

## Actividad antagónica de bacterias aisladas de ecosistemas marinos frente a *vibrio parahaemolyticus*<sub>AHPND</sub> como patógeno de camarón en cultivos

### Antagonistic activity of bacteria isolated from marine ecosystems against *vibrio parahaemolyticus*<sub>AHPND</sub> as a pathogen of aquaculture importance

Zinnia Judith Molina Garza<sup>1</sup> , Gabriel Enrique Cázares Jaramillo<sup>1</sup> , José Cuauhtémoc Ibarra Gámez<sup>2</sup>, Lucio Galaviz Silva<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Patología Molecular y Experimental. Ave Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás De los Garza, Nuevo León. C.P. 66455. México.

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Sonora, Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro. Ciudad Obregón, Sonora. C.P. 85000. México.

**Correspondencia:** Zinnia Judith Molina Garza **E-mail:** [zinnia.molinagr@uanl.edu.mx](mailto:zinnia.molinagr@uanl.edu.mx)

Artículo original | Original article

#### Palabras clave

Antagonismo  
Bacterias probióticas  
Patógeno  
Camarón

**RESUMEN** | Referente al sector acuícola, uno de los mayores sectores de producción de alimentos es el cultivo de camarón, sin embargo, se ha visto afectado por enfermedades, entre ellas la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés) la cual es causada por *Vibrio parahaemolyticus* que hospeda un plásmido productor de toxinas PirA y Pir B. Un método alternativo para controlar el agente causal es la aplicación de probióticos, los cuales, al ser consumidos por el camarón, le confieren un mecanismo de defensa frente a patógenos. En esta investigación se evaluaron bacterias de ecosistemas marinos y se aislaron con la prueba de difusión en pozo, al mostrar un efecto antagónico en contra de la cepa patógena de camarón, produciendo halos de inhibición desde uno a casi cuatro centímetros de diámetro; además, se caracterizaron estas bacterias por un perfil bioquímico con el sistema API BioMérieux y por secuenciación del gen 16S rADN identificándose en los géneros *Shewanella* sp., *Vibrio* sp. y *Bacillus* sp. Es de suma importancia la capacidad que presentan estas bacterias para ser potencialmente utilizadas como una medida profiláctica y/o terapéutica en granjas camaronícolas evitándose el uso de antibióticos.

#### Keywords

Antagonism  
Bacteria  
Pathogen  
Shrimp

**ABSTRACT** | Regards the aquaculture sector, one of the largest sectors of food production is shrimp farming, however, it has been affected by diseases, including Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (AHPND), which is caused by *Vibrio parahaemolyticus*, which host a plasmid who produce toxins PirA and Pir B. An alternative method to control the pathogen is the application of probiotics, when consumed by the shrimp, give it a defense mechanism against pathogens. In this investigation marine ecosystems were evaluated and marine bacteria were isolated which, with the well diffusion test, showed an antagonistic effect against the pathogenic shrimp strain, where inhibition halos were observed from 1cm to almost 4 cm in diameter; In addition, these bacteria were characterized by a biochemical profile with the BioMérieux API system and by sequencing the 16S rDNA gene where the genera *Shewanella* sp., *Vibrio* sp. and *Bacillus* sp. The ability of these bacteria to be potentially used as a prophylactic and / or therapeutic measure in shrimp farms is of paramount importance, and avoid the use of antibiotics.

## INTRODUCCIÓN

El sector acuícola ha sido una importante fuente de alimento y trabajo, donde los organismos acuáticos han sido de suma importancia en los países dedicados a la acuicultura, siendo el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en América, una de las mayores producciones a nivel mundial, sobresaliendo tanto en mercados nacionales como internacionales (Peña *et al.* 2013). Aun así, la camaronicultura se ha caracterizado por una alta prevalencia de enfermedades (Varela y Peña 2015) y durante los últimos años ha

prevalcido una nueva enfermedad que afecta al camarón de cultivo, la cual causa tasas de mortalidades hasta del 95 % en México (Nunan *et al.*, 2014), esta fue conocida en un inicio por Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS) y posteriormente denominada como Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) (FAO 2013; Lightner *et al.* 2013; Tran *et al.* 2013; Pantoja y Lightner 2014); el agente etiológico es la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. Un método alternativo para prevenir y controlar el agente causal de la enfermedad es la aplicación de probióticos, los cuales serían microorganismos vivos que al ser consumidos por el camarón confieren un beneficio para la salud de este crustáceo (Reid *et al.* 2003) esta alternativa ayudaría a disminuir las pérdidas de producción en la industria camaronera (Girija *et al.* 2018). El objetivo general de este estudio radica en evaluar bacterias de ecosistemas marinos en contra del patógeno *V. parahaemolyticus* AHPND (VP<sub>AHPND</sub>) y el uso potencial de estas como aditivo alimenticio, profiláctico y terapéutico en camarón blanco *L. vannamei*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola del Instituto Tecnológico de Sonora en la ciudad de Obregón, Sonora y en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### Muestras

Los muestreos al azar de organismos marinos, como almeja, jaiba, cangrejo, caracol, algas, además de sedimentos, agua de mar y suelo, se llevaron a cabo en las siguientes localidades que comprenden el estado de Sonora: Guásimas (27°53'09"N 110°34'54"O) y Yavaros (26°42'17"N 109°31'07"O) (Figura 1).



