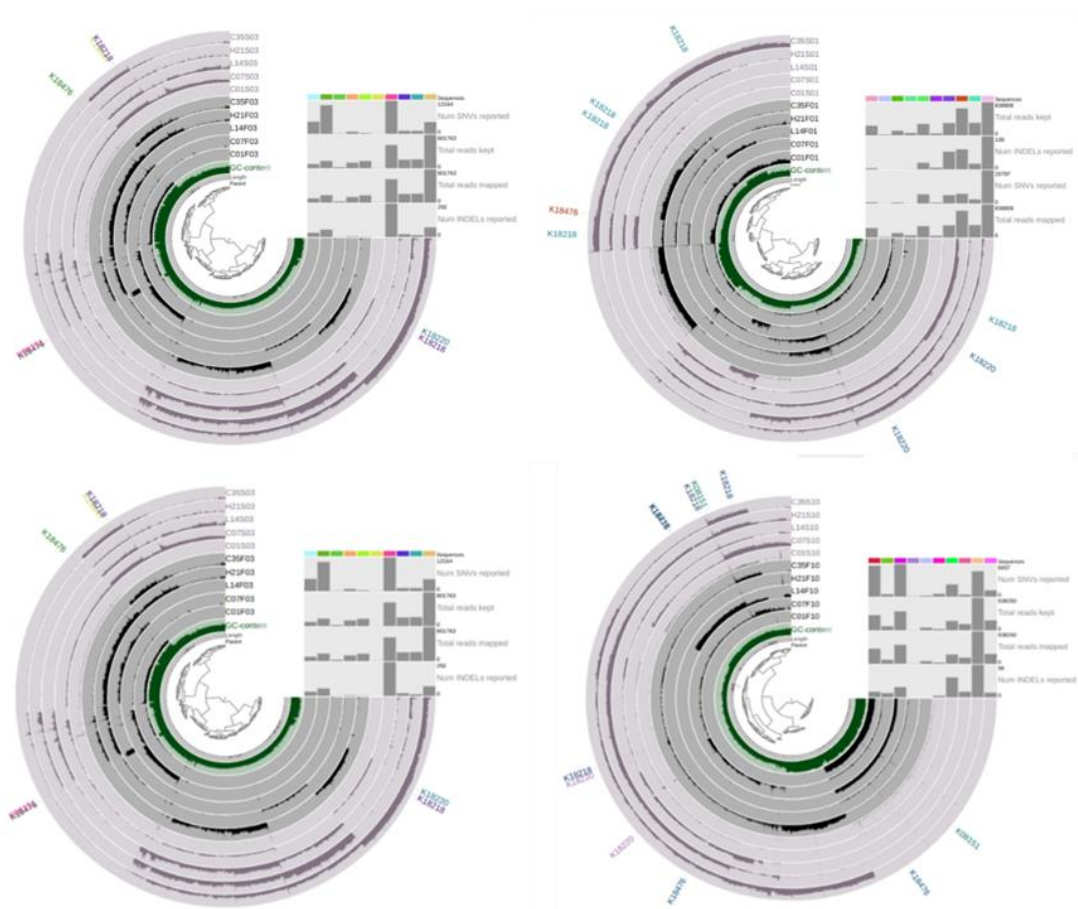


Figura 21. Imagen virtual extraída de Anvio7 donde se encuentran indicados los splits con los números KO (Kegg) correspondientes a los genes de resistencia a tetraciclina y oxitetraciclina en las diferentes muestras de heces y sedimento de uno de los organismos.

Dentro de las especies identificadas con presencia de genes de resistencia a tetraciclinas en esta unidad experimental se encuentran *Burkholderia cepacia* con los genes *tetA* y *tetR*, *Vibrio parahaemolyticus* con los genes *tetR* y *tet35*, *Agarivorans gilvus* con el gen *tet35* y *Dysgonomonas gadei* con el gen *tetM*.

Cuadro 13. Especies identificadas con genes de resistencia a tetraciclinas

.Especie	Genes	Tratamiento	Organismo
<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	<i>tet35</i>	Control	1
<i>Pseudodesulfovibrio piezophilus</i>	<i>tet35</i>	Control	1
<i>Agarivorans gilvus</i>	<i>tet35</i>	Control	1
<i>Bacteroides coprosuis</i>	<i>tetM</i>	Control	1
<i>Agarivorans gilvus</i>	<i>tet35</i>	Control	13
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>tetR</i>	Control	13
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>tetA, tetR</i>	Antibiótico	10
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tetR, tet35</i>	Antibiótico	10
<i>Agarivorans gilvus</i>	<i>tet35</i>	Antibiótico	10
<i>Dysgonomonas gadei</i>	<i>tetM</i>	Antibiótico	10
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>tetA</i>	Antibiótico	3
<i>Agarivorans gilvus</i>	<i>tet35</i>	Antibiótico	3
<i>Ahcromobacter arsenitoxydans</i>	<i>tetR</i>	Antibiótico	3

6.8. Genes de Multiresistencia

6.8.1. Organismos Control

En cuanto a los genes multirresistentes encontrados en las muestras de heces (Figura 24), se encontraron genes de resistencia que codifican para bombas de eflujo en la microbiota intestinal inicial de *Penaeus vannamei*, en los organismos control se identificaron las siguientes bombas de eflujo: *MexAB-OprM*, *MexEF-OprN*, *MexJK-OprM*, *MexXY-OprM*, *MexPQ-OpmE*, *AdeABC*, *AcrEF-TolC*, *MdtEF-TolC* y *BpeEF-OprC*, en el caso de las muestras de sedimento (Figura 25) de este organismo se identificaron las bombas *MexAB-OprM*, *MexJK-OprM*, *MexXY-OprM* y

MexPQ-OpmE.

En los sistemas control se identificaron las bombas de eflujo *MexAB-OprM* y *BpeEF-OprC* en *Agarivorans gilvus*, y también se identificó la bomba *MdtEF-TolC* en las especies *Vibrio tubiashii* y *Pseudoalteromonas spongiae*.

6.8.2. Organismos Expuestos a OTC

Las bombas de eflujo identificadas en los sistemas con tratamiento de OTC (Figura 24) fueron *MexAB-OprM*, *MexEF-OprN*, *MexPQ-OpmE*, *AdeABC*, *AcrEF-TolC*, *MdtEF-TolC* y *BpeEF-OprC*, una vez que los organismos fueron expuestos a antibiótico se identificaron las siguientes bombas de eflujo en la microbiota intestinal: *MexEF-OprN*, *MexPQ-OpmE* y *BpeEF-OprC*, la comunidad bacteriana estuvo dos semanas en ausencia de la presión de selección y las bombas de eflujo que mostraron una disminución en su abundancia relativa fueron *MexEF-OprN*, *MexPQ-OpmE*, *AdeABC* y *BpeEF-OprC*.

En cuanto a las muestras de sedimento (Figura 25) no se detectaron bombas de eflujo en la microbiota inicial, sin embargo, en el muestreo del día siete, momento justo antes de iniciar la exposición a OTC se detectaron *MexAB-OprM*, *MexEF-OprN*, *MexPQ-OpmE*, *AdeABC*, *AcrEF-TolC*, *MdtEF-TolC* y *BpeEF-OprC*, una vez expuesto el sedimento a la presencia de oxitetraciclina solamente dos bombas incrementaron su abundancia relativa: *MexJK-OprM* y *MexXY-OprM*.

Se encontró el mecanismo *MexAB-OprM* en la especie *Bradyrhizobium erythrophlei*, la bomba de eflujo *MexPQ-OpmE* en *Caballeronia sordidicola* y en *Burkholderia cenocepacia* el mecanismo *BpeEF-OprC*., se encontraron los mecanismos de resistencia *MexAB-OprM*, *MexEF-OprN* y *MdtEF-TolC* en la especie *Vibrio parahaemolyticus* (Cuadro 14).

