



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS DE MAGISTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:**

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROBIOTA
BACTERIANA EN LA HEMOLINFA DE LANGOSTINOS
(*Litopenaeus vannamei*), SANOS Y ENFERMOS EN BASE A
TÉCNICAS DE AISLAMIENTO, CO-CULTIVO Y METAGENÓMICA**

KATHERINE YULIANA SAAVEDRA OLIVOS

TUMBES, PERÚ

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

**PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGISTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN:**

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN LA
HEMOLINFA DE LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*), SANOS Y ENFERMOS
EN BASE A TÉCNICAS DE AISLAMIENTO, CO-CULTIVO Y METAGENÓMICA**

AUTOR

KATHERINE YULIANA SAAVEDRA OLIVOS

TUMBES, PERÚ

2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo **Katherine Yuliana Saavedra Olivos**, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

KATHERINE YULIANA SAAVEDRA OLIVOS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO
 Tumbes - Perú

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los trece días del mes de junio del año dos mil dieciséis, a las 3.45 horas, en el Auditorio FCCs Salud, se reunieron los miembros del Jurado designados con **Resolución Directoral N° 039-2016/UNT-EPG**, **Dra. ENEDIA GRACIELA VIEYRA PEÑA** - Presidenta; **Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN** Secretario; **Ph.D VIRNA CEDEÑO ESCOBAR** – vocal; y con **Resolución Directoral N° 57-2016/UNT-EPG-D** se fijó la fecha se sustentación y defensa de la tesis: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN LA HEMOLINFA DE LANGOSTINOS (*Litopenaeus vannamei*), SANOS Y ENFERMOS EN BASE A TÉCNICAS DE AISLAMIENTO, COCULTIVO Y METAGENÓMICA**; presentada por la egresada del Programa de maestría en Biotecnología Molecular **SAAVEDRA OLIVOS, KATHERINE YULIANA**, asesorada por el **Mg. QUIMI MUJICA JUAN**.
 Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Aprobado por unanimidad, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 4.10 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 13 de junio de 2016


 Dra. ENEDIA GRACIELA VIEYRA PEÑA
 Presidenta


 Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN
 Secretario


 Ph.D VIRNA CEDEÑO ESCOBAR
 Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor(1), sustentante (1), UI (2)

RESPONSABLES

Ing. Katherine Yuliana Saavedra Olivos

EJECUTOR

M.Sc. Juan Quimi Mujica

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dra. Enedia Vieyra Peña

PRESIDENTA

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

SECRETARIO

Dra. Virna Cedeño Escobar

VOCAL

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.	12
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.	13
2.1. Antecedentes.	13
2.2. Bases teórico-científicas.	15
2.3. Definición de términos básicos.	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	23
3.1. Tipo de estudio y diseño de investigación	23
3.2. Población, muestra y muestreo.	23
3.3. Localidad y periodo de ejecución.	23
3.4. Recolección de ejemplares.	23
3.5. Preparación de muestras de hemolinfa de langostino blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> .	24
3.6. Co-cultivos bacterianos de hemolinfa	24
3.7. Cultivos de bacterias aislados de la hemolinfa	25
3.8. Extracción de ADN para colonias bacterianas purificadas.	25
3.9. Extracción de ADN para metagenómica	26
3.10. Amplificación del gen ARNr 16s	26
3.11. Migración por electroforesis	27
3.12. Secuenciación del gen ARNr 16S de las bacterias aisladas	27

3.13. Análisis de secuencias de las bacterias aisladas	27
3.14. Secuenciación de ADN metagenómico	28
4. RESULTADOS.	29
4.1. Identificación de cepas bacterianas aisladas de la hemolinfa, mediante la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S.	29
4.2. Análisis metagenómico de los co-cultivos bacterianos provenientes de hemolinfa de langostinos sanos y enfermos	31
4.3. Análisis metagenómico de hemolinfa de langostinos sanos y enfermos	38
5. DISCUSIÓN.	42
6. CONCLUSIONES.	48
7. RECOMENDACIONES.	49
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	50
9. ANEXOS	61

RESUMEN

El cultivo de *Litopenaeus vananmei*, se ha convertido en una de las principales producciones acuícolas a nivel mundial. Sin embargo, enfermedades infecciosas bacterianas y virales causan mortalidades epidémicas o endémicas desestabilizando la rentabilidad, sostenibilidad y desarrollo de esta actividad acuícola. En el presente trabajo se investigó la microbiota de la hemolinfa en langostinos *L. vannamei* sanos o enfermos, considerando tecnologías de caracterización molecular dependientes e independientes de cultivo *in vitro*. Se trata entonces, por una parte, de bacterias cultivadas *in vitro* de manera aislada y luego identificadas molecularmente y, por otra parte, de bacterias co-cultivadas *in vitro* y de bacterias de la hemolinfa, siendo la composición bacteriana establecida por metagenómica dirigida al ADNr. En lo que concierne las bacterias cultivables *in vitro* aisladamente, predominaron los géneros *Bacillus* y *Vibrio*, en langostinos sanos y enfermos, respectivamente. Los co-cultivos establecidos a partir de muestras de hemolinfa están compuestos principalmente, en el caso de animales aparentemente sanos, de géneros *Vibrio* (63,3%), bacterias no clasificadas (20,6%), *Lysinibacillus* (8,9%) y *Bacillus* (2,8%); y, en el caso de animales aparentemente enfermos, de géneros *Vibrio* (89%), *Listonella* (5,8%) y *Lysinibacillus* (2,2%). Las microbiotas de la hemolinfa caracterizadas directamente por metagenómica están compuestas principalmente, en el caso de animales sanos, por los géneros *Staphylococcus* (39,5%) y *Corynebacterium* (34,6%) mientras que en el caso de animales enfermos por bacterias no clasificadas (40,4%) y *Atopostipes* (21,7%). Estos resultados sugieren que la microbiota de la hemolinfa es muy diferente entre animales sanos y enfermos. Por otra parte, las caracterizaciones de las microbiotas parecen incorrectas en el caso de tecnologías clásicas dependientes del cultivo *in vitro*.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, hemolinfa, microbiota, bacteria, metagenómica, co-cultivo.