**Figura 1.** Puntos de muestreo dentro del estado de Sonora, México.

### Procesamiento de muestra

**Especímenes marinos:** Las muestras colectadas se conservaron a 4 °C en el laboratorio y fueron lavadas con agua marina estéril en su superficie exterior y disectadas por separado con pinzas, tijeras y bisturís estériles en una cámara de flujo laminar. Posterior a la disección, se llevó a cabo la maceración tanto de órganos internos como gónadas propias de los especímenes. Se adicionaron 20 ml de solución salina estéril al 2% en un mortero de porcelana y se maceraron cada uno de los organismos colectados por separado (Abasolo-Pacheco 2015). Una vez macerado lo requerido, se llevaron a cabo diluciones seriadas al décimo desde 1:10 hasta 1:1000 en tubo de ensayo con taparrosca 16 x 150 mm que contenía 9 ml de solución salina estéril al 2%, (Abasolo-Pacheco 2015; León *et al.* 2016). Se optó por tener esta dilución debido a que se quiere llegar a reducir la concentración de microorganismos de las muestras y así llegar a

ser útil para la obtención de resultados más manejables y además un mejor número de colonias definidas al momento de cultivar. Una vez realizadas las diluciones seriadas de cada espécimen, se tomaron 100 µl (0.1 ml) y se sembraron, con una varilla de vidrio, por extensión (Abasolo-Pacheco 2015) en placas Petri con diferentes agares: TSA + 2% de NaCl, Agar Marino y TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa). Posterior a esto se incubó en condiciones de aerobiosis entre 30-32 °C durante 24 horas (Dopazo *et al.* 1988; Carbonó y Cuan 2017).

**Agua, sedimento y algas marinas:** De las muestras de agua, se tomó 1 ml y se realizaron diluciones seriadas hasta 1:100 y de esta última dilución se tomaron 100 µl y se sembraron utilizando el método de dispersión en placa con una varilla de vidrio (Carbonó y Cuan 2017; Justo *et al.* 2016). Respecto al sedimento, algas y guano, con una espátula se pesó 1 g de la muestra a selección y se realizaron diluciones seriadas llevando la dilución hasta 1:1000, posterior a esto y de igual forma se tomaron 100 µl para realizar la siembra por el método de dispersión en placa en los diferentes agares antes mencionados. El tiempo de incubación fue de 24 h a 30-32 °C (Parada *et al.* 2017). El tiempo transcurrido entre la colecta de especímenes marinos y el procesamiento de muestras no debe ser mayor de 24 h (León *et al.* 2016).

**Aislamiento bacteriano:** Una vez obtenido el crecimiento masivo de las diferentes colonias bacterianas por el método de siembra por extensión en los diferentes medios de cultivo, que fueron los pasos previos, se procedió a aislar cada una de estas de manera individual para obtener así un cultivo puro y proceder a las evaluaciones antagónicas.

### Cepas de referencia

Para las evaluaciones *in vitro* de la actividad antagónica de las diferentes colonias bacterianas obtenidas, se utilizó una cepa patógena de camarón *Vibrio parahaemolyticus*<sub>AHPND</sub> (VP<sub>AHPND</sub>, código/ clave: MC32), proporcionada por el Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola (LASA) del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) de ciudad Obregón, Sonora.

### Evaluaciones *in vitro*

Para la realización de este procedimiento, se utilizó el Agar Mueller-Hinton + 2% de NaCl para las pruebas del antagonismo en placa Petri. Además, se utilizaron medios de enriquecimiento como el Caldo Tripticosa Soya (TSB) al 2% de NaCl para la reactivación de cepas bacterianas y la preparación de inóculos (Iracheta 2017).

### Evaluación antagónica

**Método de difusión en placa:** Se utilizó una cepa patógena VP<sub>AHPND</sub>. Se procedió a realizar el método de difusión en placa, para esto, del cultivo de VP<sub>AHPND</sub>, se tomaron 100µl (inóculo de prueba 1x10<sup>7</sup> UFC/ml) y se vertieron por separado en placas con agar Mueller-Hinton al 2% NaCl, luego se procedió a sembrar por estría hasta ser impregnado el inóculo en el agar. Después, con la ayuda de tubos de ensayo Durham se realizaron 4 excavados (pocillos) en cada una de las placas Petri con el agar antes mencionado, después de esto, se añadieron 100 µl, por triplicado, de cada una de las bacterias a retar y en el pocillo 4 se utilizó medio sin inocular como control negativo. Se probaron dos variantes: 1) donde se obtuvo un cultivo líquido de la bacteria a retar, y 2) luego del centrifugado, el sobrenadante libre de células bacterianas. Las placas se incubaron a 28-32°C por 24h, al cabo de este tiempo y con ayuda de una regla graduada en centímetros (cm) se registraron los resultados de las zonas de inhibición por parte de las diferentes bacterias a retar.