Cuadro 14. Especies identificadas con genes para bombas de eflujo multiresistentes			
Especie	Genes	Tratamiento	Organismo
<i>Agarivorans gilvus</i>	<i>MexAB-OprM, BpeEF-OprC</i>	Control	1
<i>Vibrio tubiashii</i>	<i>MdtEF-TolC</i>	Control	1
<i>Pseudoalteromonas spongiae</i>	<i>MdtEF-TolC</i>	Control	1
<i>Agarivorans gilvus</i>	<i>MexAB-OprM, BpeEF-OprC</i>	Control	13
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>MexAB-OprM, MexEF-OprN, MdtEF-TolC</i>	Antibiótico	10
<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>	<i>MexAB-OprM</i>	Antibiótico	3
<i>Caballeronia sordidicola</i>	<i>MexPQ-OpmE</i>	Antibiótico	3
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>BpeEF-OprC</i>	Antibiótico	3

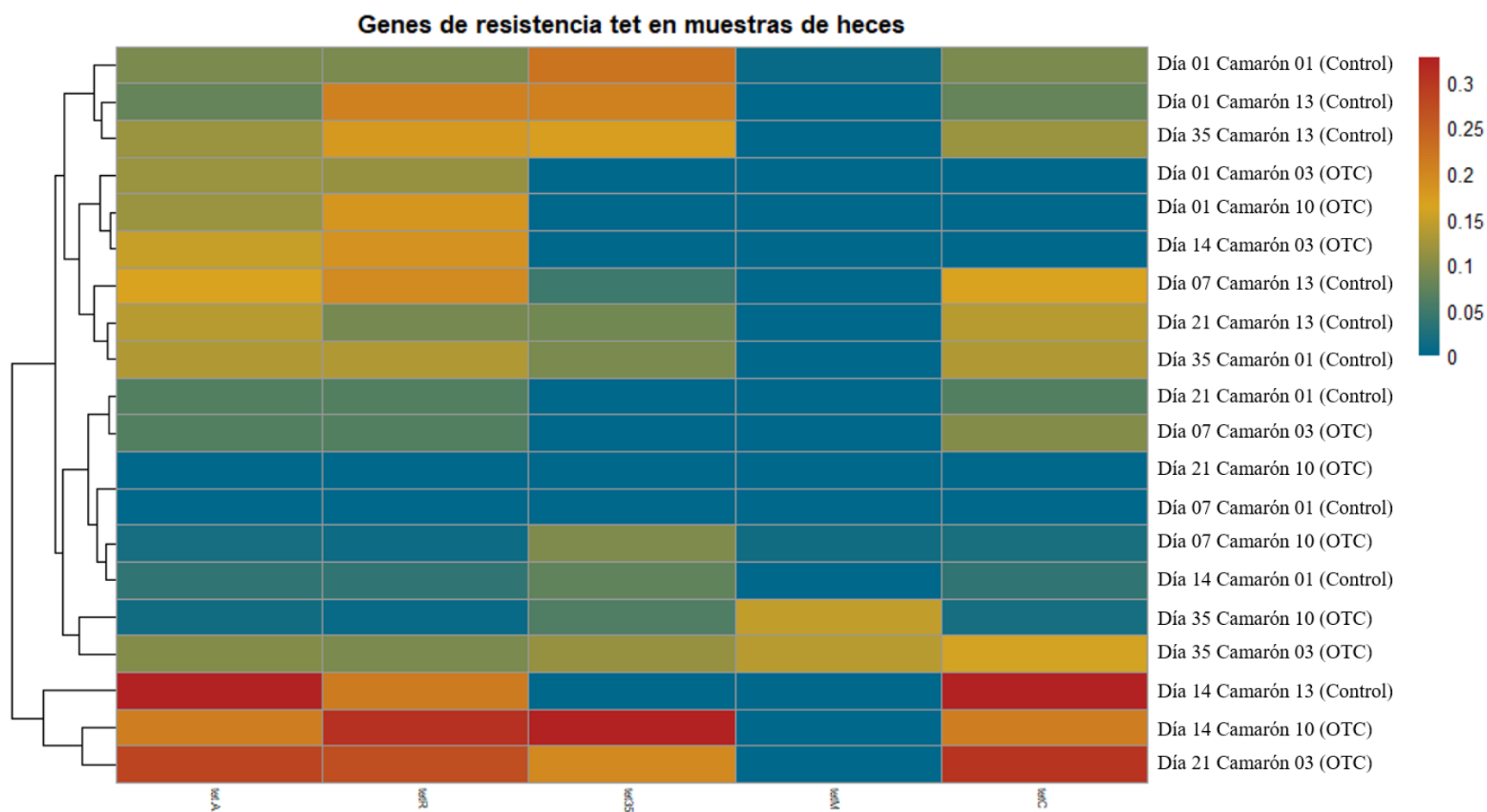


Figura 22. Genes de resistencia a tetraciclinas identificados en muestras de heces de *Penaeus vannamei* a lo largo del tratamiento, el código de las muestras se conforma de tiempo_organismo

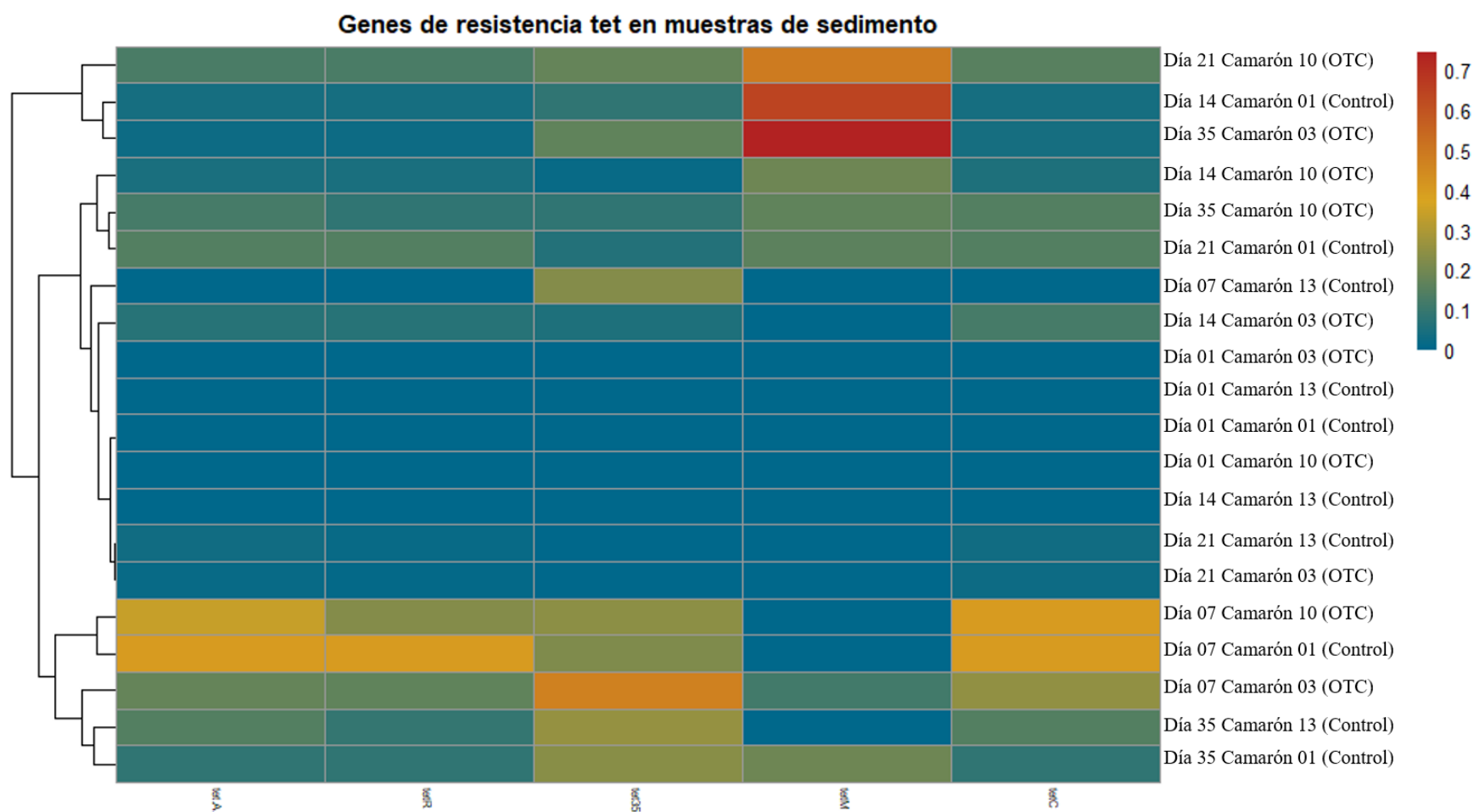


Figura 23. Genes de resistencia a tetraciclinas identificados en muestras de sedimento de *Penaeus vannamei* a lo largo del tratamiento, el código de las muestras se conforma de tiempo_organismo