ABSTRACT

The cultivation of the shrimp *Litopenaeus vannamei* has become one of the major world aquaculture production. However, bacterial and viral infectious diseases cause endemic or epidemic mortalities that destabilize profitability, sustainability and development of this aquaculture activity. In this study hemolymph microbiota was investigated in healthy and sick shrimps, considering culture-dependent and culture-independent molecular characterization technologies. Thus, on one hand, *in vitro* separately cultured bacteria have been identified molecularly and, on the other hand, bacteria composition of *in vitro* co-cultures and hemolymph have been established by rDNA targeted metagenomics. *Bacillus* and *Vibrio* genera predominate as *in vitro* separately cultured bacteria, respectively in healthy and diseased shrimps. The co-cultures established from hemolymphs are mainly composed, in the case of apparently healthy shrimps, by bacterial genera *Vibrio* (63.3%), not classified bacteria (20.6%), *Lysinibacillus* (8.9%) and *Bacillus* (2.8%), and in the case of apparently sick shrimps with genera *Vibrio* (89%), *Listonella* (5.8%) and *Lysinibacillus* (2.2%). The hemolymph microbiota directly characterized by metagenomics is essentially composed, by the genera *Staphylococcus* (39.5%) and *Corynebacterium* (34.6%), in the case of healthy animals, and with unclassified bacteria (40.4%) and *Atopostipes* (21.7%), in the case of sick animals. These results suggest that the microbiota of hemolymph is very different between healthy and sick animals. Moreover, microbiota characterizations seemed altered in the case of conventional culture-dependent technologies.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, hemolymph, microbiota, bacteria, metagenomics, co-cultivation

1. INTRODUCCIÓN

La industria del langostino blanco *Litopenaeus vannamei*, es una de las actividades más promisorias dentro del sector productivo del Perú. Sin embargo, la aparición consecuente de agentes etiológicos infecciosos, ponen en riesgo a esta industria. Ante esto, ha surgido un vasto número de investigaciones enfocadas al estudio de la microbiota para comprender mejor el balance microbiano a fin de establecer las interrelaciones benéficas o perjudiciales en el interior del huésped. La microbiota o comunidad microbiana, juega un papel importante en la fisiología del huésped, así mismo contribuye al mejor desarrollo del sistema inmunológico cuando existe un balance adecuado.

En el langostino blanco *L. vannamei*, ha sido ampliamente reportado que el intestino y el hepatopáncreas albergan una microbiota muy diversa, sin embargo, aún permanece incierta su existencia en el fluido circulatorio, también denominado hemolinfa, puesto que la presencia de bacterias en la hemolinfa es relacionada comúnmente a septicemia.

A pesar de ello, existen evidencias de presencia bacteriana sobre diferentes crustáceos sanos incluyendo a especies de *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus monodon*.

Sin embargo, en estas investigaciones la identificación se ha realizado bajo métodos tradicionales que hoy en día son obsoletos. Estos métodos no proporcionan un panorama real, ya que favorecen el desarrollo de un grupo de microorganismos en particular. Además, estas técnicas de aislamiento en medios selectivos no consideran que los requerimientos nutricionales varían de una especie a otra, y que incluso algunas especies requieren de los metabolitos de otras especies para poder crecer, por lo que es necesario hacer co-cultivos en dichos casos. Esta gran brecha que supone el trabajar sólo con microorganismos cultivables ha sido superada con el desarrollo de la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) del ADN, que ha permitido obtener genomas de una comunidad. Esta herramienta denominada metagenómica viene

siendo muy popularizada debido a la facilidad y rapidez para el procesamiento de muestras, a más de aportar una visión real de la composición bacteriana y de esta manera predecir las interrelaciones que ocurren dentro de un individuo.

Por lo tanto esta investigación tuvo como hipótesis, identificar la microbiota de la hemolinfa de langostinos sanos y enfermos de *L. vannamei*, a fin de corroborar si es posible la existencia bacteriana en el fluido circulatorio de animales sanos, sin que se vea comprometida la salud del animal.

Así mismo tuvo como objetivo dilucidar, a través de herramientas moleculares, la composición de la comunidad bacteriana presente en langostinos sanos y enfermos, con el fin de evidenciar si existen diferencias entre las comunidades en ambos estados fisiológicos del langostino.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA

2.1. Antecedentes

2.1.2 La acuicultura del langostino *L. vannamei* en el Perú

La acuicultura del langostino blanco *L. vannamei* es una de las actividades económicas más importantes en Perú, con una tasa de crecimiento constante desde el año 2000, llegando a alcanzar en el 2012 una producción anual de 17,099 toneladas (Fuente: Ministerio de la Producción). Este cultivo se realiza en el norte del país, siendo la región de Tumbes el principal productor, en virtud a que representa más del 80% de la producción total (Alfaro, Guevara y Gonzáles 2010; Mendoza 2011).

2.1.3 Patologías que han afectado el cultivo de *L. vannamei*

Esta actividad se ha visto enfrentada seriamente a patologías virales tales como: WSSV, IHHNV e IMNV (Nakano *et al.*, 1994, Morales y María, 2011 y Lightner, 2011) y patologías bacterianas que han llevado al punto de desestabilizar las producciones.

Entre los potenciales patógenos bacterianos destacan las bacterias del género *Vibrio*, entre las que se incluyen: *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* (Brock and Lightner, 1990; Ishimaru, Akagawa and Muroga, 1995), *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. spp.* (Lightner, 1996), siendo causantes de la enfermedad conocida como vibriosis.

Las mayores epizootias de vibriosis sobre *L. vannamei*, han sido reportadas en Ecuador, Perú, Colombia y América Central (Lightner, 1996) y se presentan con mayor frecuencia en la etapa de larvicultura y engorde (Gómez-Gil, Roque y Guerra, 2001; Santiago Espinosa, y Bermúdez, 2009).

Durante los estadios larvarios han sido reportados *V. harveyi* y *V. splendidus* (Uma *et al.*, 2008; Zhou J. *et al* 2012, y Gómez-Gil, Roque

y Guerra, 2001) y en la etapa de engorde, se ha reconocido la presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela*, (anteriormente clasificada como *V. Damselae*), pudiendo llegar a ocasionar mortalidades que pueden variar desde intervalos insignificantes hasta presentar mortalidades del 100% (Trujillo *et al.* 2005).

Sin embargo, así como existen cepas de *Vibrio* con potencial patógeno, también se reportan cepas que mejoran el crecimiento y supervivencia en la acuicultura de crustáceos y peces (Austin B. and Austin D. 2012; Rengpipat *et al.*, 1998; Phianphak *et al.*, 1999). Además, los vibrios constituyen parte de la microflora natural de los langostinos silvestres y de cultivo (Sinderman 1990) y se convierten en patógenos oportunistas cuando los mecanismos de defensa natural están suprimidos (Garnier *et al.*, 2007; Olson, Tracker and Gochfeld 2014, Lokmer and Wegner, 2014). Tal estado favorece a la proliferación de bacterias de este género y de otros, que en conjunto llevan a la mortalidad del huésped.