### Caracterización bioquímica de bacterias antagonistas

Los organismos bacterianos antagonistas se caracterizaron por pruebas bioquímicas basadas en el sistema API 20 NE BioMérieux, para bacterias Gram negativas y el sistema API 50 CH para bacterias Gram positivas. Este sistema se basa en un set de ensayos seleccionados para un grupo bacteriano

específico los cuales mediante una plataforma en internet llamada APIWEB provee un perfil bioquímico completo para una intuitiva identificación bacteriana.

### Identificación bacteriana por métodos moleculares

Una vez aisladas las diferentes colonias bacterianas que únicamente presentaron antagonismo en contra de la cepa patógena, se procedió a la identificación de estas por secuenciación gracias al servicio y ayuda de la empresa MacroGen Korea. El servicio consistió en el análisis de secuencias de la región 16S rDNA, realizándose una extracción de gADN, amplificación por la técnica de PCR con los primers 27f (50-AGA GTT TGA TCT TGG CTC AGA-30) y 1492r (50-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-30), con los cuales se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1500 pares de bases; posteriormente, la purificación del producto obtenido de PCR y una secuenciación bidireccional, conjuntamente con el reporte correspondiente de identificación. Estos resultados se compararon con el programa Blast y Clustal con los reportados en el GenBank (NCBI) para determinar el porcentaje de similitud.

## RESULTADOS

De las bahías se colectaron un total de 93 muestras, como son agua, sedimento y diferentes organismos marinos (caracoles, almejas, algas, agua y sedimento, Tabla 1, Figura 2).

**Tabla 1.** Muestras marinas colectadas en dos localidades del estado de Sonora, México.

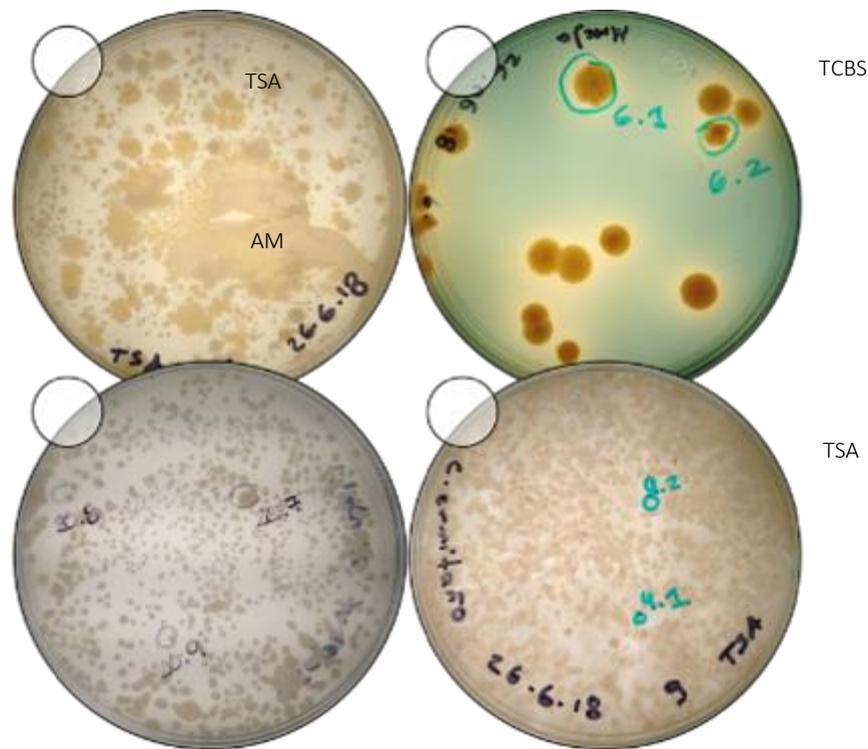
Lugar de muestreo	Agua, sedimento y organismos marinos colectados
Guásimas	31
Yavaros	62
<b>Total</b>	<b>93</b>



**Figura 2.** Muestras marinas colectadas. Dentro de las cuales se obtuvieron: agua marina, sedimento de mar, algas y diferentes especímenes marinos.

**Tabla 2.** Colonias bacterianas obtenidas de las diferentes muestras marinas.

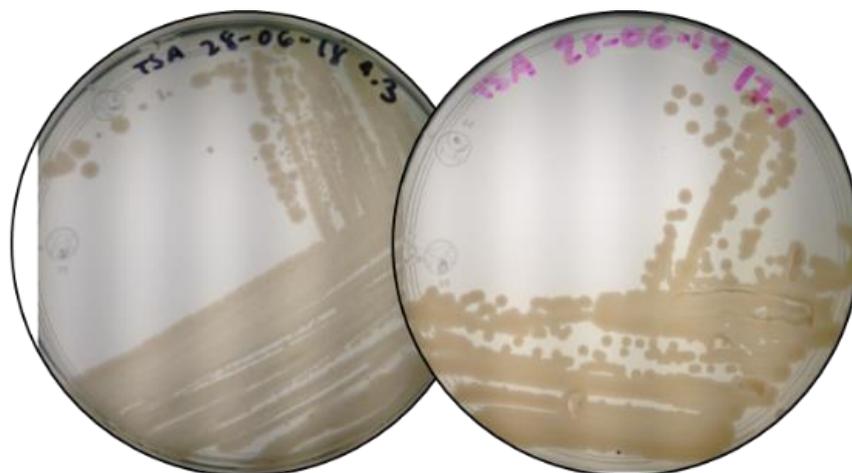
Localidad	Colonias bacterianas aisladas
Guásimas	117
Yavaros	141
<b>Total</b>	<b>258</b>



**Figura 3.** Crecimiento masivo de colonias bacterianas en diferentes medios de cultivo. Donde: TSA: Agar soya tripticaseína + 2% NaCl; TCBS: Tiosulfato citrato Bilis Sacarosa; AM: Agar Marino.