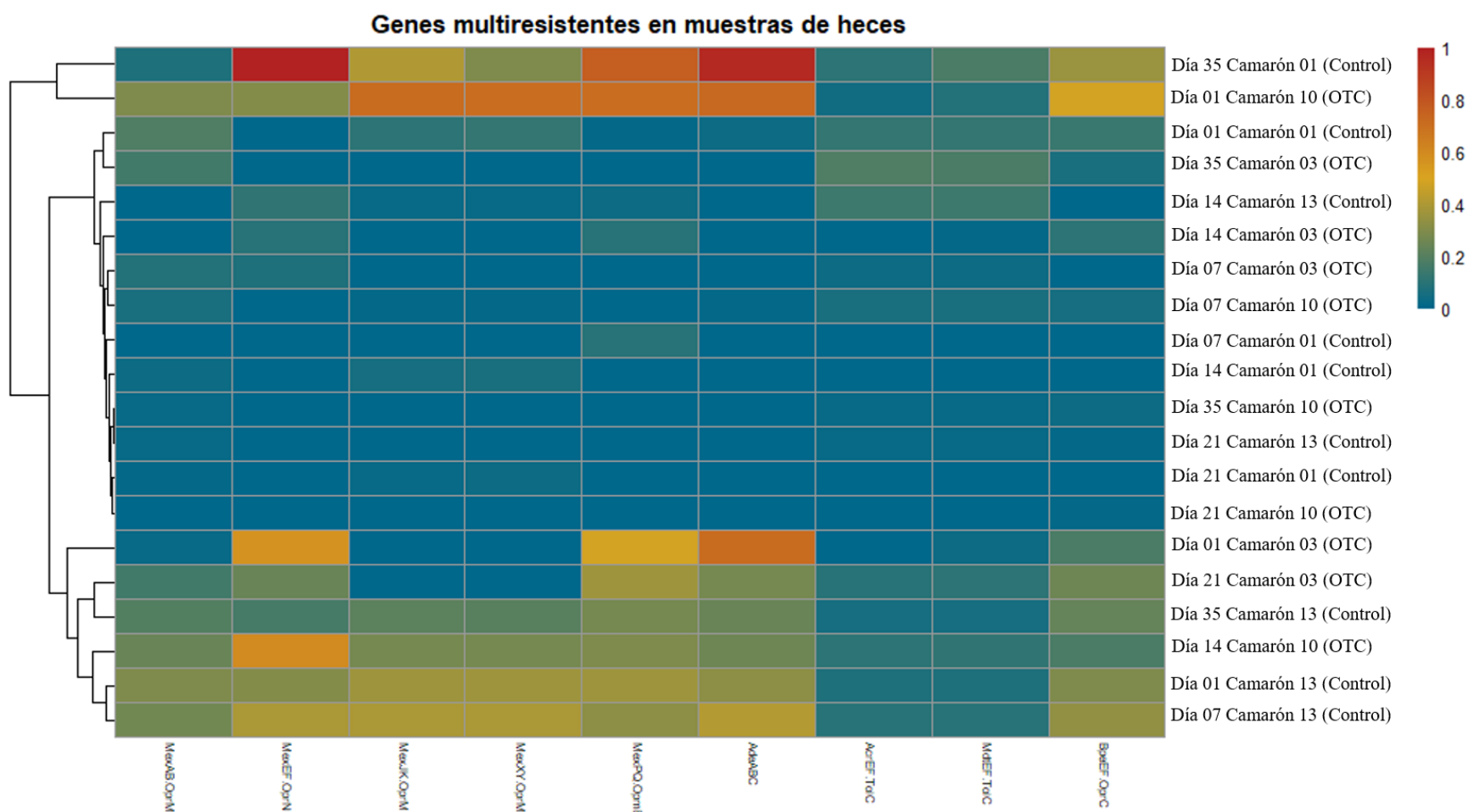


Figura 24. Bombas de eflujo identificadas en muestras de heces de *Penaeus vannamei* a lo largo del tratamiento, el código de las muestras se conforma de tiempo_organismo

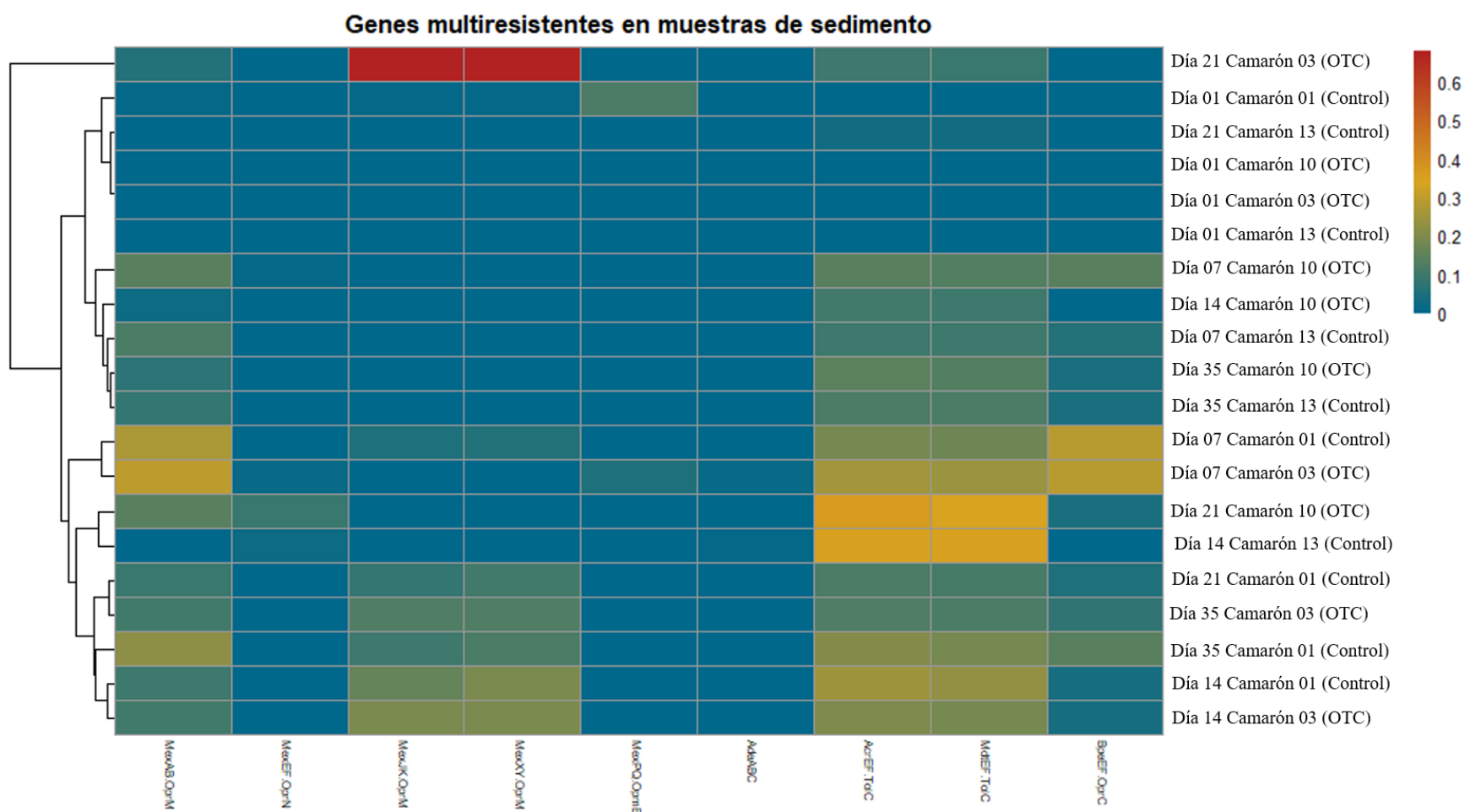


Figura 25. Bombas de eflujo identificadas en muestras de sedimento de *Penaeus vannamei* a lo largo del tratamiento, el código de las muestras se conforma de tiempo_organismo

7. DISCUSIONES

En el presente trabajo se caracterizó la estructura taxonómica de la microbiota intestinal de *Penaeus vannamei* así como de sedimento estuarino expuesto a dos diferentes concentraciones de oxitetraciclina, también se observó la recuperación que tuvo la comunidad bacteriana posterior a la exposición, así como el aumento o disminución de la abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas y otros genes de multiresistencia.

Las familias que se encontraron en mayor abundancia en las muestras de contenido intestinal inicial en los organismos fueron *Alteromonadaceae* y *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Roseobacteraceae* y *Lewinellaceae*, otros estudios han reportado la presencia las familias *Pseudoalteromonadaceae* y *Vibrionaceae* (Tuyub *et al.*, 2014; Enciso 2016) familias que también fueron identificadas en la microbiota de *Penaeus vannamei* en este estudio en abundancias menores, Enciso (2016) relaciona en su análisis la presencia de la familia *Pseudoalteromonadaceae* con el uso de sedimento en el bioensayo.

Los phyla de mayor abundancia inicial fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Pseudomonadota*, dichos resultados coinciden con lo descrito por Gómez *et al.*, (2017) quién menciona que *Proteobacteria* seguido de *Firmicutes*, *Fusobacteria* y *Bacteroidetes* son los phyla dominantes en organismos acuáticos como peces, sin embargo, es importante recordar que la microbiota de los organismos acuáticos se ve afectada por varios factores ambientales como el agua, el pH y la alimentación (Tuyub *et al.*, 2014; Enciso, 2016; Gómez *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018).

El seguimiento de los organismos fue individual, lo que hace posible observar tanto similitudes como diferencias entre los sistemas, el comportamiento de la comunidad bacteriana tiene algunos cambios dependiendo del sistema a pesar de que el bioensayo tenga las mismas condiciones ambientales como temperatura, cantidad de agua de recambio, capacidad del tanque, oxigenación, etc., esto puede deberse a factores intrínsecos ya sea del organismo o bien del propio sistema, tales como el estrés, la movilidad, la cantidad de ingesta de alimento la temperatura y los componentes de la dieta (Enciso, 2016; Gómez *et al.*, 2017; Xie. *et al.*, 2019).