Otras enfermedades, conocidas como Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS) o Síndrome de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), han alertado el sector langostinero en la última década, con mortalidades masivas y grandes pérdidas económicas en China (2009), Vietnam (2010), Malaysia (2011), Tailandia (2012) y México. Un agente causal ha sido identificado como miembro del subtipo de *V. harveyi*, más estrechamente relacionado a *V. parahaemolyticus*, cuya virulencia es debida a la adquisición de un plásmido de 70 kbp denominado pVA1, que codifica para la toxina binaria PirAVP y PirBVP, que induce a la muerte celular (Soto *et al.*, 2015, Tran *et al.* 2013., Chung-Te *et al.*, 2015, Otta, *et al.*, 2014).

Para intentar controlar estas enfermedades bacterianas, se ha hecho uso de antibióticos de manera indiscriminada, lo que provocó

la aparición de bacterias resistentes a los mismos (Verschuerer *et al.*, 2000), así como la acumulación de residuos en los productos alimenticios que llegan al consumidor final (Uma *et al.*, 1999).

En este contexto, se plantearon nuevas alternativas de prevención de enfermedades bacterianas, en particular el uso de bacterias probióticas comerciales, así como a la búsqueda de nuevas cepas nativas con características potenciales para la acuicultura. Ello llevó a incursionar a estudios de la microbiota que, además de brindar una visión de la estructura microbiana, permiten comprender mejor el balance y las interacciones microbianas en el interior de un organismo.

La microbiota de *L. vannamei*

La microbiota o comunidad microbiana juega un papel importante en la fisiología de un organismo (McFallNgai *et al.*, 2013) y en la protección contra agentes patógenos (Kamada *et al.*, 2013, Tuyub *et al.*, 2014), así mismo, regula la expresión de genes de defensa e influye en la nutrición, estado fisiológico, inmunidad, crecimiento y desarrollo (Backhed *et al.*, 2004, Hooper, Midtvedt, and Gordon, 2002).

La microbiota incluye microorganismos con gran potencial probiótico, los cuales han sido ampliamente usados en la acuicultura para el mejoramiento de los cultivos, calidad de agua, resistencia de los animales ante enfermedades, entre otras (Rungrassamee *et al.*, 2004, Bachere, 2000).

Es conocido que el tracto digestivo (hepatopáncreas, estómago e intestino) del langostino sano alberga una población bacteriana relativamente estable (Wang X, and Wang J., 2015), sin embargo, aún no se ha elucidado completamente la presencia de éstas en la hemolinfa.

Gopal *et al.*, (2005) y Lighner (1977) consideran que la hemolinfa de langostinos sanos es estéril y que la presencia bacteriana en la hemolinfa es un indicativo de septicemia; de igual modo, Jayasree, Janakiram, and Madhavi, (2006) han reportado que la hemolinfa de langostinos *P. monodon* en fase aguda de infección y en estado moribundo, presenta una alta carga de *Vibrio*, destacando *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*.

Sin embargo, Wang X., y Wang J. (2015), indican que la presencia bacteriana en la hemolinfa de langostinos sanos es un evento natural y que éstas se encuentran en baja cantidad, además, que algunas de ellas son productoras de péptidos antimicrobianos.

Costa *et al.* (1998), señalan que aproximadamente el 30% de las bacterias presentes en langostinos sanos pertenecen al género *Vibrio*. Otros estudios similares, reportan que en la hemolinfa de *L. vannamei* se ha detectado la presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, (Gomez *et al.*, 1998), *V. narvarrensis*, *V. brasiliensis*, *V. xuii*, *V. cholerae*, *V. coralliilyticus*, *V. neptunis*, *V. alginolyticus*, y *V. diazotrophicus* (Alburqueque-costa, Lima-Araujo and Dos Fernandes-Vieira, 2013).

Existen reportes de presencia bacteriana en la hemolinfa de otros crustáceos aparentemente sanos como *Procambarus clarkii* (Scott and Thune, 1986), *Homarus americanus* (Cornick and Steward 1966), *Callinectes sapidus* (Tubiash, Sizemore and Colwell, 1975; Givens *et al.*, 2013), *Paratelphusa hydrodromas* (Vijayabharathi *et al.* 2013) y de *Penaeus monodon* (Gomez *et al.*, 1998).

Si bien en la hemolinfa de animales sanos existe una microbiota nativa, ésta es controlada por péptidos antimicrobianos y lectinas propias de la hemolinfa que controlan su proliferación. Así mismo, esta microbiota no está presente de forma ubicua en todos los animales (Wang X. and Wang J. 2015)

2.2. Bases teórico-científicas.

Microbiota y técnicas de caracterización dependientes de cultivo con aislamiento.

Si bien el aislamiento de bacterias dio las primeras percepciones de la diversidad microbiana, los métodos convencionales basados en el cultivo permiten solamente la identificación de los microorganismos que pueden desarrollarse en un sustrato en particular, es decir a un ambiente con pocos nutrientes, reduciendo así la lista de la diversidad microbiana a pocas especies. Se considera que menos del 1% de las bacterias podrían ser aisladas sobre estos métodos de cultivo, debido en parte a los diferentes requerimientos nutricionales de las cepas, y a que muchas de ellas no viven en forma libre e independiente de los otros microorganismos, sino que forman consorcios donde se relacionan íntimamente entre sí y con su microambiente (Rascovan 2013). Se debe considerar la gran debilidad de estas técnicas de caracterización dependientes de cultivo ya que subestiman la magnitud de la diversidad microbiana (Staley and Konopka, 1985; Amann, Ludwig and Schleifer, 1995; Streit and Schmitz, 2004).

La técnica de cultivo influye dramáticamente sobre el aislado de procariontes, resultando en el aislamiento de un grupo más o menos específico según el método. Por otro lado, resulta difícil diseñar estrategias de aislamiento y medios de cultivo para su crecimiento en laboratorio, sin antes tener un conocimiento previo de las capacidades y requerimientos metabólicos (Rascovan, 2013).

Además, muchas veces los métodos de cultivo fallan para reproducir características fundamentales de la fuente de aislamiento, e incluso varios factores como el tipo de agar podría inhibir el crecimiento de varias cepas (Schloter *et al.*, 2000; Kopke *et al.*, 2005; Tamaki *et al.*, 2009).