De estos crecimientos en masa de diversas colonias bacterianas, se obtuvieron 258 aislados bacterianos en las dos colectas (Tabla 2).

Una vez obtenido el crecimiento masivo de toda la amplia gama de colonias presentadas en los diferentes medios de cultivo, se procedió a aislar las colonias representativas observadas (Figura 4) esto para cerciorarnos de tener cultivos relativamente puros y aislados y proceder así a las evaluaciones in vitro correspondientes.



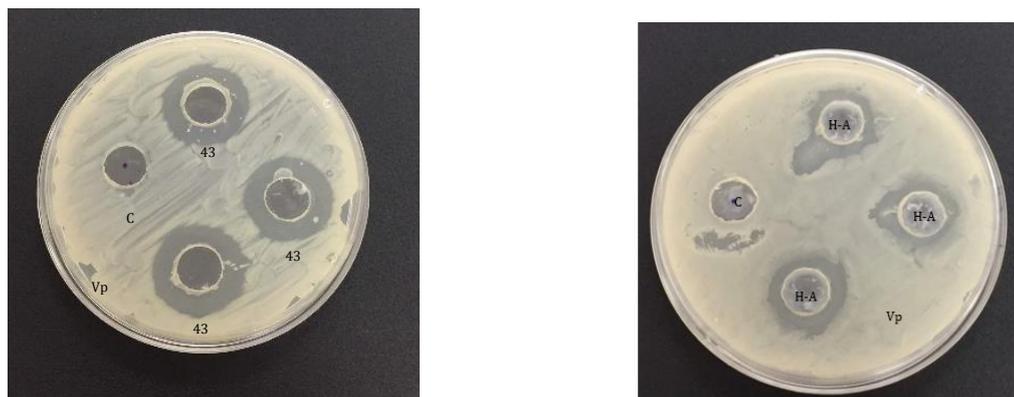
**Figura 4.** Subcultivo de microorganismos bacterianos.

### Evaluación antagonista

**Método de difusión en pozo:** Se evaluaron un total de 258 colonias bacterianas previamente aisladas esto por el método de difusión en pozo. Cada una de las bacterias se identificó con una clave para un mejor manejo.

### Primera variante

**Antagonismo con células:** Del primer muestreo, diversas bacterias a retar mostraron efecto antagónico en contra de MC32, estas fueron las bacterias con clave H-A y 43 las cuales evidenciaron diferentes zonas de inhibición en contra del patógeno (Figura 5).



**Figura 5.** Actividad antagonista *in vitro* en contra de *V. parahaemolyticus* AHPND (Vp) por el método de difusión en pozo con variante de solamente células bacterianas. Donde **Vp**: *Vibrio parahaemolyticus* AHPND; **C**: control negativo (medio son inocular); **43**: Bacteria a retar número 43. H-A: bacteria con clave H-A.

La clasificación con base a la localidad donde estas bacterias fueron aisladas, el organismo marino del cual proviene y la zona de inhibición que presentaron en cm se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Procedencia de los aislados bacterianos con actividad antagónica frente a Vp AHPND.

Localidad	Organismo marino	Clave del aislado	Zona de inhibición (mm)*
Guásimas	Lodo de manglar	H-A	2,06
	<i>Ilichione subrugosa</i> (Almeja china)	43	2,46

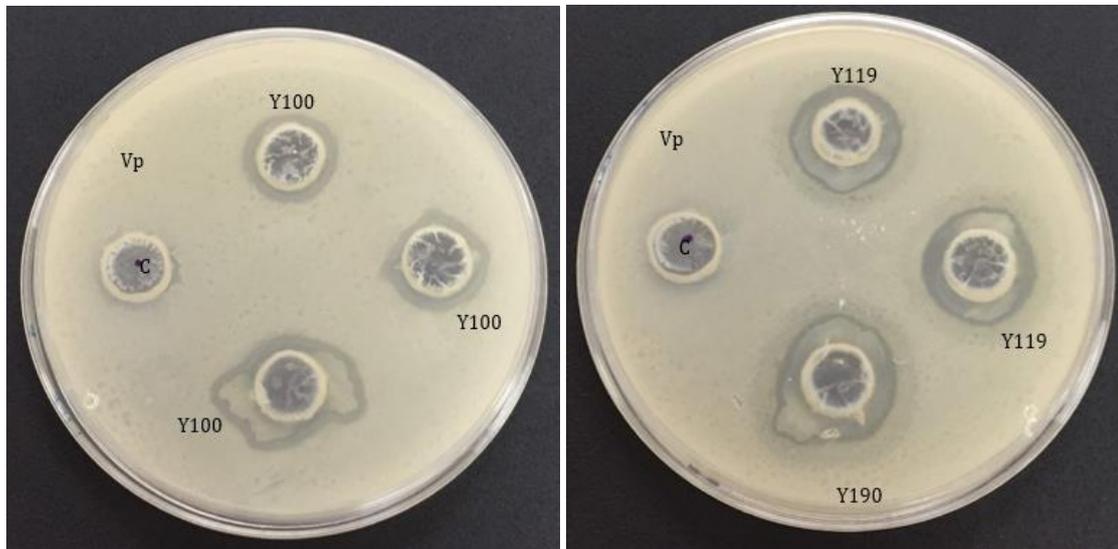
\*Promedio del triplicado en milímetros de diámetro

