

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Caracterización de la microbiota de un producto probiótico

Doménica Daniela Molina Garcés

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Caracterización de la microbiota de un producto probiótico

Doménica Daniela Molina Garcés

Nombre del profesor, Título académico: Paúl Cárdenas, PhD.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Doménica Daniela Molina Garcés

Código: 00124627

Cédula de identidad: 1724874928

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La acuicultura se ha convertido en una práctica importante a nivel mundial, representando cerca del 90% de la producción mundial de mariscos. Esta es la principal razón por la que es esencial tener conocimiento sobre los microorganismos que se encuentran asociados con los sistemas acuícolas. Solo así se logrará superar los desafíos a los que se ha enfrentado la acuicultura en los últimos años, por ejemplo los brotes de enfermedades causados por bacterias patógenas. La adición de suplementos probióticos es una alternativa que ha ido ganando gran relevancia durante los últimos años para combatir y controlar la presencia de patógenos en estos sistemas. Estos pueden definirse como suplementos que contienen microorganismos vivos los cuales confieren beneficios al huésped animal mediante el mejoramiento de su balance microbiano. El objetivo de este estudio fue caracterizar las comunidades microbianas presentes en estos tipos de productos que son incorporados con frecuencia a los sistemas acuícolas como alternativa al uso de antibióticos. Se analizaron dos muestras de suplementos probióticos. Los suplementos fueron filtrados previo a la extracción de ADN. Luego se utilizó el kit DNeasy® PowerSoil® para extraer el ADN de las muestras. El ADN extraído fue secuenciado utilizando la plataforma Illumina (16S Metagenomics Sequencing). Los resultados de la secuenciación fueron analizados mediante el uso de la plataforma bioinformática QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), en la que se calculó la abundancia relativa y una lista de la taxonomía encontrada en ambas muestras. Tanto en la muestra DM_USFQ_001 como en la muestra DM_USFQ_002 se encontró que el filo más dominante fue *Proteobacteria*, representando el 91.83% y 74.26% de la microbiota total. De igual manera, en la muestra DM_USFQ_001 se reportó que el 74.32% de organismos presentes pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* mientras que en la muestra DM_USFQ_002 tan solo el 6.60% representaba a esta familia. Adicionalmente, en la muestra DM_USFQ_002 se pudo encontrar que el 18.36% representaba al género *Rizhobium* y el 14.70% a la especie *Gulbenkiania mobilis*. Los resultados del análisis evidenciaron que los microorganismos encontrados en las muestras no son los más utilizados a nivel comercial, sin embargo presentan un gran potencial en el tratamiento de enfermedades y mantenimiento de los sistemas acuícolas. El presente estudio podría impulsar el desarrollo de futuras investigaciones sobre las interacciones microbianas y la ecología en este tipo de sistemas.

Palabras clave: microbiota, microbioma, acuicultura, sistemas acuícolas, microorganismos, probióticos, comunidades microbianas, frecuencia relativa.

ABSTRACT

Aquaculture has become an important practice globally, accounting for about 90% of the world's seafood production. This is the main reason why it is essential to acquire knowledge about the microorganisms that are associated with aquaculture systems. This is the only way to overcome the challenges faced by aquaculture in recent years, such as disease outbreaks caused by pathogenic bacteria. The addition of probiotic supplements is an alternative that has been attaining great relevance over the last few years to tackle and control the presence of pathogens in these systems. These can be defined as supplements containing living microorganisms, that confer benefits on the animal host by improving its microbial balance. The objective of this study was to characterize existing microbial communities in this type of products which are frequently incorporated into aquaculture systems as an alternative to the use of antibiotics. Two samples of probiotic supplements were analysed. The supplements were filtered prior to DNA Extraction. The DNeasy® PowerSoil® kit was used to extract DNA from the samples. The DNA extracted was sequenced using the Illumina platform (16S Metagenomics Sequencing). The sequencing results were analysed using the bioinformatics platform QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), which calculated the relative abundance and a list of the taxonomy for both samples. On both, DM_USFQ_001 and DM_USFQ_002 samples, the most dominant phylum found was *Proteobacteria*, accounting for 91.83% and 74.26% of the total microbiota. Likewise, it was reported that in the DM_USFQ_001 sample 74.32% of organisms found belonged to the *Enterobacteriaceae* family, while in the DM_USFQ_002 sample only 6.60% was representing this family. In addition, in the DM_USFQ_002 sample it was found that 18.36% was representing the genus *Rizhobium* and 14.70% was representing the species *Gulbenkiania mobilis*. The results of the analysis revealed that microorganisms found in the samples are not the most used commercially, however they have great potential in the treatment of diseases and preservation of aquaculture systems. This study could lead the development of future research on microbial interactions and ecology in such systems.