Microbiota y técnicas de caracterización dependientes de co-cultivo

Bajo la premisa de que los microbios co-existen, se generaron nuevos enfoques, como el co-cultivo (también llamado fermentación mixta) que intenta imitar la situación ecológica de un entorno microbiano; es un enfoque experimental viable para mejorar la diversidad química de los microorganismos cuando se cultivan *in vitro*; permitiendo así mejorar la producción de ciertos compuestos constitutivamente presentes y/o para la inducción de genes silenciosos (Marmann *et al.*, 2014); las motivaciones para su uso implican: el estudio de las interacciones entre poblaciones naturales, mejorar el éxito de cultivo para determinadas poblaciones o el establecimiento de interacciones entre poblaciones sintéticas (Goers, Freemont and Polizzi, 2014). Es así que existen bacterias que obtienen metabolitos partir de las secreciones de otros microbios (cooperación inter-especies) (Schink, 2002; Zeidan, Radstrom and Niel, 2010; Kato *et al.*, 2005); pudiendo ser la razón por la que las bacterias no pueden ser cultivadas de forma aislada (Harcombe, 2010)

Microbiota y técnicas de caracterización independientes de cultivo: Análisis metagenómico

La implementación de nuevos enfoques de “*Next generation sequencing*” (NGS), abre la oportunidad de explorar el mundo microbiano aún no revelado a partir de un ambiente diverso, a través de la secuenciación masiva de ADN (Eikmeyer *et al.*, 2013). La metagenómica utiliza tecnología de vanguardia en secuenciación y caracterización de secuencias para conocer la identidad y funcionalidad de la comunidad microbiana, incluyendo a microorganismos refractario a los métodos basados en el cultivo clásico (Schmeisser, Steele and Streit, 2007; Keegan, Glass, and Meyer, 2016)

Existen dos tipos de enfoques que pueden ser utilizados en metagenómica; el primero es secuenciar todos los genomas completos al azar, mediante “*shotgun sequencing*”, o secuenciar de todos ellos únicamente un gen o región acotada mediante “*amplicon sequencing*”. La secuenciación mediante “*amplicon sequencing*”, consiste en amplificar un gen por PCR a partir de una muestra de ADN o secuencia en particular. El gen más usado en el caso de microorganismos procariotas suele ser el de la subunidad pequeña de ARN ribosomal denominado ARNr 16S. Este gen se encuentra conservado en todos los microorganismos y debido a su tasa de mutación relativamente constante entre linajes puede ser utilizado como un indicador taxonómico y filogenético bastante informativo (Rascovan, 2013).

Anteriormente, los grandes fragmentos de ADN eran recuperados de ambientes naturales y luego clonados para acceder a los metagenomas de microorganismos no cultivables (Haldesman *et al.*, 1998 and Rondon *et al.*, 2000; citados en Acosta 2013).

Muchas investigaciones se centran en describir la diversidad microbiana, en parte, debido a lo complicado que representa el análisis de datos derivados de secuencias metagenómicas. Actualmente se encuentran disponibles varias plataformas en línea para el depósito, manejo, análisis y comparación de datos metagenómicos, entre los más populares se encuentran MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008), IMG/M (Markowitz *et al.*, 2012 y CAMERA (Sun *et al.*, 2011). El MG-RAST es el más popular y permite obtener los resultados en forma de perfiles de abundancia a nivel taxonómico y funcional a diferentes niveles jerárquicos (Rascovan, 2013; Keegan, Glass, and Meyer, 2016; Wilke *et al.*, 2016).

Por lo expuesto, en la investigación presente se analizó a nivel metagenómico la microbiota de la hemolinfa del langostino *L. vannamei* a través NGS con el fin de determinar su comunidad microbiana.

2.3. Definición de términos básicos

ADN: Abreviatura de ácido desoxirribonucleico. Largo polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN constituye el material genético de la mayoría de los organismos y orgánulos que se conocen; normalmente se encuentra formando una doble hélice, aunque algunos genomas virales contienen ADN de una sola cadena y otros, ARN de una o de doble cadena. (Zaid *et al.*, 2001)

Acuicultura: Técnica de cultivo de organismos acuáticos, dentro de los que se incluyen peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas (Zaid *et al.*, 2001)

Agar: Polisacárido que por sus propiedades gelificantes, se utiliza en la preparación de medios nutritivos para los cultivos. Se obtiene de la *Rhodophyta* (alga roja). (Zaid *et al.*, 2001)

Agarosa: Principal componente del agar (Zaid *et al.*, 2001)

Amplificación: Creación de numerosas copias de un segmento del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa. (Zaid *et al.*, 2001)

Amplicón: Producto final de una reacción de amplificación de ADN. (Zaid *et al.*, 2001)

Biología molecular: Estudio, a nivel molecular, de los procesos que tienen lugar en los seres vivos. (Zaid *et al.*, 2001)

Bromuro de etidio: Colorante fluorescente que puede intercalarse entre pares de bases de ADN bicatenario, de ahí su aplicación generalizada para teñir ADN en los geles. El colorante es fluorescente cuando se expone a la luz UV. Se sabe que es un fuerte agente mutágeno y posiblemente también cancerígeno y teratógeno (Zaid *et al.* 2001)

Cebador: Oligonucleótido de tamaño pequeño que al hibridar con el molde de ADN de una hebra, le proporciona una estructura bicatenaria a partir de

la cual, la ADN polimerasa sintetizará una nueva hebra de ADN para producir una molécula dúplex (Zaid *et al.*, 2001)

Cepa: Grupo de individuos derivados por ascendencia de un único individuo dentro de una especie (Zaid *et al.*, 2001).

Desnaturalizar: Modificar la conformación nativa de un ácido nucleico o, más frecuentemente, de una proteína, mediante procesos físicos o químicos. Normalmente este proceso se acompaña de la pérdida de la actividad biológica. (Zaid *et al.*, 2001)

Electroforesis: Técnica de biología molecular, de uso generalizado y de la que existe muchas variantes. Se utiliza para separar los componentes de mezclas complejas de macromoléculas. Para ello, las muestras se someten a un campo eléctrico aplicado a través de una matriz porosa; bajo tales condiciones, las moléculas migran a velocidades que dependen de sus cargas eléctricas y/o pesos moleculares. (Zaid *et al.*, 2001).

Gen ARNr 16S: El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Rodicio and Mendoza, 2004)

Hemolinfa: Es un análogo de la sangre y la linfa de los vertebrados. Esta baña los tejidos, denominándose hemocele a los sitios donde ella circula. La hemolinfa presenta un color azul verdoso a causa de la hemocianina (proteína respiratoria abundante en la hemolinfa de todos los crustáceos). (Rendón y Balcázar, 2003)

Ion Torrent: La secuenciación por Ion Torrent es un método de secuenciación de ADN basado en la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del ADN. Por lo tanto, este método se guía a través de la adición de nucleótidos que se llevan a cabo en las cadenas simples de ADN en estudio (Perkel, 2011)

Microbiota: Sistema complejo compuesto de muchas comunidades microbianas que habitan nichos ambientales (Collado *et al.*, 2012).

Microbioma: Colección de genomas de los microorganismos que conforman la microbiota (Gill *et al.*, 2006).