### Segunda variante

**Antagonismo con sobrenadante:** De igual forma, de la localidad de Guásimas, que mostraron efecto antagónico en contra de MC32, fueron los aislados con clave 32a, H-A y 43 (Figura 6); mientras que, del segundo muestreo en Yavaros, los aislados con clave Y100 y Y119 (figura 7) evidenciaron zonas de inhibición frente al patógeno.



**Figura 6.** Actividad antagonista *in vitro* en contra de *V. parahaemolyticus* AHPND por el método de difusión en pozo con variante de únicamente sobrenadante (sin células). Donde **Vp**: *Vibrio parahaemolyticus* AHPND; **C**: control negativo (medio son inocular); **Clave de aislados bacterianos**: 32a, H-A y 43



**Figura 7.** Actividad antagonista *in vitro* en contra de *V. parahaemolyticus* AHPND por el método de difusión en pozo con variante de únicamente sobrenadante (sin células). Donde **Vp**: *Vibrio parahaemolyticus* AHPND; **C**: control negativo (medio son inocular); **Y100** y **Y119** bacterias del segundo muestreo.

Con base a los resultados obtenidos, las bacterias con actividad antagonista se clasificaron de acuerdo con el lugar de muestreo, al organismo del cual fueron aisladas y su zona de inhibición frente al patógeno (Tabla 4).

**Tabla 4.** Procedencia de los aislados bacterianos con actividad antagonista frente a Vp AHPND

Localidad	Organismo marino	Clave del aislado	Zona de inhibición (mm)*
	<i>Rhizophora mangle</i> (Manglar rojo)	32a	3,66
Guásimas	Lodo de manglar	H-A	2,46
	<i>Ilioichione subrugosa</i> (Almeja china)	43	2,2
Yavaros	Sedimento salino	Y100	1,76
	Agua de mar	Y119	1,9

\*Promedio del triplicado en mm de diámetro

**Identificación bacteriana:** La identificación de las bacterias antagonistas por secuenciación del rDNA 16S y del perfil bioquímico API BioMérieux *Vibrio alginolyticus*, *Shewanella indica*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus zhangzhouensis* y *Bacillus pumilus* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Identificación bacteriana por secuenciación y sistema API BioMérieux.

Clave	Secuenciación	% ID	Api's	% ID
<b>32a</b>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	<i>Vibrio alginolyticus</i>	85,9
<b>H-A</b>	<i>Shewanella indica</i>	99	<i>Shewanella putrefaciens</i>	99,9
<b>43</b>	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9
<b>Y100</b>	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	99	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9
<b>Y119</b>	<i>Bacillus pumilus</i>	99	<i>Bacillus pumilus</i>	99,9