Keywords: microbiota, microbiome, aquaculture, aquaculture systems, microorganisms, probiotics, microbial communities, relative frequency.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	10
2	MÉTODOS	13
	2.1 Extracción de ADN.....	13
	2.2 Análisis bioinformático.....	13
3	RESULTADOS.....	15
4	DISCUSIÓN	18
5	CONCLUSIONES	21
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
	ANEXO A: ASIGNACIÓN TAXONÓMICA A NIVEL DE GÉNERO Y ESPECIE	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de ADN.	27
--------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia relativa a nivel de filo	27
---	----

1 INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una de las áreas de mayor crecimiento a nivel mundial, particularmente en Asia, ya que representa aproximadamente el 90% de la producción global. Sin embargo, los brotes de enfermedades que se presentan de manera constante en estos sistemas afectan al desarrollo económico de las poblaciones locales. A pesar de que se ha logrado controlar estos brotes mediante el uso de antibióticos y químicos, la utilización de estos ha creado controversia por sus impactos negativos como el desarrollo de resistencia a fármacos, acumulación de residuos, entre otros. Por lo que, los productores se encuentran en busca de métodos alternativos que sean capaces de mantener un ambiente microbiano saludable en estos sistemas para así mantener la salud de los organismos que son cultivados (Sahu et al., 2008)

El uso de probióticos es uno de los métodos que se encuentra ganando relevancia en el control de posibles patógenos. Estos se pueden definir como suplementos que contienen microorganismos vivos los cuales confieren beneficios al huésped animal mediante el mejoramiento de su balance microbiano (Fuller, 1989). Los probióticos forman parte fundamental en la degradación de materia orgánica reduciendo así la formación de lodos y por lo tanto la calidad del agua será mejor, reduciendo enfermedades, olores y por último mejorando la producción (Sahu et al., 2008).

Durante varios años se ha examinado una variedad de probióticos para su uso en la acuicultura, los cuales se encuentran normalmente compuestos por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, y se ha comprobado su éxito en una amplia gama de invertebrados y vertebrados. Hasta la fecha, los probióticos han sido empleados en el agua y como alimento artificial y vivo (rotíferos y artemia). Entre los organismos que se han reportado en este tipo de suplementos durante experimentos in vitro, in vivo y de campo se puede encontrar a

especies del género *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y otras bacterias ácido lácticas que no han sido nombradas (Irianto & Austin, 2002).

Se han reportado varios beneficios al momento de utilizar probióticos como la producción de compuestos inhibidores, es decir que los microorganismos liberan una variedad de compuestos químicos que son inhibidores para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, evitando su propagación (De Schryver et al., 2012). Otro de los beneficios es que estos microorganismos compiten con los patógenos por la adhesión a sitios y alimento en la superficie epitelial del tracto digestivo, previniendo así la colonización de este . De igual manera, se encuentran en competencia por los nutrientes con los microorganismos patógenos. Además, son considerados como una fuente de nutrientes y contribuidores de enzimas que ayudan a los procesos de digestión de animales acuáticos (Balcázar et al., 2006). Igualmente, estimulan el mejoramiento de la respuesta inmune e influyen de manera positiva sobre la calidad del agua, ya que son capaces de participar en el retorno de nutrientes orgánicos dentro de los sistemas. Asimismo, ciertos tipos de bacterias utilizados como probióticos poseen actividades antivirales, aunque en la actualidad no se conoce el mecanismo exacto de cómo lo realizan (Sahu et al., 2008).

La metagenómica se encarga de estudiar las comunidades microbianas que han sido muestreadas a partir de su entorno natural de manera directa, sin la realización de un cultivo previo (Shah et al., 2011). Se conoce que más del 99.8% de los microbios presentes en algunos ambientes no pueden ser cultivados, por lo que la metagenómica es una opción para el estudio de la composición filogenética, capacidad metabólica, diversidad de especies, composición filogenética y diversidad funcional (Shah et al., 2011).

La microbiota se podría describir como un conjunto de formas de vida microbiana (incluyendo bacterias, arqueas, eucariotas y virus) que se encuentran dentro de un hábitat o huésped (Sommer & Bäckhed, 2013). Por otra parte, la palabra microbioma ha sido utilizada para describir a los componentes microbianos de los ecosistemas, es decir que esta representa la diversidad ecológica total de los microorganismos (comensales, patógenos y simbióticos, entre otros.) que abarcan ciertos ecosistemas o hábitats (Saleem, 2015). La composición de la comunidad y su abundancia son distintas cuando se compara diferentes hábitats en el ecosistema global. El microbioma se encarga de realizar una variedad de procesos ecológicos, biogeoquímicos y biológicos, por lo que los estudios de este y de su rol en el funcionamiento de los ecosistemas se han vuelto un campo de investigación bastante solicitado (Saleem, 2015).