Metagenómica: Se define como el análisis de genética directa de los genomas de contenidos con una muestra ambiental (Thomas, Gilbert and Meyer, 2012)

Reacción en cadena de la polimerasa (Abreviatura de PCR del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Una de las técnicas más utilizadas en biología molecular que permite la producción de millones de copias (amplificación) de una secuencia específica de ADN, siempre que se conozca la secuencia de pares de bases de cada extremo del ADN diana. Supone la aplicación de varios ciclos que incluyen desnaturalización de ADN, hibridación del cebador y la extensión de la cadena de ADN, y requiere de una enzima ADN polimerasa termoestable, desoxirribonucleótidos y oligonucleótidos específicos (cebadores) (Zaid *et al.*, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Tipo de estudio y diseño de investigación

De acuerdo al fin que persigue: básica.

De acuerdo al enfoque de investigación: descriptiva.

3.2. Población, muestra y muestreo.

Población: langostinos *L. vannamei*, obtenidos de sistemas de cultivo semi-intensivo.

Muestra: 20 ejemplares de *L. vannamei*, de 20 gramos aproximadamente.

Muestreo: Se muestreó la hemolinfa de cada langostino

3.3. Localidad y periodo de ejecución.

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de la Empresa Inca' Biotec S.A.C, sito en calle Filipinas 213 en la ciudad de Tumbes, distrito, provincia y departamento de Tumbes. La investigación inició en agosto del 2014, teniendo un periodo de ejecución de 12 meses.

3.4. Recolección de ejemplares.

Los langostinos de cultivo fueron recolectados de estanques de crianza, cercanos a la playa "El Bendito", en el distrito y provincia de Zarumilla, durante el mes de agosto del 2014; luego fueron transportados en baldes de polipropileno de 15L con agua del mismo medio hasta el laboratorio de Biología Molecular de la empresa Inca' Biotec S.A.C, ubicado en el distrito, provincia y departamento de Tumbes, para el análisis respectivo.

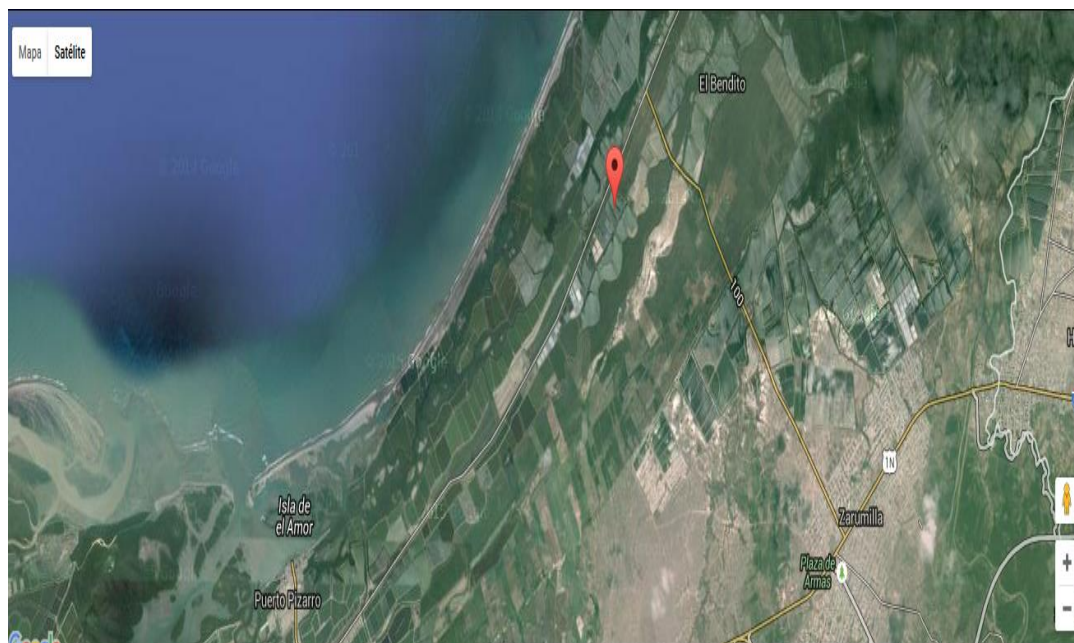


Figura 1. Imagen satelital de Google earth, del lugar de obtención de muestras de *L. vannamei*

3.5. Preparación de muestras de hemolinfa de langostino blanco *Litopenaeus vannamei*.

Cada langostino fue pesado y evaluado externamente para determinar signos clínicos que se puedan asociar a algún síndrome patológico determinado.

Para la toma de hemolinfa, se colocó al langostino en posición dorso-ventral, dejando expuesta la zona de unión, entre los pereiópodos y pleópodos (seno hemolinfático ventral), la cual se desinfectó con alcohol al 75%. Luego se introdujo una jeringa de 1ml estéril cargada con 100 μ l de anticoagulante (citrato de sodio al 10%), para así extraer al menos el mismo volumen de hemolinfa. Inmediatamente se homogenizó para evitar la coagulación y se colocó en un microtubo de 1,5 ml para su procesamiento posterior.

3.6. Co-cultivos bacterianos de hemolinfa

Se tomó 20 µl de hemolinfa y se sembró individualmente en un microtubo de 1,5 ml conteniendo medio líquido Luria Bertani (LB) ajustado al 2% de cloruro de sodio (NaCl). Posteriormente las muestras fueron incubadas por 24 horas a temperatura a 37 °C. Transcurrido el tiempo se realizó la extracción de ADN.

3.7. Cultivos de bacterias aisladas de la hemolinfa

Se tomó 20 µl de hemolinfa y se sembró por barrido en placas conteniendo medio de cultivo agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y agar tripticasa de soya (TSA) ajustados al 2% de NaCl, y luego las placas fueron incubaron por 24 horas a 37 °C. Las colonias obtenidas fueron aisladas y purificadas en medio TSA al 2% de NaCl; corroborando su pureza mediante tinción de Gram. Posteriormente fueron colocadas en un microtubo conteniendo 1 ml caldo LB (para favorecer su crecimiento) e incubadas por 24 horas a 37 °C. Adicionalmente se realizaron réplicas de estas colonias como respaldo; tomando para ello 10 µl de la suspensión bacteriana y colocándolos en un nuevo microtubo conteniendo 1 ml de medio líquido LB, se incubó nuevamente bajo los mismos parámetros, se adicionó glicerol helado al 15%, y se conservó a -20 °C.

3.8. Extracción de ADN para colonias bacterianas purificadas.

Los microtubos conteniendo la suspensión bacteriana siguieron el procedimiento especificado a continuación:

Las muestras contenidas en los microtubos, fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 2 minutos; luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento (pellet) en 500 µl de solución PBS 1X. Nuevamente se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 minutos; se eliminó el sobrenadante y se adicionó 200 µl de solución TE. Las muestras fueron llevadas a ebullición durante 10 minutos e inmediatamente fueron

colocaron en hielo durante 5 minutos. Luego fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente se transfirió 10 μ l del sobrenadante a un nuevo microtubo, y se le adicionó 90 μ l de agua ultra pura.