% ID: Porcentaje de similitud de identificación bacteriana

## DISCUSIÓN

Al verse incrementado el cultivo de mariscos, dentro de los cuales destaca el camarón blanco, la aparición de enfermedades de igual forma presenta una problemática al alza (Fernandez-Piquer *et al.* 2011; Xu *et al.* 2014). Diversos microorganismos de origen bacteriano son habitantes de ecosistemas marinos, destacándose al el patógeno *Vibrio parahaemolyticus* distribuido en diversos ambientes acuáticos y ampliamente en zonas marinas (Aranda *et al.* 2012; Touraki *et al.* 2012; Zarei *et al.* 2012; Yu *et al.* 2013; Wu *et al.* 2014; Feichtmayer *et al.* 2017). En la actualidad, diversas bacterias se utilizan como un sistema de biocontrol para las diversas enfermedades que permanecen en la acuicultura. Se han presentado reportes acerca de la actividad antagonista de bacterias en contra de diferentes cepas de *Vibrio* sp. por lo que esta actividad se sigue utilizando como estrategia alterna de diversos químicos y antibióticos para poder controlar al patógeno en el ámbito de la camaronicultura (Makino *et al.* 2003; Planas *et al.* 2006; Bacon *et al.* 2012; Chahad *et al.* 2012; Zokaeifar *et al.* 2012). En este estudio, se evaluaron dos localidades del estado de Sonora. En primera instancia, el sitio denominado Guásimas, Sonora, donde se obtuvieron cuatro bacterias con efecto antagonista *in vitro* en contra de VP<sub>AHPND</sub> (MC32). La primera cepa con clave 32a con procedencia del organismo *Rhizophora mangle* (Manglar rojo), la cual al resultado de identificación evidenció ser un *Vibrio alginolyticus* tanto por secuenciación como por el perfil bioquímico. Rocha *et al.* (2016) identificaron diversas comunidades bacterianas en sedimentos manglares, de los cuales involucraba a *Rhizophora mangle* como hábitat de una amplia gama de bacterias entre las cuales destacaban especies de *Vibrio* sp. Al ver la amplia variedad de bacterias que están presentes en diversos ecosistemas, se conoce que una variedad de cepas de ambientes acuáticos brinda ciertos compuestos inhibidores en contra de la actividad de patógenos marinos (Cordero *et al.* 2012). Otros estudios demuestran que los vibrios silvestre presentan un amplio contenido genético (Thompson *et al.* 2005; Polz *et al.* 2006; Preheim *et al.* 2011) e interacciones antagónicas (Cordero *et al.* 2012) que generan actividad inhibitoria frente a patógenos. Un estudio realizado por Burks *et al.* (2017) reporta a vibrios ambientales que mostraron una inhibición en contra de patógenos como *V. parahaemolyticus*. Distintos vibrios de origen marino a través de un análisis de secuencia de genoma, mostraron perfiles antagónicos y estos fueron aislados en diferentes hábitats y distintos tiempos, sugiriendo que estas cepas inhibidoras persisten en estos ambientes. Este grupo de investigación identificó metabolitos secundarios que podían contribuir con el fenotipo antagonista mediante la producción de compuestos (Weber *et al.* 2015), de los cuales destacan las bacteriocinas (Burks *et al.* 2017) que, a través de distintas condiciones como la competencia bacteriana, liberan estas toxinas de naturaleza proteica que pueden llegar a inhibir a otras bacterias.

Por otra parte, los dos aislados bacterianos restantes del primer muestreo etiquetados con clave H-A y el otro con clave 43 fueron aislados de diferentes especímenes o materia. El aislado con clave H-A se rescató de lodo de manglar de la costa de Guásimas el cual fue identificado mediante secuenciación como *Shewanella indica* y por el sistema bioquímico API BioMérieux como *Shewanella putrefaciens*. Este género de bacteria ha sido aislado de ambientes acuáticos y las especies se encuentran clasificadas dentro de dos grupos, donde *S. indica*, *S. algae* y *S. litorisediminis* pertenecen al grupo de *S. putrefaciens*. La amplia variedad de especies de *Shewanella* sp. se han encontrado con relación en aguas y sedimento a través del Océano Pacífico (Wang *et al.* 2004; Huang *et al.* 2009; Thevarajoo *et al.* 2015). Una gran variedad de bacterias presenta propiedades benéficas, lo que caracteriza a las especies de *Shewanella* sp. es que producen ácidos grasos libres, que es el resultado de un mutualismo entre especímenes marinos y bacterias que viven en intestino (Hau *et al.* 2007; Sukovich *et al.* 2010). Entre las actividades biológicas de estos ácidos es que presentan la capacidad de inhibir parcial o totalmente el crecimiento de bacterias, lo que resulta en una capacidad antibacteriana de estos ácidos grasos libres utilizada por múltiples organismos para poder sobrevivir o defenderse ante patógenos bacterianos (Desbois y Smith 2010; Kokou *et al.* 2012).

En otro sentido, el aislado etiquetado como 43 se recuperó del organismo marino *Ilichione subrugosa* (Almeja china). En un estudio donde comparan la biogeografía y variación de diferentes especies de bivalvos y diferentes regiones del mundo, concuerdan con la presencia de esta especie en las costas del Pacífico Este (Roopnarine *et al.* 2008). Este aislado, al ser secuenciado e identificado por el perfil bioquímico arrojó como resultado la bacteria *Bacillus altitudinis* y *Bacillus pumilus* respectivamente. Shivaji *et al.* (2006) a través de un análisis filogenético basado en secuencias del gen 16S rADN mostró

similitud entre *B. pumilus* y su vecino filogenético más cercano que fue *B. altitudinis*.

De igual manera, los sedimentos y agua de mar mostraron la misma importancia de fuentes bacterianas antagonistas frente al patógeno VP<sub>AHPND</sub>, esto con dos aislados rotulados como Y100, recuperado de sedimento salino y la Y119 tomado de agua de mar. Estos dos últimos fueron identificados como especies de *Bacillus* sp. La Y100 por un lado como *Bacillus zhangzhouensis*/*Bacillus pumilus* y por otro lado la Y119 como *B. pumilus* también. El efecto antagonista que mostraron, tanto el aislado 43, el Y100 y Y119 frente a MC32 ocurrió posiblemente por la competencia interespecífica de nutrientes entre los procariotas mediante el uso de metabolitos secundarios, como los antibióticos o bacteriocinas que son enzimas extracelulares (Jack *et al.* 1995; Boer *et al.* 2005; Hibbing *et al.* 2010; de Lima Procópio *et al.* 2012). La producción de estas últimas, son secretadas por una amplia variedad de bacterias entre las cuales destacan las del género *Bacillus* sp. que degradan la membrana interna del patógeno o su material genético. La mayoría de las bacterias Gram negativas carecen de un sistema excretor específico para estas bacteriocinas, es por esto por lo que la liberación de estas ocurrirá a través de la propia lisis celular, lo cual indica que solo una pequeña parte de los procariotas produce estas sustancias y esto proporciona una ventaja competitiva con otras poblaciones bacterianas (Cascales *et al.* 2007).