Dentro de las familias con mayor abundancia que coincidieron se encuentran las familias *Alteromonadaceae*, *Flavobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, también se identificaron las familias *Burkholderiaceae* y *Rhodobacteraceae* quienes pertenecen al filo *Proteobacteria*, Zhao *et al.*,

(2022) en un análisis de muestras de agua y sedimento de unidades de desarrollo de *Penaeus vannamei* mencionan al phylum *Proteobacteria* como el de mayor abundancia en las muestras tanto de agua como de sedimento, seguido de otros phyla como *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Euryarchaeota*, *Planctomycetes*, *Firmicutes* y *Spirochaetes*, phyla que coincide con la taxonomía identificada en la microbiota inicial del organismo.

En este estudio las muestras de sedimento inicial se vieron dominadas por las familias *Myoviridae*, *Rhodobacteraceae* y *Prolixibacteraceae*, *Myoviridae* es una familia de virus que infecta procariotas, es coincidente que este tipo de familias se encuentren en muestras como las recolectadas en el estero del Yugo en Mazatlán, Sinaloa ya que los virus son las entidades biológicas de mayor abundancia en el océano y sobre todo aquellos que se encuentran en los sedimentos son especialmente abundantes además de ser potenciales reservorios de genes de resistencia a antibióticos en ambientes acuáticos (Liu *et al.*, 2022; Lekunberri *et al.*, 2017), dentro de esta familia de fagos se encuentran algunos géneros que funcionan como transductores y son específicos para bacterias como *Pseudomonas*, *Mycobacteria*, *Halobacteria*, *Bacillus*, *Lactobacillus* entre otros y son ampliamente encontrados en agua y suelos ya que tienen una distribución global (Myoviridae, 2012; Lekunberri *et al.*, 2017).

La microbiota intestinal después de haber sido expuesta a la primera dieta con oxitetraciclina fue dominada por las familias *Caulobacteraceae*, *Alteromonadaceae* y *Vibrionaceae*, lo cual indica una probable resistencia a la oxitetraciclina en estos taxones, la familia *Caulobacteraceae* ha sido reportada como resistente a antibióticos por su capacidad de producir biofilms (Zhang *et al.*, 2019) los cuales se definen como una comunidad microbiana, tanto monomicrobiana como polimicrobiana, embebida en una matriz extracelular producida por el propio microorganismo que, por lo general, se encuentra adherida a una superficie (Tahis, 2020). *Alteromonadaceae* es una familia del phylum *Proteobacteria* el cual ha sido reportado como dominante durante largos periodo de estrés por OTC (Zhang *et al.*, 2022) y la familia *Vibrionaceae* a través de los años debido quizá al excesivo uso de antibióticos ha aumentado su resistencia a un gran número de antibióticos (Look *et al.*, 2020).

Especies como *Vibrio parahaemolyticus* han sido detectadas con resistencia antibiótica en países como Corea, China, Malasia e India provenientes de muestras principalmente aisladas de mariscos, estuarios y regiones costeras, todas ellas zonas afectadas por la actividad antropogénica

(Letchumanan *et al.*, 2015; Loo *et al.*, 2020).

Algunas de las familias que no presentaron genes de resistencia en la primera concentración de oxitetraciclina fueron *Rubrobacteraceae* y *Desulfobacteraceae* quienes disminuyeron su abundancia relativa una vez fueron expuestas al antibiótico a pesar de por ejemplo la familia *Rubrobacteraceae* ser considerada una familia extremófila que ha sido aislada de zonas profundas del océano indico y que por sus cualidades pareciera ser resistente a presiones de selección extremas (Chen *et al.*, 2018). La presencia de familias como *Rubrobacteraceae* en la microbiota de *Penaeus vannamei* coincide con lo descrito por Enciso (2016), Gómez *et al.*, (2017) y Xie *et al.*, (2019) quienes mencionan que las condiciones medioambientales influyen en la composición de la microbiota de los organismos acuáticos como es el caso del camarón blanco del Pacífico, esto debido a que dicha familia fue identificada en la microbiota inicial del sedimento, por lo tanto existió interacción entre la microbiota del sedimento y la microbiota intestinal del organismo.

En el caso de la comunidad bacteriana en el sedimento se pudo observar que posterior al primer tratamiento con oxitetraciclina la comunidad fue dominada por las familias *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Myoviridae* y *Marinifilaceae*, géneros *Desulfobacter* de la familia *Desulfobacteraceae* han sido identificados como resistentes a antibióticos en unidades experimentales y de producción de pepino de mar (Ye *et al.*, 2020), este tipo de organismos al igual que *Penaeus vannamei* es bentónico, es decir lleva a cabo la mayoría de sus actividades en el suelo marino, es interesante observar cómo en este punto la familia *Desulfobacteraceae* disminuye su abundancia relativa en las muestras intestinales pero hizo lo opuesto en las muestras de sedimento soportando la presión de selección generada por el antibiótico, también es interesante que la familia de virus *Myoviridae* incrementó su abundancia con la presencia de OTC, la familia de bacteriófagos *Myoviridae* podría estar siendo subestimada respecto a su capacidad de contribuir a la resistencia antibiótica en comunidades bacterianas de sedimento ya que pueden ser agentes móviles para la diseminación de la resistencia antibiótica (Subirats *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022) por otra parte no se han reportado genes de resistencia a oxitetraciclina o tetraciclinas en general en la familia *Marinifilaceae*.

Una vez que los organismos fueron expuestos a una mayor concentración de antibiótico la abundancia relativa de muchos taxones disminuyó, sin embargo, algunas familias mostraron una alta persistencia en el ambiente a pesar de la exposición a una concentración alta de OTC en el alimento de 15 mg/g de alimento, las familias que mostraron este comportamiento principalmente

fueron *Caulobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Alteromonadaceae*.

Los resultados coinciden con lo reportado por Loo y colaboradores (2020) quienes mencionan alta resistencia en cepas provenientes de dichas familias, por otra parte, el sedimento mostró una dominancia considerable (más del 80%) de una familia: *Myoviridae*, para este punto es muy notorio que posiblemente esta familia de virus estuvo actuando como un potencial “medio de transporte” para los genes de resistencia durante la presión de selección generada por el antibiótico, ya que dentro de esta familia existen especies de bacteriófagos que podrían ser potenciales reservorios de genes de resistencia para oxitetraciclina (Subirats *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2022, Zhang *et al.*, 2022). Posterior a la exposición del antibiótico la microbiota intestinal tuvo un tiempo de recuperación que constó de quince días, durante este tiempo de recuperación las familias *Flavobacteriaceae*, *Alteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Rhodobacteraceae* tuvieron un incremento en su abundancia relativa, lo que indica que una vez fue retirada la presión de selección estos taxones fueron capaces de recuperarse y volvieron a valores cercanos en su estado inicial sin exposición a antibiótico, en contraste con Almeida y colaboradores (2021) quienes mencionan una disminución en la abundancia relativa de géneros asociados a *Rhodobacteraceae* y *Proteobacteria* en periodos post exposición de antibiótico. En cuanto al sedimento durante el periodo de recuperación las familias que tuvieron una recuperación en su abundancia relativa fueron *Alteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Prolixibacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* y *Desulfovibrionaceae*, sin embargo, solamente *Rhodobacteraceae* y *Prolixibacteraceae* volvieron a presentar dominancia como al inicio del bioensayo.

Una vez que los organismos fueron expuestos a oxitetraciclina algunas especies como *Brevundimonas nasdae*, *Agarivorans gilvus* y *Vibrio parahaemolyticus* incrementaron su abundancia relativa en la microbiota intestinal, posiblemente por su capacidad de producir biofilms, por lo que tuvieron persistencia en el medio a pesar del tratamiento con oxitetraciclina en estas concentraciones, las bacterias gram negativas como *Brevundimonas nasdae* son bacterias que se están convirtiendo en preocupantes para nosocomios ya que son patógenos oportunistas y una causa común de infecciones en hospitales, otras especies de *Brevundimonas* tales como *Brevundimonas vesicularis* y *Brevundimonas diminuta* han sido asociadas a resistencia a antibióticos como ampicilina, gentamicina, kanamicina y tetraciclinas (Ryan y Pembroke, 2018).

También ya han sido reportados casos donde *Vibrio parahaemolyticus* presenta resistencia antibiótica (Loo *et al.*, 2020, Letchumanan *et al.*, 2015), en el presente estudio se identificaron los

genes de resistencia *tet35* y *tetR* específicos para tetraciclina, a la vez que se identificaron las bombas de eflujo *MexAB-OprM*, *MexEF-OprN* y *MdtEF-TolC* en *Vibrio parahaemolyticus*, el gen *tet35* ya ha sido identificado previamente en esta especie (Kanrar y Dhar, 2018) por lo que al parecer podría este ser un gen propio de la especie y que incrementa su abundancia relativa con la presión de selección por el antibiótico al igual que pasa con el gen *tetR*.