Específicamente, el secuenciamiento metagenómico del ARN ribosomal 16S se refiere al análisis genómico de los filotipos del ARN ribosomal 16S a partir del ADN, el cual es extraído de manera directa desde comunidades bacterianas que se encuentran en muestras clínicas o ambientales (Grice & Segre, 2011). Los marcadores como el 16S en bacterias y archaeas son constantemente utilizados para caracterizar la diversidad filogenética y composición taxonómica de muestras ambientales (Langille et al., 2013).

Mediante el uso de diferentes tecnologías de secuenciación y focalización de diferentes subregiones de los genes 16S rARN se puede obtener como resultado la distinta composición de las comunidades microbianas presentes en una muestra (Yang et al., 2016). El secuenciamiento metagenómico busca muestrear todos los genes de una comunidad y es capaz de producir perfiles funcionales metabólicos detallados (Langille et al., 2013).

Es fundamental el estudio de la microbiota en este tipo de sistemas debido a que esta puede generar un impacto grande sobre la salud de los organismos que viven en estos

sistemas, además podría permitir conocer el origen de los brotes de enfermedades y brindar mejores soluciones para estos eventos. El conocimiento sobre las comunidades microbianas en términos de dinámica, funcionalidad, composición y efectos sobre parámetros ambientales importantes puede ser altamente útil para el mejoramiento del diseño operacional. Para así lograr que la crianza de los organismos que habitan estos sistemas sea sostenible. El propósito de este estudio fue analizar la composición microbiana presente en dos muestras de suplementos probióticos utilizados en la industria de la acuicultura.

2 MÉTODOS

2.1 Extracción de ADN

Primero, se tomaron dos muestras (DM_USFQ_001 y DM_USFQ_002) de suplementos probióticos utilizados en sistemas acuícolas, estas fueron recolectadas en tubos estériles respectivamente. Para el proceso de extracción de ADN a partir de las muestras se procedió a utilizar el kit DNeasy® PowerSoil® (QIAGEN, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el procesamiento de la muestra se realizó un proceso de filtrado previo, para lo cual se utilizó un filtro Millipore de 0.22 μm y 47 mm, el cual fue colocado en el embudo de filtración. Posterior a la filtración, los filtros fueron introducidos dentro de tubos con microperlas (PowerBead Tube) provistos en el kit de extracción.

Después, el ADN fue cuantificado mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, Estados Unidos). Luego, las muestras fueron enviadas para su secuenciación a Macrogen Korea, donde se utilizó la plataforma Illumina (16S Metagenomics Sequencing), el tipo de lectura fue de extremo emparejado (paired-end) y la longitud de la lectura fue de 300pb. Después de haber realizado este proceso, se obtuvieron archivos fastq, los cuales contenían las secuencias crudas de cada una de las muestras.

2.2 Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático, se instaló la plataforma de análisis de microbiota QIIME2 (versión 2019.10), siguiendo las instrucciones del desarrollador (Bolyen et al., 2019). Para el análisis de las muestras, primero se procedió a crear un archivo de “sample-metadata.tsv” usando los datos colectados de cada una de las muestras e importándolos al directorio de trabajo. Luego, para importar los archivos que contenían las lecturas del secuenciamiento, se creó un archivo conocido como “manifest”, donde se detalló el nombre de cada archivo demultiplexado de cada muestra, indicando la extensión del archivo “fastq.gz”, y su directorio de ubicación; y bajo la terminal de linux mediante la utilización del comando *qiime tools import* se importó el manifiesto y se logró obtener el artefacto “paired-end-demux.qza”.

Una vez obtenido este artefacto “.qza” (archivo reconocido por QIIME2) se procedió a generar un resumen de los resultados del demultiplex, este archivo tiene la característica que los barcodes y adaptadores ya fueron removidos. Utilizando el comando *qiime demux summarize* se obtuvo el archivo para visualización “paired-end-demux.qzv”. La visualización de los archivos “.qzv” se la realizó mediante la utilización del comando *qiime tools view*, permitiendo observar la cantidad de secuencias obtenidas por muestra y la distribución de la calidad del secuenciamiento

Para el control de calidad de las secuencias y construcción de la tabla de ASVs se hizo uso del plugin DADA2, este se encargó de detectar, corregir y filtrar errores en las lecturas generadas durante el secuenciamiento. Además, se generó una tabla amplicon sequence variant (ASV), en la cual se registró el número de veces que se observó cada variante exacta de secuencia de amplicón en cada muestra. Para esto se empleó el comando *qiime dada 2 denoise paired*, donde se decidió cortar todas las bases iniciales antes de 36 y se truncó las secuencias en 290 bases (parámetros elegidos en base a los gráficos de calidad

generados en el archivo “paired-end-demux.qzv”). Se obtuvieron los siguientes artefactos: “stats.qza”, “table.qza” y “rep-seqs.qza”.