## CONCLUSIONES

Se observaron distintos rangos de inhibición por partes de las diferentes bacterias marinas a retar a través del método de difusión en placa. Se logró identificar a estos aislados bacterianos a través de dos sistemas: molecular por secuencias del gen 16S rADN y bioquímico por el sistema API BioMérieux. Los aislados bacterianos de naturaleza marina pueden ser una alternativa contra patógenos ya establecidos y futuros microorganismos en el ámbito de la acuicultura. Además, el uso adecuado y selectivo de microorganismos bacterianos en contra de diversos patógenos de importancia acuícola es un campo de investigación aún con amplias expectativas y en crecimiento. Diferentes aislados de origen bacteriano inhiben el crecimiento de patógenos, lo que hace que sean candidatos para el desarrollo y la implementación de sustancias que puedan actuar con una actividad antimicrobiana.

## Declaración de conflicto de interés de los autores

Los autores manifestamos que no tenemos conflicto de intereses.

## Declaración de buenas prácticas en el uso de animales

Los organismos marinos muestreados, así como las algas, sedimento y agua, se manejaron de acuerdo al protocolo de “Buenas prácticas de manejo” de acuerdo a las declaraciones del Comité de Ética para el manejo de organismos de experimentación de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## Agradecimientos

CONACyT, por el proyecto FOINS PN-3157, “Evaluación de la actividad antagonista de bacterias aisladas de ecosistemas marinos contra *Vibrio parahaemolyticus*, agente causal de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en cultivos de camarón” y a PAICYT-UANL CT1214-20.

## REFERENCIAS

- Abasolo P. (2015). Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y de la concha nácar (*Pteria sterna*) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos. Tesis. Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. Instituto Politécnico.
- Aranda C.P., Valenzuela C., Barrientos J., Paredes J., Leal P., Maldonado M., Godoy F.A., Osorio C.G. (2012) Bacteriostatic anti-*Vibrio parahaemolyticus* activity of *Pseudoalteromonas* sp. Strains DIT09,

- DIT44 and DIT46 isolated from Southern Chilean intertidal *Perumytilus purpuratus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:2365–2374.
- Bacon C.W., Hinton D.M., Mitchell T.R., Snook M.E., Olubajo B. (2012). Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. *Biological Control*, 62:1–9.
- Boer, W. D., Folman, L. B., Summerbell, R. C., Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:795-811.
- Burks, D. J., Norris, S., Kauffman, K. M., Joy, A., Arevalo, P., Azad, R. K., Wildschutte, H. (2017). Environmental vibrios represent a source of antagonistic compounds that inhibit pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Microbiology Open*, 6(5), e00504.
- Carbonó V., Cuan A. (2017). Determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Biociencias*, 12:37-51.
- Cascales E., Buchanan, S., Duché D., Kleanthous C., Lloubes R., Postle K., Cavard D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 71: 158-229.
- Chahad O., El Bour M., Calo M., Boudabous A., Barros J. (2012). Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. *Research in Microbiology*, 163:44–54.
- Cordero O., Wildschutte H., Kirkup B., Proehl S., Ngo L., Hussain F., Polz M. (2012). Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science*, 337:1228–1231.
- de Lima P., da Silva I., Martins M., de Azevedo J., de Araújo J. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16:466-471.
- Desbois A., Smith V. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1629-1642.
- Dopazo C., Lemos M., Lodeiros C., Bolinches J., Barja J., Toranzo A. (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 97-101.
- FAO. (2013). Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO, Rome, ITA. Recuperado el 01 de agosto del 2019, de <http://www.fao.org/3/i3422e/i3422e00.htm>
- Feichtmayer J., Deng L., Griebler C. (2017). Antagonistic microbial interactions: contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. *Frontiers in Microbiology*, 8:2192.
- Fernandez P., Bowman J., Ross T., Tamplin M. (2011). Predictive models for the effect of storage temperature on *Vibrio parahaemolyticus* viability and counts of total viable bacteria in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied and Environmental Microbiology*, 77:8687-8695.
- Girija V., Malaikozhundan B., Vaseeharan B., Vijayakumar S., Gobi N., Herrera M., Chen J., Santhanam P. (2018). In vitro antagonistic activity and the protective effect of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 in zebrafish challenged with GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2. *Microbial Pathogenesis*, 114:274-280.