3.9. Extracción de ADN para metagenómica

Para el caso de la hemolinfa directa, se realizó una toma de la hemolinfa de 5 langostinos aparentemente sanos y otra de 5 langostinos enfermos; este paso se realizó, debido a que en ensayos previos fue difícil obtener resultados del metagenoma de manera individual. Para los co-cultivos, se tomó 1 ml del cultivo bacteriano; ambas muestras directas y co-cultivos) siguieron el procedimiento descrito a continuación:

Las muestras de hemolinfa y co-cultivos bacterianos fueron colocadas en microtubos de 1,5 ml y luego centrifugadas a 13 000 rpm/10 min. A cada muestra contenida en los microtubos se le adicionó 300 μ l de buffer SET y 4 μ l de lisozima 50 μ g/ μ l, y se incubó por 10 min a -20 °C. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron llevadas a ebullición de 1-2 min y centrifugadas a 13 000 rpm/10 min. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un nuevo microtubo, se adicionó 200 μ l de isopropanol helado e incubó a -20 °C durante 25 min, seguidamente se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min. Al pellet obtenido se adicionó 300 μ l de buffer SET, luego se homogenizó e incorporó 300 μ l de fenol y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo microtubo, posteriormente se agregó 1 volumen de fenol: cloroformo: Alcohol isoamil y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min. Al sobrenadante extraído se adicionó 0.7 vol. de isopropanol y se incubó a -20°C por media hora, luego se centrifugó a 13 000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante de cada muestra y se dejó secar por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet fue disuelto en 50 μ l de TE (10mM Tris, 1mM EDTA; pH 8), previamente calentado.

3.10. Amplificación del gen ARNr 16S

El ADN extraído a partir de las bacterias purificadas, se sometió a ensayos de PCR para confirmar la presencia bacteriana. Se utilizó cebadores universales dirigidos a amplificar el gen ARNr 16S bacteriano: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGT TACGACT T-3'). La PCR se realizó con el kit comercial (Concepto Azul) a un volumen final de 25 µl; utilizándose 12,5 µl de Mix PCR; 9,3 µl de agua ultrapura; 0,6 µl de cada cebador; y 2 µl del ADN extraído. La amplificación se realizó siguiendo una fase de pre-desnaturalización de 94°C/5 min; seguida de 35 ciclos a 94°C/30 seg 55° C/45 seg y 72 °C/1 min 30 seg terminando con una extensión final de 72 °C/10 min. y conservación a 4°C/∞.

3.11. Migración por electroforesis

La migración electroforética de los amplicones (productos de la PCR) se realizó en geles de agarosa al 2 % conteniendo 5 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml); se utilizó como tampón de migración 120 ml de TAE 1X. Para la migración se tomó 10 µl de cada amplicón y se mezcló con 2 µl de tampón de depósito, también se migró el marcador de peso molecular de 100 pb para ello 1 µl de marcador, 1 µl del tampón y 4 µl de agua destilada. El potencial eléctrico empleado fue de 68 V durante 30 min; para todas las pruebas realizadas.

3.12. Secuenciación del gen ARNr 16S de las bacterias aisladas

Para la secuenciación se utilizó 20 µl de los productos obtenidos por amplificación en la PCR, los cuales fueron colocados en tubos Eppendorf de 0,2 ml; junto con los cebadores internos *forward* 518F y *reverse* 1492R; luego fueron empacados en hielo seco y enviados a la empresa Macrogen; para la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado.

3.13. Análisis de secuencias de las bacterias aisladas

Obtenidas las secuencias de ADN de cada amplicón, éstas fueron alineadas con el software libre MEGA 6 y comparadas posteriormente con las secuencias de ARNr 16S que se encuentra en la base de datos de acceso público del GenBank mediante el software libre BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.14. Secuenciación de ADN metagenómico

Se tomó 20 µl del ADN proveniente de la hemolinfa, así como de los co-cultivos; y se enviaron a secuenciar al laboratorio MR DNA, a través de plataforma de secuenciación Ion Torrent. Los datos obtenidos fueron cargados en el servidor MG RAST (MetaGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology), versión 3.2 (Argonne National Laboratory <http://metagenomics.anl.gov/metagenomics.cgi?page=Analysis>), posteriormente fueron procesados utilizando los siguientes parámetros de configuración: la fuente de anotación (Annotation sources) fue RDP; el máximo valor e (Max. e-Value Cutoff) de -5; el porcentaje mínimo de identidad (Max. e-Value Cutoff) de 97%, y la longitud de alineamiento (Min. Alignment Length Cutoff) de 50. (Glass *et al.* 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Identificación de cepas bacterianas aisladas de la hemolinfa, mediante la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S.

Mediante el aislamiento, la amplificación del gen ARNr 16S y la posterior secuenciación, se logró obtener secuencias con buen perfil de pureza; las secuencias al ser alineadas en la base de datos de BLAST mostraron un porcentaje de identidad entre 99-100% con secuencias de bacterias depositadas en la base de datos. En langostinos aparentemente sanos se encontraron varias especies del género *Bacillus* entre ellas: *B. beijingensis*, *B. firmus*, *B. foraminis*, *B. cereus*, además de *Pseudomonas stutzeri* y *Vibrio sinaloensis*. En langostinos enfermos se encontraron varias especies de bacterias del género *Vibrio*, incluyendo a *V. sinaloensis*, *V. harveyi*, *V. tubiashii*, *V. nigripulchritudo*, así también *Pseudomonas hibiscicola*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Chryseobacterium sp*, *Kocuria sp* y *B. cereus*.