Después usando el comando *qiime data tabulate* y el archivo “stats.qza”, se generó la tabla que contenía las estadísticas de la filtración (“stats.qzv”), la cual fue posible de visualizar utilizando el comando mencionado en la sección anterior. Posteriormente, se procedió a generar el resumen de la tabla de ASVs para lo cual se usó los comandos *qiime feature-table summarize* y *qiime feature-table tabulate seqs*, una vez realizado esto se obtuvo dos archivos de visualización, el primero fue “table.qzv” y el segundo “rep-seqs.qzv”.

Por otra parte, para realizar el análisis taxonómico, es decir determinar la composición taxonómica de las muestras y relacionarla con la metadata de la muestra, el primer paso fue asignar taxonomía a la tabla de ASVs generada anteriormente, mediante el uso del clasificador Naive Bayes, la base de datos Greengenes 13_8 99% OTUs y el plugin *q2-feature-classifier*. A continuación, se pudo observar la composición taxonómica de las muestras, bajo un diagrama de barras interactivo mediante la utilización del comando *qiime taxa barplot*.

3 RESULTADOS

Previo a la secuenciación, el ADN de las dos muestras fue cuantificado, obteniendo así resultados con respecto a la concentración y pureza de la muestra que se encuentran indicados en la **Tabla 1**.

En la **Tabla 1** se indica que la concentración de ácidos nucleicos en la muestra DM_USFQ_001 fue de 27.5 ng/μL, mientras que la de la muestra DM_USFQ_002 fue de 11.6 ng/μL. La pureza de las muestras se encontraba indicada en dos radios: 260/280 y 260/230, para la muestra DM_USFQ_001 el radio 260/280 indicaba un valor de 1.94 y para

la muestra DM_USFQ_002 este valor fue de 2.22, indicando una pureza óptima. Sin embargo es posible que en la muestra DM_USFQ_002 exista la presencia de ARN debido a su valor mayor a 2.1. Con respecto al radio 260/230 se obtuvo un valor de 3.23 para la muestra DM_USFQ_001 y un valor de 0.40 para la muestra DM_USFQ_002, ambos valores indican que hubo una posible contaminación con sales o fenoles.

Los resultados del “demultiplex” determinaron la cantidad de secuencias que se obtuvo por muestra y también un resumen de la distribución de las calidades de la secuencia en cada posición de los datos de secuencia. La muestra DM_USFQ_001 presentaba 116,700 secuencias, mientras que dentro de la muestra DM_USFQ_002 se encontró la presencia de 136,068 secuencias. Por otro lado, en el resumen de la distribución de las calidades de las secuencias se pudo apreciar que en la mayoría de posiciones dentro de los datos de secuencia el puntaje de calidad era mayor a 30, indicando un valor aceptable de phred score.

En la tabla de ASVs se pudo encontrar que el número de ASVs en la muestra DM_USFQ_001 fue de 74,138, en tanto que la muestra DM_USFQ_002 presentó un número de ASVs de 72,136. De igual manera, se halló que la longitud de las secuencias encontradas en ambas muestras fue de 254 pares de bases.

En el diagrama de barras interactivo generado en QIIME 2 (datos no mostrados), se pudo encontrar que en el nivel taxonómico “Reino”, el 100% de organismos presentes en la muestra DM_USFQ_001 pertenecían al reino Bacteria mientras que en la muestra DM_USFQ_002 el 99.98% pertenecía a este mismo reino y el 0.02% pertenecía al reino Archaea.

De igual manera, se analizó la frecuencia relativa con respecto a la asignación

taxonómica a nivel de “Filo” como se observa en la **Figura 1**, donde se encontró que el 91.83% de organismos presentes en la muestra DM_USFQ_001 representaban al filo *Proteobacteria*, el 5.76% al filo *Bacteroidetes*, el 2.33% al filo *Firmicutes* y el 0.08% no fue asignado. En cambio en la muestra DM_USFQ_002 se encontró que el 74.26% pertenecía al filo *Proteobacteria*, 22.63% a *Bacteroidetes*, 2.81% a *Firmicutes*, 0.20% no pudo ser asignado y 0.096% a los filos, *Actinobacteria*, *Euryarchaeota* y *Acidobacteria*.