El género *Vibrio* constituye parte de la microbiota natural de organismos silvestres y cultivados y se convierte en un patógeno oportunista cuando el sistema inmune del organismo se encuentra deprimido, por lo que es capaz de generar Vibriosis (Brock y Lightner 1990; Santiago *et al.*, 2009) o enfermedades como el Bright red syndrome provocado por la especie *Vibrio harveyi* y que ha demostrado resistencia a ampicilina, cefbenicilina y oxitetraciclina (Soto-Rodriguez *et al.*, 2012) por lo tanto es común que las concentraciones de antibiótico tienden a ser más altas para que los tratamientos sean efectivos provocando así la posible presencia de genes de resistencia a la oxitetraciclina como el gen *tet35* y el gen *tetR* es por ello que vendría bien el utilizar antibióticos de nuevas generaciones para lograr evitar pérdidas en los cultivos de *Penaeus vannamei*.

Por otra parte *Vibrio parahaemolyticus* también es un patógeno oportunista para el ser humano ya que puede causar gastroenteritis en las personas que han consumido mariscos o pescados contaminados, en este caso las personas generalmente sólo contraen un malestar ligero o moderado, aunque algunas pueden enfermarse hasta el punto de ser hospitalizadas, se ha reportado en términos generales, que *Vibrio parahaemolyticus* es susceptible a tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, cotrimoxazol, cloranfenicol, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolona; sin embargo otros estudios han reportado resistencia a ampicilina, carbeneclina y baja susceptibilidad a oxitetraciclina debido a la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas ya que este tipo de especies han generado resistencia antibiótica, siendo el principal factor la actividad antropogénica (Díaz y Valerio, 2002; Dabanch *et al.*, 2009; Soto-Rodriguez *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2021).

En el presente estudio también se encontró el gen *tet35* en *Pseudoalteromonas spongiae* y *Pseudodesulfovibrio piezophilus* quienes son parte del phylum *Proteobacteria* (Almeida *et al.*, 2021; He *et al.*, 2022), dicho phylum ha sido asociado ampliamente a la resistencia antibiótica y a la persistencia a tratamientos con oxitetraciclina, de igual forma el gen *tet35* se encontró en la especie *Agarivorans gilvus* quien pertenece al phylum *Pseudomonadota* que es un sinónimo de *Proteobacteria*, sin embargo el nombre ha tenido cambios desde el año 2021, de igual forma el

phylum ha sido asociado a resistencia antibiótica, sin embargo no habían sido reportados genes de resistencia a tetraciclinas en esta especie (Oliver *et al.*, 2022).

En las muestras de sedimento la especie que mayor número de genes de resistencia antibiótica presentó fue *Agarivorans gilvus*, debido a que incrementó su abundancia relativa a pesar de los dos periodos de exposición a oxitetraciclina además de haberse identificado genes de resistencia a tetraciclinas y otras bombas de eflujo como *MexAB-OprM* y *BpeEF-OprC* asociados a esta especie, *Agarivorans gilvus* no forma esporas y fue aislada por primera vez de algas marinas de la costa de Weihai, China y tiene un 96.1% de similaridad con *Agarivorans albus* (Du *et al.*, 2011), la presencia de esta especie coincide en las muestras de sedimento coincide con lo encontrado en las muestras de contenido intestinal por lo que existió interacción entre la comunidad bacteriana del sedimento con la comunidad presente en el intestino de los organismos (Enciso, 2016; Gómez *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2021).

Otra de las especies en la que se identificaron genes de resistencia a tetraciclinas fue *Burkholderia cepacia*, en esta especie se encontraron los genes *tetA* y *tetR*, esta especie de *Burkholderia* ha sido relacionado con resistencia a tetraciclinas (Ryan y Pembroke, 2018; Kwayess *et al.*, 2022).

De igual forma se identificó el gen *tetM* en *Dysgonomonas gadei* y *Bacteroides coprosuis*, se han reportado otras especies de *Dysgonomonas* asociadas a resistencia antibiótica en pacientes con diabetes y problemas en los riñones (Gao *et al.*, 2022), a pesar de ser matrices completamente distintas (sedimento – sangre) es importante prestar atención a aquellas especies que pueden ser patógenas oportunistas para el ser humano.

Otra de las especies en la que fue identificado el gen de resistencia a tetraciclinas *tetR* fue en *Achromobacter arsenitoxydans*, las especies de *Achromobacter* están siendo cada vez más comunes en pacientes con fibrosis quística y estos patógenos están asociados a resistencia antibiótica y más problemas de salud (Gabrielaite *et al.*, 2021), el incrementar las concentraciones de antibióticos como oxitetraciclina y/o exceder del periodo de los periodos de tratamiento sugeridos en unidades de producción de producción acuícola son factores que incrementan y provocan la persistencia de especies resistentes a antibióticos que se pueden convertir en patógenos oportunistas para el ser humano.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos la hipótesis no se rechaza, ya que el uso de la oxitetraciclina alteró la microbiota tanto intestinal como la del sedimento circundante y favoreció miembros de los phyla *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, sin embargo no favoreció a miembros de la familia *Firmicutes*, además se incrementó la abundancia relativa de genes de resistencia a tetraciclinas, como el gen *tetM* de protección ribosomal, además del incremento de otros mecanismos de multi resistencia, la microbiota no regresó en su totalidad a un estado inicial sin embargo hubo recuperación en algunas familias bacterianas al eliminar la presión de selección por la OTC y una disminución en la abundancia relativa de algunos genes de resistencia al eliminar OTC de la dieta.

La microbiota intestinal de *Penaeus vannamei* fue dominada por especies pertenecientes a las familias *Alteromonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Roseobacteraceae* y *Lewinellaceae* mientras que las familias que dominaron la microbiota del sedimento fueron *Myoviridae*, *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Alteromonadaceae*, existiendo interacción entre la comunidad establecida en el sedimento con la que se estableció en los intestinos de los organismos.

Se encontró que durante la exposición al antibiótico las familias que se vieron favorecidas debido posiblemente a su capacidad de resistencia fueron *Caulobacteraceae*, *Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Vibrionaceae* en las muestras de contenido intestinal, mientras que en las muestras de sedimento fueron *Flavobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Myoviridae* y *Marinifilaceae*.

Se observó que las familias bacterianas en las muestras de heces que mostraron una recuperación una vez se retiró la presión de selección del día veintiuno y hasta el día treinta y cinco fueron *Flavobacteriaceae*, *Alteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae* y *Rhodobacteraceae*, mientras que las que mostraron una recuperación en su abundancia relativa en las muestras de sedimento fueron *Alteromonadaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Prolixibacteraceae*, *Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae* y *Desulfovibrionaceae*.

Se encontraron los genes de resistencia *MdtEF-TolC*, *MexEF-OprN* y *MexAB-OprM* asociados a *Vibrio parahaemolyticus* en el resistoma de organismos *Penaeus vannamei* silvestres previo a la

exposición a antibióticos, por lo cual existían mecanismos de resistencia antibiótica antes de la exposición a oxitetraciclina derivado probablemente de la actividad antropogénica o bien pudieran formar parte del resistoma de esta especie.

Se encontró multiresistencia principalmente en las especies *Agarivorans gilvus* y *Vibrio parahaemolyticus*, la especie de *Vibrio* ya había sido reportada previamente como resistente a antibióticos incluidas las tetraciclinas sin embargo en *Agarivorans gilvus* no han sido reportados genes de resistencia a tetraciclinas.

A pesar de que la oxitetraciclina es un antibiótico sensible a varias condiciones ambientales como el pH, la luz y además de tener una alta solubilidad, fue posible encontrar concentraciones biodisponibles en condiciones controladas en el sedimento aun después de un periodo de 14 días sin exposición al antibiótico y con recambios de agua constantes.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar la investigación con distintas concentraciones de oxitetraciclina o bien el uso de otros antibióticos, así como distintas combinaciones de tratamientos, ya que los genes de resistencia pudieran ser distintos al combinar el tratamiento con otros compuestos.

También utilizar distintas concentraciones poblacionales, ya que la microbiota tanto intestinal como del sedimento puede verse influenciada por la cantidad de organismos y la competitividad por el alimento.

Estudiar la expresión de genes de resistencia en momentos específicos de los tratamientos con antibiótico.

Analizar la relación entre la concentración de antibiótico disponible en el sistema con la abundancia relativa de genes de resistencia.

Hacer un estudio de la influencia de los elementos genéticos móviles en la resistencia antibiótica bajo estas y más condiciones ambientales.

Utilizar otros organismos modelo para analizar las diferencias en la composición de la microbiota expuesta a antibióticos entre organismos bentónicos y pelágicos.