Las especies de *V. sinaloensis* y *B. cereus* fueron encontradas tanto en langostinos sanos como enfermos. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Identificación de cepas bacterianas aisladas mediante la amplificación del gen ARNr 16S, en langostinos sanos y enfermos

Estado	Código	Descripción	Query cover	Ident	Accesión
Sano	2BC	<i>Bacillus beijingensis</i> strain ge10	100%	99%	NR_117988.1
	3BC	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain MZ-14	100%	99%	KU180436.1
	5BC	<i>Vibrio sinaloensis</i> strain CAIM 636	100%	99%	EU043382.1
	9BC	<i>Bacillus firmus</i> strain SEP-5	100%	99%	KF228909.1
	14 BC	<i>Bacillus foraminis</i> strain IHBB 9884	100%	100%	KR085884.1
	59BC	<i>Bacillus cereus</i> strain NK1	100%	99%	KT600324.1
Enfermo	1BC	<i>Vibrio sinaloensis</i> strain CAIM 636	100%	99%	EU043382.1
	7BC	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain S3	100%	100%	KF836437.1
	8BC	<i>Aerococcus viridans</i> strain CCUG4311.	100%	100%	CP014164.1
	10 BC	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC 43516	100%	99%	CP014038.1
	11BC	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain MOLA 1432	100%	96%	KM273943.1
	12BC	<i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19109 chromosome 1.	100%	98%	CP009354.1
	15BC	<i>Chryseobacterium</i> sp. H-6-1 gene for 16S rRNA	99%	99%	AB164636.1
	17BC	<i>Vibrio nigripulchritudo</i> str. SFn1	100%	99%	FO203526.1
	18BC	<i>Acinetobacter pittii</i> NBRC 110505	99%	100%	LC014124.1
	19BC	<i>Kocuria</i> sp. YIM 13062	99%	99%	KR610332.1
	20 BC	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain L3	100%	99%	KU212143.1
21BC	<i>Bacillus cereus</i> strain NK1	100%	100%	KT600324.1	

4.2. Análisis metagenómico de los co-cultivos bacterianos provenientes de hemolinfa de langostinos sanos y enfermos

Metagenómica de co-cultivo de hemolinfa de langostinos sanos

Los resultados de secuenciación revelaron que la microbiota bacteriana de los co-cultivos de langostinos aparentemente sanos, estuvo representada mayoritariamente por microorganismos del phylum *Proteobacteria* (64.2%, seguido del grupo no clasificado derivado de bacterias con aprox. 20.6%; del phylum *Firmicutes* con aprox. 14,76%, y en menor porcentaje los phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Chloroflexi* y *Verrucomicrobia* (Ver Tabla 2; Gráfico1).

Tabla 2. Distribución de phylum a partir del dominio bacteria, de los co-cultivos de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos.

Phylum	Cs1 (%)	Cs2 (%)	Cs3 (%)	Promedio (%)
Proteobacteria	71.582	93.216	27.694	64.164
Unclassified (derived from Bacteria)	0.142	1.126	60.490	20.586
Firmicutes	28.240	5.614	10.439	14.764
Actinobacteria	0.006	0.016	1.318	0.447
Bacteroidetes	0.000	0.000	0.048	0.016
Fusobacteria	0.028	0.005	0.011	0.014
Chloroflexi	0.000	0.023	0.000	0.008
Verrucomicrobia	0.002	0.000	0.000	0.001

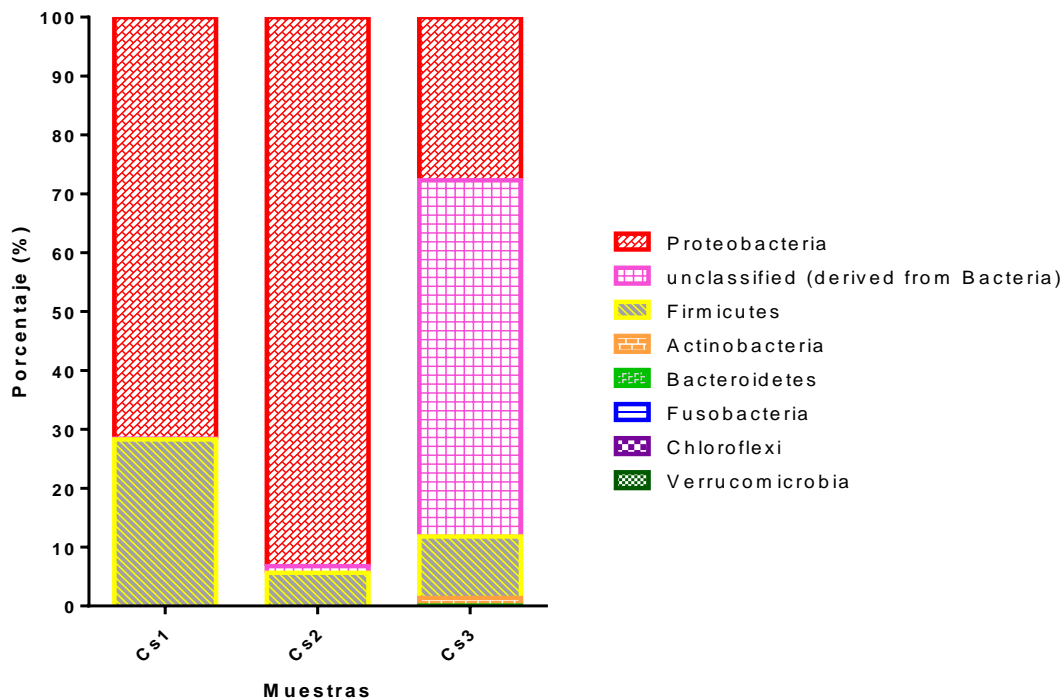


Gráfico 1. Distribución por phylum de las bacterias presentes en los co-cultivos de langostinos aparentemente sanos.

Así mismo, se encontraron un total de 64 géneros diferentes dentro de los co-cultivos de langostinos aparentemente sanos, mostrando mayor prevalencia el género *Vibrio* con 63,30% y en menor proporción el grupo no clasificado derivado de bacterias con 20,59%, *Lysinibacillus* con 8,94%, *Bacillus* con 2,79%, *Anoxibacillus* con 1,85%; entre otros en muy bajos porcentajes (Ver tabla 3, Gráfico 2)

Tabla 3. Distribución de géneros a partir del dominio bacteria, de los co-cultivos de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos.

Género	Cs1 (%)	Cs2 (%)	Cs3 (%)	Promedio (%)
<i>Vibrio</i>	71.175	93.118	25.610	63.301
<i>Unclassified (derived from Bacteria)</i>	0.142	1.126	60.490	20.586
<i>Lysinibacillus</i>	22.272	4.544	0.011	8.942
<i>Bacillus</i>	5.315	0.838	2.208	2.787
<i>Anoxybacillus</i>	0.475	0.007	5.075	1.852
<i>Staphylococcus</i>	0.002	0.208	1.929	0.713
<i>Unclassified (derived from Enterobacteriaceae)</i>	0.000	0.000	1.007	0.336
<i>Acinetobacter</i>	0.000	0.000	0.595	0.198
<i>Leifsonia</i>	0.000	0.000	0.332	0.111
<i>Micrococcus</i>	0.000	0.000	0.316	0.105
<i>Lactobacillus</i>	0.004	0.012	0.247	0.087
Otros	0.615	0.147	2.181	0.981