También se analizó la abundancia relativa con respecto a la asignación taxonómica “Clase” (datos no mostrados), en la muestra DM_USFQ_001 se encontró que el 84.49% de organismos representaban a la clase *Gammaproteobacteria*, 4.04% a *Alphaproteobacteria*, 3.29% a 4.31% a *Flavobacteria* y 2.28% a *Clostridia*. Por el contrario, en la muestra DM_USFQ_002 el 22.50% representaba a *Betaproteobacteria*, 21.76% a *Alphaproteobacteria*, , 20.03% no pudo ser asignado y 15.09% tampoco fue asignado dentro de una clase.

Solo fue posible la asignación de algunos ASVs hasta “Género” y “Especie”, en la muestra DM_USFQ_001 se encontró la presencia de 10% de organismos pertenecientes al género *Pseudoxanthomonas*, 4.31% a la familia *Flavobacteriaceae* sin asignación de género, 3.50% a la familia *Hyphomicrobiaceae* y 3.13 % a la familia *Alcaligenaceae*. De igual manera, se evidenció que el 74.32% de organismos pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, sin embargo no se logró realizar una asignación a un nivel mayor. En la muestra DM_USFQ_002 se pudo evidenciar que el 20,03% no poseía asignación de género o especie, 18.36% de los organismos pertenecían al género *Rhizobium*, 15.09% no poseía asignación de género o especie y 14.70% de organismos pertenecían a la especie *Gulbenkiania mobilis*. Información mayormente detallada sobre este nivel taxonómico se encuentra descrita en el **ANEXO A**.

4 DISCUSIÓN

Los microorganismos son de gran importancia para la acuicultura debido a su capacidad de reciclar nutrientes, degradar materia orgánica y prevenir enfermedades en los individuos que habitan estos sistemas (Bentzon-Tilia et al., 2016). Por esta razón se considera que los estudios de la microbiota en productos como los probióticos, ayudarán a comprender de mejor manera su funcionamiento e influencia sobre el mejoramiento de la calidad del agua y prevención del desarrollo de infecciones microbianas.

Las cepas microbianas que han sido evaluadas como probióticos para la acuicultura provienen de diferentes linajes filogenéticos, sin embargo, es importante mencionar que la mayoría de estas cepas pertenecen a dos filos bacterianos: *Proteobacteria* (*Shewanella* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., etc.) y *Firmicutes* (*Carnobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Lactococcus* spp., etc.) (Dittmann et al., 2017). En este caso se podría indicar que los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura, debido a que tanto en la muestra DM_USFQ_001 como en la muestra DM_USFQ_002 se encontró que el filo más dominante fue *Proteobacteria*, representando el 91.83% y 74.26% de la microbiota total. Aunque, la presencia de *Firmicutes* en las muestras no fue tan abundante como la de *Proteobacteria*, este filo se encuentra representando cerca del 3% en ambas muestras.

En la muestra DM_USFQ_001 se reveló la presencia del género *Pseudoxanthomonas* (10%), las especies de este género han sido identificadas como grandes candidatos en el mantenimiento de la calidad del agua en la acuicultura, especialmente en los sistemas de cultivo de camarón debido a su capacidad de oxidar el sulfuro de hidrógeno tóxico a sulfato menos tóxico (Vijayan et al., 2017). Por lo que se podría recomendar su uso en piscinas camaroneras para el mejoramiento de su producción.

Igualmente, se pudo identificar que en la muestra DM_USFQ_001 el 4.31 % de la microbiota pertenecía a la familia *Flavobacteriaceae*. En una investigación realizada por Dan y Hamasaki (2014) se evaluó la viabilidad de probióticos en el control de signos de necrosis larval del cangrejo *Scylla serrata* mediante la utilización de cinco cepas de bacterias de la familia *Flavobacteriaceae*. En este se logró observar que los signos de necrosis larval fueron suprimidos de manera significativa. Indicando que este tipo de bacterias podrían ser utilizadas para el mejoramiento de la tasa de supervivencia de los cangrejos y así aumentar su producción (Dan & Hamasaki, 2014).

En la muestra DM_USFQ_002 se pudo encontrar que el 14.70% de la microbiota representaba a la especie *Gulbenkiania mobilis*. Se ha encontrado evidencia de la presencia de esta bacteria en ambientes acuáticos como aguas termales o aguas municipales tratadas, más no en suplementos utilizados en el campo de la acuicultura (Saxena et al., 2015). De igual manera, se pudo encontrar que el 6.60% de la microbiota de la muestra DM_USFQ_002 y el 74.32% de la microbiota de la muestra DM_USFQ_001, representaban a la familia *Enterobacteriaceae*.