10. REFERENCIAS

- Almeida, A., Domingues, I., Henriques, I. (2021). Zebrafish and water microbiome recovery after oxytetracycline exposure. *Environmental Pollution*, 272, 116371.
- Amarasiri, M., Sano, D., Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50, -.
- Anaya, R. (2005) CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei*, Boone (1931), EN SISTEMA CERRADO A ALTA DENSIDAD. Tesis de maestría. CICESE. México.
- Arriaga, D., Hernández, C., Martínez, E., Ibarra, L., Lizárraga, E., Leyva, N., Chávez, M. (2021) Fish meal replacement by soybean products in aquaculture feeds for white snook, *Centropomus viridis*: Effect on growth, diet digestibility, and digestive capacity. *Aquaculture*, 530, -.
- Avunje, S., Patil, P., Ezaz, W., Praveena, E., Ray, A., Viswanathan, B., Alavandi, S., Puthiyedathu, S., & Vijayan, K. (2021). Effect of oxytetracycline on the biosafety, gut microbial diversity, immune gene expression and withdrawal period in Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 543(736957), 736957.
- Balaban, N., Helaine, S., Lewis, K., Ackerman, M., Aldridges, B., Andersson, D., Brynildsen, M., Bumann, D., Camillis, A., Collins, J., Christoph, D., Fortune, S., Ghigo, J., Hardt, W., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D., Jenal, U., Levin, B., Michiels, J., Storz, G., Tan, M., Tenson, T., Melderén, L., Zinkernagel, A. funado. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 441-448.
- Beraud, L., Gómez-Gil, B., Franco, M., Almazán, P., Betancourt, M., (2021) A metagenomic assessment of microbial communities in anaerobic bioreactors and sediments: Taxonomic and functional relationships. *Anaerobe*, 68, 102296.
- Brock, J.A. y Lightner, D.V. (1990). Chapter 3: Diseases of crustacea. En: O. Kinne (ed.) *Diseases of marine animals Vol. 3*, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. Pp. 245-424.
- Bermúdez-Almada, M., Espinosa-Plascencia, A. (2012) The use of antibiotics in shrimp farming. Teodora Smiljanic. *Health and environment in aquaculture*. (pp. 200-214). Intech.
- Bioinformática microbiana (2022). Metagenómica funcional anvio. <https://bioinformatica.ciad.mx/home/metagenomica-funcional/anvi-o>
- Calvo, G., Arias, M., Fernández, H. (2013) *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario / *Arcobacter*: a foodborne emerging pathogen. *ALAN* 63 (2).
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44–52.
- Campaña-Torres, A., Martínez-Córdova, L. R., Villarreal-Colmenares, H., Hernández-López, J., Ezquerro-Brauer, J. M., & Cortés-Jacinto, E. (2009). Efecto de la adición del rotífero *Brachionus rotundiformis* (Tschugunoff, 1921) sobre la calidad del agua y la producción, en

- cultivos super-intensivos de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(2), 335–342.
- Card, K., LaBar, T., Gómez, J., & Lenski, R. (2019). Historical contingency in the evolution of antibiotic resistance after decades of relaxed selection. *PLoS Biology*, 17(10), e3000397.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. (2021) Estima el programa Nacional de pesca y acuicultura 2020-2024 lograr crecimiento de la producción pesquera y acuícola del país en 15.52%. 29 de Mayo de 2022, de Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca Sitio web: <https://www.gob.mx/conapesca/es/articulos/estima-el-programa-nacional-de-pesca-y-acuicultura-2020-2024-lograr-crecimiento-de-la-produccion-pesquera-y-acuicola-del-pais-en-15-52-261976?idiom=es>
- Chen, H., Liu, S., Xu, X., Liu, S., Zhou, G., Sun, K., Zhao, J., Ying, G. (2015). Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: Occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 90, 181-187.
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., Briebe, L. G., Viana, M. T., Sotelo-Mundo, R. R., & Ochoa-Leyva, A. (2017). Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports*, 7(1), 11783.
- Costa, J., (2019) Explorando el resistoma natural de suelos de la Península Antártica con distintos grados de intervención humana. Tesis de licenciatura. Recuperado de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/174896/Explorando-el-resistoma-natural.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Dabanch, J., Herrero, D., Pavéz, C., Veas, N., Braun, S., Porte, L (2009) *Vibrio parahaemolyticus* bacteremia: Case report and literature review. *Rev Chil Infect* 2009; 26 (4): 360-362.
- Denyer, S. P., Hodges, N. A., & Gorman, S. (Eds.). (2012). *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*. Wiley-Blackwell.
- Dewal, B., Ramirez, J., Noriega, L., González, R. (2005) Shrimp aquaculture, the people and the environment in coastal Mexico Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the World Bank Group, World Wildlife Fund (WWF), and the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA).
- Du, Z, Lv, G., Rooney, A., Miao, T., Xu, Q., Chen, G. (2011) *Agarivorans gilvus* sp. Nov. isolated from seaweed. *Int J Syst Evol Microbiol*.61(3):493-496. doi: 10.1099/ij.s.0.019810-0.
- Enciso, J. (2019) FILOGENIA DEL GÉNERO *Photobacterium* DE LA FAMILIA Vibrionaceae. Tesis de Maestría. CIAD, México.
- Enciso, K., (2016) Evaluación del cambio en la microbiota del contenido intestinal de camarón silvestre (*Penaeus vannamei*) sometido a diferentes condiciones de cultivo. Tesis de maestría. CIAD, México.
- FAO. (2016). The FAO action plan on antimicrobial resistance. Recuperado el 21 de Enero de 2022, de Food and Agriculture Organization of the United Nations Sitio web: <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>

- Feng, L., Xiao, C., Luo, Y., Qiao, Y., Chen, D. (2022). The fate of antibiotic resistance genes, microbial community, and potential pathogens in the maricultural sediment by live seaweeds and oxytetracycline. *Journal of Environmental Manegement*, 318, -.
- Gabrielaite, M., Bartell, J., Norskov-Lauritsen, N., Pressler, T., Nielsen, F., Johansen, H., Marvig, R. (2021). Transmission and Antibiotic Resistance of *Achromobacter* in Cystic Fibrosis. *Clinical microbiology*, (59), -.
- García, C. (2012) Antimicrobial resistance in Peru and Latin America. *Acta médica peruana*, 29(2).
- Gao, X., Wei, J., Hao, T., Yang, T., Han, X., Li, M., Li, X., Xiong, D., Zhang, X. (2022). *Dysgonomonas mossii* Strain Shenzhen WH 0221, a New Member of the Genus *Dysgonomonas* Isolated from the Blood of a Patient with Diabetic Nephropathy, Exhibits Multiple Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, (10), -.
- Giono, S., Santos, J., Morfín, M., Torres, F., Alcantar, M. (2020). Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. *Gaceta médica de méxico*, 156, 171-178.
- Gobernado, M. (2015). Uso de antibióticos y consecuencias evolutivas para el resistoma, mobiloma y pangenoma microbiano. 23 de Enero de 2021, de Microbiología y salud Sitio web: http://www.microbiologiaysalud.org/wp-content/uploads/2015/10/M.-Gobernado_.pdf
- Gómez, B., Enciso, K., Cruz, E., Hernández, C., Osuna, E., Nieto, M., Montero, C. (2017) Efecto de la dieta en el microbioma intestinal de organismos acuáticos. *Avances en nutrición acuícola*. Recuperado a partir de <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/30>
- González, C., Cardona, J. (2018). Revisión Sistemática sobre Elementos Genéticos Móviles Portadores de Genes de Resistencia a Antibióticos en Aguas Residuales, 2000-2017. *iMedPub Journals*, 14, -.
- González, J., Soto, S., López, O., Castro, N., Chaidez, C., Gómez-Gil, B. (2020). Phylogenomic Analysis Supports Two Possible Origins for Latin American Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). *Curr Microbiol.*, 77, 3851-3860.
- Gothwal, R. and Shashidhar, T. (2014) “Antibiotic pollution in the environment: A Review,” *CLEAN - Soil, Air, Water*, 43(4), pp. 479–489. Available at:
- Hanifah, M., Han, W., Thanh, B., Austin, C., Ming, H.. (2018). Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: implications for aquaculture research and management. *Peer J.*-.
- He, L., He, L., Gao, F., Wu, D., Ye, P., Cheng, Y., Chen, Z., Hu, L., Liu, Y., Chen, J., Ying, G. (2022). Antibiotics, antibiotic resistance genes and microbial community in grouper mariculture. *Science of the Total Environment*, 808, -.
- Herranz, M., Bolivar, J., Liger, E., Payeras, J., Pinilla, J. (2007). Procedimiento de toma de muestras de sedimentos para la determinación de la radiactividad ambiental. España: Consejo de Seguridad Nuclear.
- Holt, C., Bass, D., Stentiford, G., Van der Giezen, M. (2020). Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W., Tamariz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y

concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1), 39-45. Recuperado en 04 de febrero de 2022, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007&lng=es&tlng=es

Instituto Nacional de Economía Social. (2018). Acuicultura, historia y actualidad en México. 29 de mayo de 2022, de Instituto Nacional de Economía Social Sitio web: <https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/acuicultura-historia-y-actualidad-en-mexico?idiom=es>

Inapesca. (2018). Acuicultura: Camarón blanco del Pacífico. 21 de Enero de 2021, de GOB.mx Sitio web: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>

Jahantigh, M., Samadi, K., Dizaji, R., Salari, S. (2020) Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*. 16,

Kanrar, S., Dhar, A. (2018). Complete Genome Sequence of a Novel Mutant Strain of *Vibrio parahaemolyticus* from Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*). *Genome announcements*, 6(24).