- Hau H., Gralnick J. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review on Microbiology*, 61:237-258.
- Hibbing M., Fuqua C., Parsek M., Peterson S. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews in Microbiology*, 8: 15.
- Huang J., Sun B., Zhang X. (2009). *Shewanella xiamenensis* sp. nov., isolated from coastal sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:1585–1589.
- Iracheta J. (2017). Actividad antagonista in vitro de microbiota de Bahía de Lobos y Bahía de Guásimas, Sonora y Playa del Carmen, Quintana Roo contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México,
- Jack R., Tagg J., Ray B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 59:171-200.
- Justo S., Churasacari T., Gonzales M., Santiago D., Guerra A. (2016). Determinación de géneros bacterianos en el mar de la playa Cantolao–La Punta–Callao. *Revista de Ciencias*, 10.
- Kokou F., Makridis P., Kentrouri M., Divanach P. (2012). Antibacterial activity in Microalgae. *Aquaculture Research*, 43:1520–1527.
- León J., Aponte J., Cuadra D., Galindo N., Jaramillo L., Vallejo M., Marguet E. (2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51:69-80.
- Lightner D., Redman R., Pantoja C., Noble B., Nunan L., Tran L. (2013). Documentation of an emerging disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. NACA. Proceedings of the Department of Veterinary Science Microbiology School Animal Comp. Biomedical Science University of Arizona. Disponible en: <http://www.enaca.org/publications/health/ahpnsterminalworkshop/Presentation>, 2.
- Makino K., Oshima K., Kurokawa K. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholera*. *The Lancet*, 9359: 743-749.
- Pantoja C., Lightner D. (2014). EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América. En: V. Morales, y J. Cuéllar-Anjel, editores, Patología e inmunología de camarones penaeidos. Guía técnica. 2da ed. OIRSA (Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria), PAN. p. 172-177.
- Parada R., Marguet E., Vallejo M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19:17-23.
- Peña N., Vargas R., Varela A. (2013). Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*, 24:133-147.
- Planas M., Pérez L., Hjelm M., Gram L., Fiksdal I., Bergh Ø., Pintado J. (2006). Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*, 255:323–333.
- Polz M., Hunt D., Preheim S., Weinreich D. (2006). Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 361:2009–2021.

- Preheim S., Boucher Y., Wildschutte H., David L., Veneziano D., Alm E., Polz M. (2011). Metapopulation structure of *Vibrionaceae* among coastal marine invertebrates. *Environmental Microbiology*, 13:265–275.
- Reid G., Sanders M., Gaskins H., Gibson G., Mercenier A., Rastall R., Roberfroid M., Rowland I., Cherbut C., Klaenhammer T. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37:105–118.
- Rocha L., Colares G., Nogueira V., Paes F., Melo V. (2016). Distinct habitats select particular bacterial communities in mangrove sediments. *International Journal of Microbiology*, 2016:3435809. <https://doi.org/10.1155/2016/3435809>
- Roopnarine P., Signorelli J., Laumer C. (2008). Systematic, biogeographic and microhabitat-based morphometric variation of the bivalve *Anomalocardia squamosa* (Bivalvia: Veneridae: Chioninae) in Thailand. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 18:95–102.
- Shivaji S., Chaturvedi P., Suresh K. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:1465–1473.
- Sukovich D., Seffernick J., Richman J., Hunt K., Gralnick J., Wackett L. (2010). Structure, function, and insights into the biosynthesis of a head-to-head hydrocarbon in *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:3842–3849.
- Thevarajoo S., Selvaratnam C., Goh K., Manan F., Ibrahim Z., Chong C. (2015). Isolation and characterization of biotechnology relevant bacteria from marine environment. *Journal Teknologi*, 77:19–33.
- Thompson J., Pacocha S., Pharino C., Klepac Ceraj., Hunt D., Benoit J., Polz M. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, 307: 1311–1313
- Touraki M., Karamanlidou G., Karavida P., Chrysi K. (2012). Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemianauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:2425–2433.
- Tran L., Nunan R., Redman L., Mohny C., Pantoja K., Fitzsimmons D., Lightner D. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105:45–55.
- Varela A., Peña N. (2015). Hepatopancreatitis necrotizante asociada al Fenómeno del Niño, en cultivos de camarones del Golfo de Nicoya. *Repertorio Científico*, 18:29–34.
- Wang F., Wang P., Chen M., Xiao X. (2004). Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific. *Extremophiles*, 8:165–168. doi:10.1007/s00792-003-0365-0
- Weber T., Blin K., Duddela S., Krug D., Kim H., Brucoleri R., Medema M. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43:W237–W243.
- Wu Y., Wen J., Ma Y., Ma X., Chen Y. (2014). Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003–2008. *Food Control*, 46:197

- Xu H., Rong Y., Zhao M., Song B., Chi Z. (2014). Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 98:127-136.
- Yu W., Jong K., Lin Y., Tsai S., Tey Y., Wong H. (2013). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 160:185-192.
- Zarei M., Borujeni M., Jamnejad A., Khezrzadeh M. (2012). Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 25:107-109.
- Zokaeifar H., Balcázar J., Saad C., Kamarudin M., Sijam K., Arshad A., Nejat N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33:683-689.

Recibido: 04-05-2021

Aprobado: 19-07-2021

Versión final: 29-07-2021