En un estudio realizado por Burbank et al. (2011), se encontró que especies del género *Enterobacter*, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* fueron capaces de inhibir la presencia de *Flavobacterium psychrophilum*. Este ha sido identificado como un agente causante de la enfermedad del agua fría. Especies de este género pudieron reducir la mortalidad in vivo de la trucha arcoíris, crecer efectivamente, sobrevivir y colonizar el tracto digestivo de esta especie (Burbank et al., 2011). Indicando su aptitud para ser utilizados como probióticos.

Por otra parte, en otro estudio realizado con truchas arcoíris se evaluó los efectos de

suplementos probióticos en la prevención y tratamiento de la yersiniosis (Capkin & Altinok, 2009). En este se pudo evidenciar que el uso de *Enterobacter cloacae* y *Bacillus mojavensis* estimuló la inmunidad celular, protegiendo a esta especie de infecciones causadas por bacterias patógenas. Además se observó un incremento significativo en su tamaño (Capkin & Altinok, 2009).

Adicionalmente, se ha podido comprobar que miembros de la familia *Enterobacteriaceae* forman parte de la microflora natural de especies de peces saludables (Sihag & Sharma, 2012). Por lo que es muy probable que se este tipo de bacterias hayan sido aisladas del intestino de diferentes especies acuáticas y utilizadas en este tipo de productos por sus propiedades antibacteriales (Sihag & Sharma, 2012).

Es posible que especies de esta familia estén siendo utilizadas como suplementos probióticos no solo en el alimento sino también en el agua. Estudios han logrado comprobar que especies del género *Enterobacter* en combinación con otros microorganismos son capaces de mejorar procesos naturales (Boyd & Gross, 1998). Entre estos se encuentran procesos como nitrificación, degradación de materia orgánica, desnitrificación, eliminación de amoníaco, degradación de contaminantes tóxicos y oxidación del sulfuro (Boyd & Gross, 1998).

En la muestra DM_USFQ_002 también se reportó que el 18.36% de la microbiota pertenecía al género *Rhizobium* de la familia *Rhizobiaceae*, las especies de este género son organismos fitopatogénicos que se encuentran normalmente en suelos, agua y plantas (Wisplinghoff, 2017), sin embargo no se ha reportado su presencia en sistemas acuícolas ni su uso como suplemento probiótico. Aunque, si se tiene conocimiento sobre su efecto promotor en el crecimiento de microalgas, con las cuales crean relaciones simbióticas (Rivas

& Riquelme, 2012). Esta asociación entre bacteria y microalga puede ser aplicada en tanques de cultivo donde existe grandes acumulaciones de nitrógeno como resultado de la adición de alimento y excreción de organismos mantenidos en altas densidades, uno de los problemas más comunes en el cultivo intensivo de camarones y otros moluscos (Rivas & Riquelme, 2012). Por lo que se podría indicar que a pesar de no ser un probiótico oficialmente comercializado o usado, habría la posibilidad de que sea implementado como tal en conjunto con la adición de microalgas.

Si bien los resultados de este estudio indican que la mayoría de microorganismos presentes en las muestras analizadas no pertenecen a grupos de bacterias comúnmente utilizadas y comercializadas en la acuicultura como lo son *Bacillus*, *Carnobacterium* y *Lactobacillus* (Balcázar et al., 2006), se puede evidenciar que estos podrían tener un gran potencial para ser utilizados como suplementos dentro de este tipo de sistemas. Estos probióticos podrían mejorar la calidad del agua, la respuesta inmune y procesos digestivos de los organismos. Además podrían prevenir brotes de enfermedades infecciosas. Por esta razón, se considera la importancia de continuar realizando estudios sobre la microbiota presente en este tipo de suplementos y determinar su efecto sobre los organismos que residen en estos sistemas.

5 CONCLUSIONES

El secuenciamiento de la microbiota de suplementos probióticos utilizados en la acuicultura permitió la identificación de comunidades microbianas altamente diversas, esta información obtenida es fundamental para impulsar futuras investigaciones con los microorganismos identificados y comprender los efectos de estos sobre los sistemas acuícolas. Todo esto permitirá encontrar nuevas metodologías que pueden ser utilizadas en el tratamiento de brotes de enfermedades infecciosas. En ambas muestras, *Proteobacteria* y

Bacteroidetes fueron los filos más dominantes representando más del 90% de la microbiota total.

En la muestra DM_USFQ_001 se encontró que la familia mayormente dominante fue *Enterobacteriaceae* debido a que representaba cerca del 75% de la microbiota total, seguida de la familia *Xhantomonadaceae* (género *Pseudoxanthomonas*) representando el 10%, *Flavobacteriaceae* con 4.31%, *Hyphomicrobiaceae* con 3.50% y *Alcaligenaceae* con 3.13%.