Kwayess, R., Eddine, H., Hindy, J., Youseff, N., Haddad, S., Kanj, S. (2022). *Burkholderia cepacia* Infections at Sites Other than the Respiratory Tract: A Large Case Series from a Tertiary Referral Hospital in Lebanon. *Journal of Epidemiology and Global Health*, (12), 274-280.

Letchumanan, V., Pusparajah, P., Teng, L., Yin, W., Lee, L., Chan, K. (2015) Occurrence and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Shellfish in Selangor, Malaysia.

Letten, A., Hall, A., Levine, J. (2021). Using ecological coexistence theory to understand antibiotic resistance and microbial competition. *Nature Ecology & Evolution*, 5(4), 431–441.

Li, E., Chang, X., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., Qin, J., Che, L. (2018). Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, (26), 381-399.

Li D., Liu C., Luo R., Sadakane K., Lam T. (2015) MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*. May 15;31(10):1674-6.

Liu, W.; Zheng, X.; Dai, X.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Xiao, T.; Huang, L. (2022) Isolation and Characterization of the First Temperate Virus Infecting *Psychrobacillus* from Marine Sediments. *Viruses*, 14, 108.

Loo, K., Letchumanan, V., Woan, J., Pusparajah, P., Goh, B., Ab, N., He, Y., Lee, L. (2020). Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. *Reviews in aquaculture*, (-), 1-19,

Lu, J Zhang X, Wang C, *et al.*, (2021) Responses of sediment resistome, virulence factors and potential pathogens to decades of antibiotics pollution in a shrimp aquafarm. *The Science of the Total Environment*. 794:148760.

Lyle, L., Romero, E., Paez, F. (2006) A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquacultural engineering*. 35, 135-146.

- Martínez, M., Vargas, F. (2015). Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in aquaculture*, 7, 1-15.
- Menzel, P., Lee, K., Krogh, A. (2016) Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature communications*. 7, -.
- Miranda, C., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., Roberts, M. (2002) Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Chilean Salmon Farms. *Antimicrob agents chemother*. 47 (3): 883-888.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., Ochoa, T. (2011). MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA. v Peru *Med Exp Salud Publica*, 28, 648-656.
- Myoviridae. (2012). *Virus Taxonomy*, 46–62. doi:10.1016/b978-0-12-384684-6.00002-1
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., Gomez-Jimenez, S. (2014) Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *DAO*. 11(1).-
- Oliver, A., Xue, Z., Villanueva, Y., Durbin, B., Alkan, Z., Taft, D., Liu, J. (2022) Association of diet and antimicrobial resistance in healthy U.S. adults. *Huma microbiome*. 13(3).-
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom. Reino Unido.
- Oyarce, D., (2012) Detección de cuatro genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias nosocomiales gram negativas, aisladas en recintos hospitalarios veterinarios. (Tesis de pregrado) Universidad de Chile: Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, Chile.
- Perry, J., Waglechner, N., Wright, J. (2016) The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring harbor perspectives in medicine*, 6.
- Rendon, J. (2015) Contenido de materia orgánica, nitrógeno, fosforo y arsénico total en los sedimentos superficiales del estero de Urías Mazatlán, Sinaloa. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rovira, P., McAllister, T., Lakin, S., Cook, S., Doster, E., Noyes, N., Weinroth, M., Yang, X., Parker, J., Boucher, C., Booker, C., Woerner, D., Belk, K., Morley, P. (2019) Characterization of the microbial resistome in conventional and “Raised without antibiotics” beef and dairy production systems. *Frontiers in microbiology*, 10, -.
- Ryan, M., Pembroke, J. (2018) *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*. 9(1). 480-493.
- Sadzawka, A., Zagal, E. (2007). PROTOCOLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA SUELOS Y LODOS. Chile: Universidad de Concepción.
- Sainz, P. (2014) Estudio de la actividad de bombas de eflujo de *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo de *Escherichia coli*. (Tesis de maestría). Universidad de Zaragoza, España.
- Santiago, M., Espinosa, A., Bermúdez, M. (2009). Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40, 22-32.
- Sebastián, J., Sánchez, C. (2018). De la flora intestinal al microbioma. *Revista española de enfermedades digestivas*, 110, -.

- Seija, V., Vignoli, R. (2006) Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de la república: facultad de medicina.
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16, 402-419.
- Sharma, L., Nagpal, R., Jackson, C., Patel, D., Singh, P. (2021). Antibiotic-resistant bacteria and gut microbiome communities associated with wild-caught shrimp from the United States versus imported farm-raised retail shrimp. *Scientific Reports*, 11(1), 3356.
- Singer, R., Porter, L., Thomson, D., Gage, M., Beaudoin, A., Whisnie, J. (2019). Raising animals without antibiotics: U.S. Producer and Veterinarian Experiences and Opinions. *Frontiers in veterinary science*, 6, -.
- Sosa, D., Escobar, A., Faure, R. (2013). Empleo de la oxitetraciclina en el cultivo del camarón con énfasis en la especie *Litopenaeus vannamei* y alternativas que favorecen la disminución o sustitución de su aplicación. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 14, 1-11.
- Soto-Rodríguez, S., Gomez-Gil, B., Lozano, R., Del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A., Romalde, J. (2012) Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “bright-red” Syndrome in the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1). 307-317.
- Soto-Rodriguez, S., Lozano-Olvera, R., Palacios-Gonzalez, A., Bolan-Mejia, C., & Rendon-Aguilar, K. (2019). Characterization and growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different virulence degrees that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(5), 1002–1015.
- Subirats, J., Sánchez, A., Borrego, C., Balcázar, J., Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *International Journal of Antimicrobial Agents* (48), 163-167.
- Surette, M., Wright, G. (2017). Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. *Annual Review of Microbiology*, 71, 309-329.
- Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. (2014) Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat Commun*. 17.
- Tahis, A. (2020) Biofilm y resistencia antimicrobiana. *AMC* 14(4). -.
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wrigth, G. (2010) The tetracycline resistome. *Cellular and molecular life Sciences*. (67), 417-731.
- Tuyub, J., Rendiz, D., Rojas, R., Gaxiola, G., Arena, M. (2014) Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Springer Plus*, 3:280.
- Wang, H., Hou, L., Liu, Y., Liu, K., Zhang, L., Huang, F., Wang, L., Rashid, A., Hu, A., Yu, C., (2021) Horizontal and vertical gene transfer drive sediment antibiotic resistoma in an urban lagoon system. *Journal of environmental sciences*. 102, 11-23
- Yao, C., Sano, M., Dan, S., Leelakriangsak, M., Lal, T. (2020) Postbiotics applications as infectious disease control agent in aquaculture. *Biocontrol science*, 25(1). (pp. 1-7).

- Ye, M.-Q.; Chen, G.-J.; Du, Z.-J. (2020) Effects of Antibiotics on the Bacterial Community, Metabolic Functions and Antibiotic Resistance Genes in Mariculture Sediments during Enrichment Culturing. *J. Mar. Sci. Eng.* 8, 604.
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Ahmad, B., Arockiaraj, J. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in aquaculture*, -, 1-25.
- Zhang Y, Guo Y, Qiu T, Gao M, Wang X. (2022) Bacteriophages: Underestimated vehicles of antibiotic resistance genes in the soil. *Front Microbiol.* 4(13).
- Zhang, J., Li, W., Chen, J., Wang, F., Qi, W., Li, Y., Xie, B. (2019). Effect of hydraulic conditions on the prevalence of antibiotic resistance in water supply systems. *Chemosphere*, (235), 354-364.
- Zhang, Q., Zhao, Y., Wang, C., Bai, Y., Wu, D., Wu, J., Tian, G., Shi, M., Mahmood, Q., Jin, R. (2019). Expression of the nirS, hzsA, and hdh genes and antibiotic resistance genes in response to recovery of anammox process inhibited by oxytetracycline. *Science of the Total Environment*, 681, 56-65.
- Zhang, Y., Li, J., Hu, Z., Li, J., Lu, H. (2022). Oxytetracycline stress stimulates antibiotic resistance gene proliferation and quorum sensing response of marine anammox bacteria in seawater-based wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 447.
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, T., Xu, N., Lu, T., Hong, W., Penuelas, J., Gillings, M., Wang, M., Gao, W., Qian, H. (2022). Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. *Nature Communications*, 13, -.
- Zhao, Y. Duan, C., Zhang, X., Chen, H., Ren, H., Yin, Y., Ye, L. (2018) “Insights into the gut microbiota of freshwater shrimp and its associations with the surrounding microbiota and environmental factors,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), pp. 946–956.
- Zhao, Y., Zhang, X., Zhao, Z., Duan, C., Chen, H., Wang, H., Ren, H., Yin, Y., Ye, L. (2018). Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp. *Journal of Hazardous Materials*, 350, 10-18.