En la muestra DM_USFQ_002 se encontró que un OTU que no logró ser asignado hasta género y especie presentaba una mayor dominancia, representando el 20% de la microbiota, seguido de la familia *Rhizobiaceae* (género *Rhizobium*) con 18.36%, un OTU que no logró ser asignado hasta género y especie con 15.09%, *Neisseriaceae* (*Gulbenkiania mobilis*) con 14.70% y *Enterobacteriaceae* con 6.60%.

La acuicultura es uno de los sectores productivos de más rápido crecimiento en el mundo y el aumento de la productividad de este sector es esencial para el cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible, y esto solo se podrá lograr si se continúa con la investigación de los microorganismos relacionados con estos sistemas.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, *114*(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E. C., & Gram, L. (2016). Monitoring and managing microbes in aquaculture - Towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*, *9*(5), 576–584. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12392>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Boyd, C. E., & Gross, A. (1998). Use of Probiotics for Improving Soil and Water Quality in Aquaculture Ponds. *Department of Fisheries and Allied Aquacultures*, 1–105.
- Burbank, D. R., Shah, D. H., LaPatra, S. E., Fornshell, G., & Cain, K. D. (2011). Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *321*(3–4), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.004>
- Capkin, E., & Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(4), 1147–1153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04080.x>

- Dan, S., & Hamasaki, K. (2014). Evaluation of the effects of probiotics in controlling bacterial necrosis symptoms in larvae of the mud crab *Scylla serrata* during mass seed production. *Aquaculture International*, 23(1), 277–296. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9815-1>
- De Schryver, P., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., & Bossier, P. (2012). Managing the microbiota in aquaculture systems for disease prevention and control. In *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 394–418). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095732.3.394>
- Dittmann, K. K., Rasmussen, B. B., Castex, M., Gram, L., & Bentzon-Tilia, M. (2017). The aquaculture microbiome at the centre of business creation. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1279–1282. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12877>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25(11), 633–642. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

- Rivas, M., & Riquelme, C. (2012). Probiotic Biofilms. In *Probiotics*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/50124>
- Sahu, M. K., Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., & Kannan, L. (2008). Probiotics in aquaculture: Importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0024-3>
- Saleem, M. (2015). *Microbiome Ecosystem Ecology: Unseen Majority in an Anthropogenic Ecosystem* (pp. 1–11). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11665-5_1
- Saxena, R., Chaudhary, N., Dhakan, D. B., & Sharma, V. K. (2015). Draft genome sequence of *Gulbenkiania mobilis* strain MB1, a sulfur-metabolizing thermophile isolated from a hot spring in Central India. *Genome Announcements*, 3(6).
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01295-15>
- Shah, N., Tang, H., Doak, T. G., & Ye, Y. (2011). Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. *Pacific Symposium on Biocomputing 2011, PSB 2011*, 165–176. https://doi.org/10.1142/9789814335058_0018
- Sihag, R. C., & Sharma, P. (2012). Probiotics: The new eco friendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(2), 72–103. <https://doi.org/10.3923/jfas.2012.72.103>
- Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227–238.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Vijayan, K. K., Makesh, M., Otta, S. K., Patil, P. K., Poornima, M., & Alavandi, S. V. (2017). *Prophylaxis in aquaculture*. Central Institute of Brackishwater Aquaculture.

www.ciba.res.in

Wisplinghoff, H. (2017). *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. In *Infectious Diseases* (pp. 1579-1599.e2). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00181-7>

Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135.

<https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Cuantificación de ADN.

	Muestras	
	DM_USFQ_001	DM_USFQ_002
Concentración (ng/ μL)	27.5	11.6
260/280	1.94	2.22
260/230	3.23	0.40