11. ANEXOS

11.1. Preparación del Alimento.

El procedimiento para elaborar el alimento para camarón de acuerdo a Arriaga, D. *et al.*, (2021).

- I. Se mezclaron los macroingredientes en un mezclador tipo Hobart (modelo AT-200, Troy, OH, USA) y los microingredientes se añadieron después.
 - II. El aceite de pescado y la lectina de soya se añadieron hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.
 - III. Se pelletizó en un Twin-screw extruder (modelo TSE 20/40, Brabender ® GmbH & Co.KG, Alemania) bajo las siguientes condiciones 30, 50, 70, 100, 100, 100 °C para cada etapa con una presión de 3.3–5.0 bar.
 - IV. Los pellets se secaron con aire a 30°C durante 12 horas y se cortaron manualmente para dar un grosor aproximado de 2.5mm.
 - V. Se tamizó para remover las partículas finas.
 - VI. Se almacenaron en contenedores herméticos a 4°C hasta su uso.
- El antibiótico utilizado para la elaboración de la dieta fue Oxi – plus en polvo.

11.2. Extracción de ADN.

- I. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.
- II. Se agregaron 480 µL de EDTA 0.5 M y 120 µL 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.
- III. Se agregaron 350 µL de buffer CTAB a cada tubo, después, se agregaron 20 µL de proteinasa K en una concentración de 20 mg/mL y se agitó brevemente.
- IV. Se colocaron los tubos en un termoblock a 55°C hasta que el tejido estuvo lo

suficientemente digerido, en el caso de las muestras de sedimento cada 30 minutos se estuvo macerando el contenido con un pistilo estéril para desintegrar la materia orgánica que pudiera estar presente.

- V. Se agregaron 300 μ L de LiCl 5M, 5 μ L de RNAsa y se agitó por un minuto; posteriormente, se agregaron 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó brevemente.
- VI. La mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
- VII. Se extrajeron 500 μ L de la capa acuosa (parte superior) del centrifugado y se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
- VIII. Se añadieron 50 μ L 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.
- IX. Se centrifugó durante 20 min a 13,000 rpm a 4°C y se retiró el sobrenadante cuidadosamente para no perder el ADN sedimentado.
- X. Se agregaron 750 μ L 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.
- XI. Se dejó secar el pellet de ADN en campana de flujo laminar, una vez seco, se añadieron 20 μ L de agua de estéril para re-suspender el pellet.
- XII. Se guardaron las muestras a -20°C.

11.3. Preparación de librerías

Protocolo para la preparación de librerías en la plataforma IlluminaMiniseq de acuerdo a Enciso, J. (2019)

Se utilizó tagmentación, esta técnica utiliza para hacer cortes al azar en el ADN al tiempo que se añaden los adaptadores el resto del adaptador e índices (1(i7) y 2(i5)) se añade por PCR de ciclos limitados (18 ciclos).

1. Se ajustó el ADN a una concentración de 2 ng/ μ L

2. Se agregó a un tubo de PCR 2.5 μ L de Tagment DNA Buffer (TD) y 2 μ L del ADN ajustado a 2 ng/ μ L
3. Homogeneizar por pipeteo.
4. Se le añadió 1 μ L de Amplicon Tagment Mix (ATM), se mezcló por pipeteo y se centrifugo a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto
5. Se ejecutó el siguiente programa de PCR: 55°C por 5 minutos, mantener 10°C.
6. Se detuvo la reacción al agregar se agregó 1 μ L de Neutralize tagment buffer (NT) o 5 minutos en hielo, posteriormente se centrifugo a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto e incubo a temperatura ambiente por 5 minutos.
7. Para la indexación Se agregaron 1.7 μ L de cada índice y 3 μ L de master mix NPM, se mezcló por pipeteo, posteriormente se centrifugaron a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto.
8. Se ejecutó el programa de PCR: 72°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos (s), 18 ciclos de: 95°C por 10 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s y se mantuvo a 10°C.
9. Se utilizaron las Ampure XP beads se usaron a temperatura ambiente y se les dio vórtex por 30 s para resuspenderlas.
10. Se agregaron 0.6 μ L de perlas Ampure XP beads por cada μ L de muestra tagmentada que se tenía, con la finalidad de obtener fragmentos >300 pb.
11. Se mezcló lentamente por unas 10 veces aproximadamente e incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en la gradilla magnética por 2 minutos o hasta que aclaro la solución, sin sacar el tubo de la gradilla, se retiró el sobrenadante de cada tubo con la micropipeta cuidando de no tocar las perlas magnéticas.
12. Se hizo un lavado con 200 μ L etanol frio al 80% (recién preparado) se incubó por 30 s o hasta que la solución se aclaró y el sobrenadante (etanol) se retiró con micropipeta.
13. Los tubos se dejaron descubierto de 8 a 10 minutos para que se volatizara el etanol, después se adicionaron 15 μ L de Tris 10 Mm pH 8 o agua libre de nucleasas a cada tubo y se mezcló 10 veces aproximadamente para resuspender la muestra.
14. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 2 minutos, se colocaron los tubos nuevamente en la gradilla magnética por 2 minutos o hasta que se aclaró la muestra. Posteriormente, se transfirieron 14 μ L del sobrenadante a un tubo limpio de 0.2 mL y almaceno a 4°C.
15. El producto final del purificado se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

16. Para la normalización de las muestras, se calculó la concentración nanomolar (nM) basado en el tamaño de los amplicones de ADN con la siguiente formula: Las bibliotecas se diluyeron (utilizando buffer de resuspensión RSB, Tris 10 mM pH 8.5 o agua libre de nucleasas) a 10 nM.
17. Se tomaron 5 µl de ADN diluido a 10 nM de cada biblioteca, las bibliotecas se agruparon con índices únicos dependiendo del tamaño de las librerías y por último mezclar. El pool purificado se usó (utilizando buffer de resuspensión RSB, Tris 10 mM pH 8.5 o agua libre de nucleasas) a 4 nM.
18. Para la desnaturalización final de la librería las bibliotecas agrupadas se desnaturalizaron con NaOH 0.2 N (recién preparado), a la siguiente proporción: 5 µl del pool purificado a una concentración de 4 nM y 5 µl de NaOH 0.2 N, se mezcló la solución mediante vórtex y centrifugó a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto.
19. Durante 5 minutos se incubó a temperatura ambiente, con el fin de desnaturalizar el ADN a hebras simples. La biblioteca desnaturalizada se preparó a 20 pM de la siguiente manera: 10 µl de ADN desnaturalizado más 990 µl del Buffer de hibridación HT1 (previamente descongelado). El ADN desnaturalizado a 20 pM se colocó en hielo hasta que esté listo para proceder a la dilución final.
20. La biblioteca Phix se preparó a 4 nM, se combinaron los siguientes volúmenes: 2 µl de control Phix 10 nM más 3 µl de agua libre de nucleasas. Para desnaturalizar el control PhiX 4 nM con NaOH 0.2 N, se siguió la siguiente proporción: 5 µl de control Phix 4 nM con 5 µl de NaOH 0.2 N, se homogenizó la solución mediante vórtex, para centrifugarlos a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto.
21. Para desnaturalizar la biblioteca y convertirlas en hebras simples se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.
22. La biblioteca desnaturalizada del control Phix se preparó a 20 pM de la siguiente manera: 10 µl del control PhiX desnaturalizado se mezcló con 990 µl del Buffer de hibridación HT1 (previamente descongelado). El ADN desnaturalizado a 20 pM se colocó en hielo hasta que esté listo para proceder a la dilución final.
23. Una vez que se tienen las bibliotecas y el control PhiX desnaturalizados y a 20 pM, se procedió a realizar la combinación, los volúmenes que se adicionen de cada biblioteca dependerán de las necesidades de cobertura

24. Una vez combinadas las bibliotecas, se diluyó el pool final de 20 pM a 2 pM, para obtener la concentración deseada se combinan los siguientes volúmenes: 60 µl de pool final a 20 pM con 540 µl de buffer de hibridación HT1, el pool final se coloca en hielo hasta que esté listo, para proceder con la desnaturalización por calor.
25. La desnaturalización térmica se realizó antes de cargar la biblioteca en el cartucho de reactivo del Miniseq, con la finalidad de asegurar una carga eficiente en la celda de flujo. Siguiendo el protocolo que se describe a continuación: El pool final se incubó a 96°C durante 2 minutos. Después de la incubación, el tubo se invirtió 1 o 2 veces para mezclar, posteriormente se colocó el tubo en agua con hielo por 5 minutos. Para finalizar se cargaron 500 µl del pool final en el cartucho de reactivo del Miniseq.