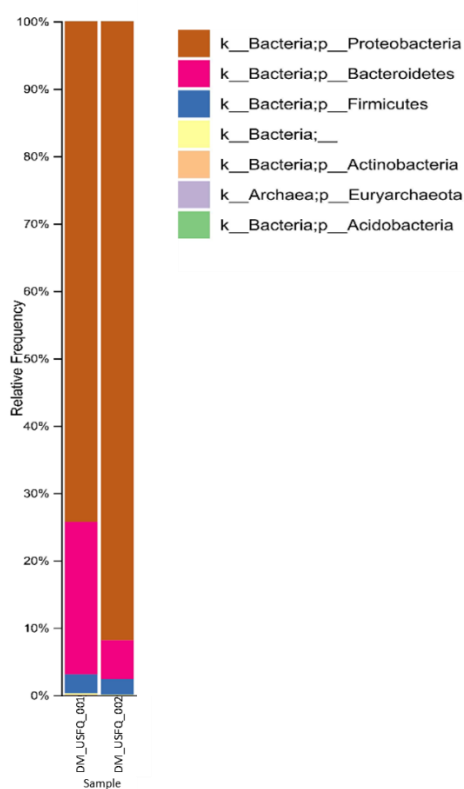


Figura 1. Frecuencia relativa a nivel de filo

ANEXO A: ASIGNACIÓN TAXONÓMICA A NIVEL DE GÉNERO Y ESPECIE

Reino	Filo	Familia	Género	Especie	Frecuencia Relativa (%)		
					DM_USF Q_001	DM_USF Q_002	
Archaea	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteriaria</i>	<i>Methanobacterium</i>	<i>bryantii</i>	0	0.01	
Bacteria	-	-	-	-	0.08	0.20	
	<i>Acidobacteriaria</i>	-	-	-	0	0.01	
	<i>Actinobacteria</i>	-	-	-	-	0.01	0
		<i>Microbacteriaceae</i>	-	-	-	0	0.01
		<i>Propionibacteriaceae</i>	-	-	-	0	0.02
	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Eggerthella</i>	-	-	0	0.03	
	<i>Bacteroidetes</i>	-	-	-	-	0.02	15.09
		-	-	-	-	0.076	7.15
		-	-	-	-	0.01	0
		<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Macellibacteroides</i>	<i>fermentans</i>	0	0.06	
			<i>Petrimonas</i>	<i>sulfuriphila</i>	0.61	0	
		-	-	-	-	0	0.01
		<i>Flavobacteriaceae</i>	-	-	4.31	0	
		<i>Weeksellaceae</i>	<i>Elizabethkingia</i>	-	0.01	0.04	
		<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Mucilaginibacter</i>	-	0	0.01	
			<i>Pedobacter</i>	-	0.01	0.07	
		<i>Chitinophagaceae</i>	-	-	0	0.20	
			<i>Ferruginibacter</i>	<i>lapsinansis</i>	0	0.01	
		<i>Filimonas</i>	<i>lacunae</i>	0.04	0		
	<i>Firmicutes</i>	-	-	-	-	0	0.19
		-	-	-	-	0.05	0
		-	-	-	-	0.01	0.63
		<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>	<i>weihenstephanensis</i>	0	0.13	
		-	-	-	0	0.33	
		<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	-	0	0.18	
			<i>Clostridium</i>	<i>cellulovorans</i>	0	0.03	
		<i>Lachnospiraceae</i>	-	-	1.34	0.03	
			<i>Clostridium</i>	-	0.50	0	
			<i>Desulfotomaculum</i>	<i>guttoideum</i>	0.09	0	
	<i>Ruminococcaceae</i>	-	-	0.29	0		

		<i>ae</i>	<i>Clostridium</i>	-	0	0.02
			<i>Sporobacter</i>	<i>termitidis</i>	0	0.03
		<i>Veillonaceae</i>	-	-	0	1.09
			<i>Anaerospora</i>	<i>hongkongensis</i>	0.06	0.13
			-	-	0	20.03
			-	-	0	0.12
		<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	-	0	0.02
			<i>Caulobacter</i>	<i>vibrioides</i>	0	0.03
			<i>Nitrobacteria</i>	<i>hamadaniensis</i>	0.24	0.19
			-	-	0.13	0.69
		<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Salinarimonas</i>	<i>rosea</i>	0.06	0
			<i>Hyphomicrobiaceae</i>	-	-	3.50
		<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	-	0	18.36
			<i>Xanthobacteraceae</i>	-	-	0.01
		<i>Rhodospirillaceae</i>	-	-	0	1,27
			<i>Erythrobacteraceae</i>	-	-	0.04
			-	-	0.06	0
			<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>estrogenivorans</i>	0
			<i>Sphingomonas</i>	-	0.01	0
			-	-	0.03	4.21
		<i>Alcaligenaceae</i>	-	-	3.13	0
			<i>Bordetella</i>	<i>ansorpii</i>	0	0.05
		<i>Comamonadaceae</i>	-	-	0.14	0.22
			<i>Neisseriaceae</i>	<i>Gulbenkiania</i>	<i>mobilis</i>	0
			<i>Pseudogulbenkiania</i>	<i>subflava</i>	0	0.15
			<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Azospira</i>	<i>restricta</i>	0
		<i>Desulfomicrobiaceae</i>	<i>Desulfomicrobium</i>	<i>orale</i>	0.01	0
			<i>Helicobacteriaceae</i>	-	-	0
			-	-	0.04	0.44
			<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	74.32
		<i>Pseudomonadaceae</i>	-	-	0	0.08
			<i>Xhantomonadaceae</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	-	10
			-	<i>daejeonensis</i>	0.13	0
			Total			