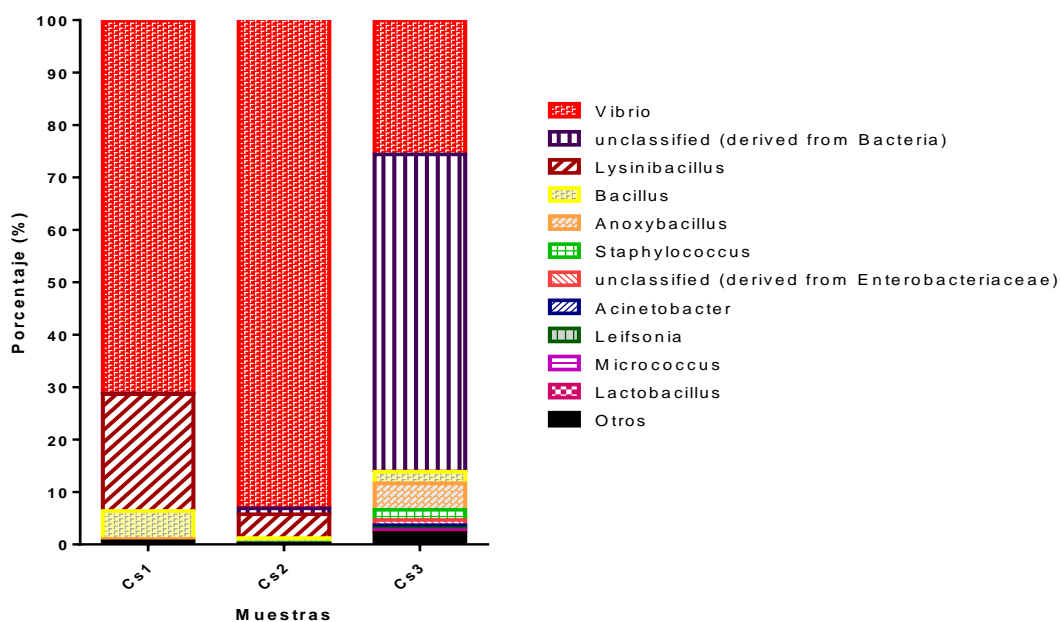
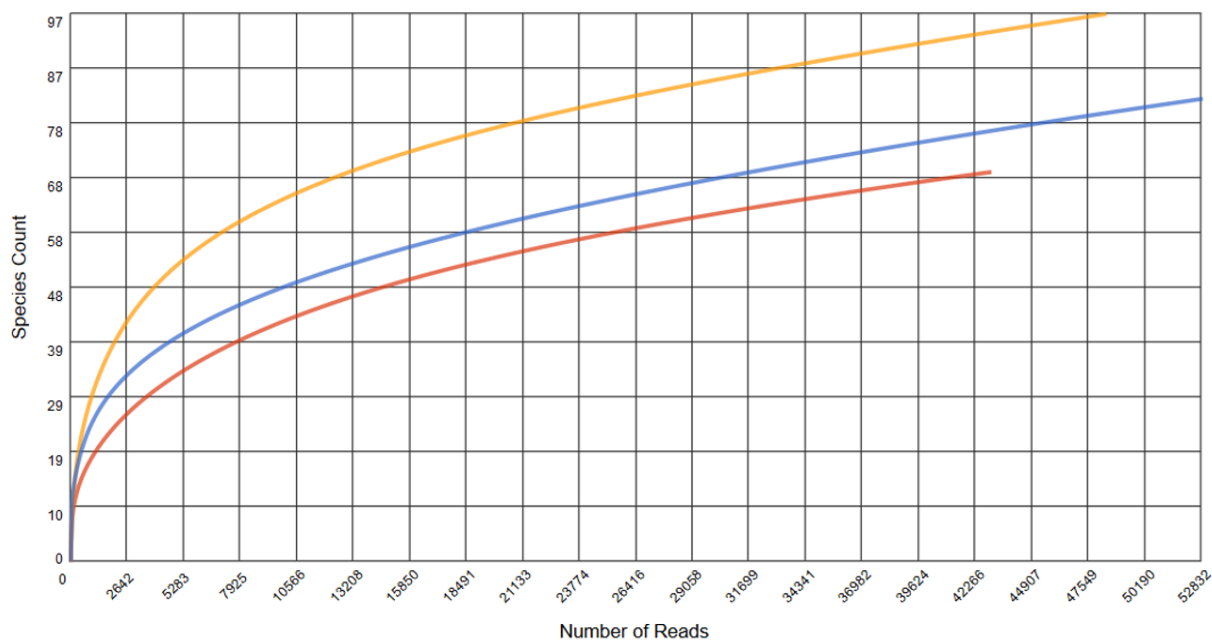


Gráfico 2. Distribución por género de las bacterias presentes en los co-cultivos de langostinos aparentemente sanos.

En el gráfico 3, se observan las curvas de rarefacción de cada uno de los metagenomas. La curva correspondiente al metagenoma Cs3 posee mayor número de especies. Así mismo, se puede evidenciar la continuidad de la curva, lo cual indica que el muestreo no fue suficiente para representar la totalidad de las especies. Mientras que los metagenomas de Cs1 y Cs2 mostraron un menor número de especies con respecto al Cs3. Respecto a la diversidad alfa (número de especies a nivel local); el metagenoma Cs1 mostró que a pesar de poseer menor número de especies fue el que presentó mayor diversidad (6,75) como se observa en la curva de rarefacción. En tanto, la muestra Cs3 mostró un valor ligeramente menor diversidad alfa de Cs2, debido a que la mayoría de especies se encuentran en el grupo no clasificado (*unclassified- derived from Bacteria*)



rarefaction curve	metagenome ▲▼	alpha diversity ▲▼
	Cs1	6.75
	Cs2	3.78
	Cs3	3.45

Gráfico 3. Curva de rarefacción de los co-cultivos bacterianos de la hemolinfa de langostinos sanos.

Metagenómica de co-cultivos de hemolinfa de langostinos enfermos

En la secuenciación de los co-cultivos bacterianos a partir de langostinos enfermos se observó mayor porcentaje de microorganismos pertenecientes al phylum *Proteobacterias* con aprox. 95,80%, y en porcentajes muy inferiores el phylum *Firmicutes* con 2,50%, unclassified (derived from Bacteria) con 1,68%, así también los phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* en porcentajes por debajo a los antes mencionados. Ver tabla y gráfico 4.

Tabla 4. Distribución por phylum a partir del dominio bacteria, de los co-cultivos de la hemolinfa de langostinos enfermos

Phylum	Ce1 (%)	Ce2 (%)	Promedio (%)
Proteobacteria	93.300	98.305	95.802
Firmicutes	3.636	1.363	2.500
Unclassified (derived from Bacteria)	3.034	0.319	1.677
Bacteroidetes	0.022	0.000	0.011
Actinobacteria	0.000	0.012	0.006
Fusobacteria	0.007	0.000	0.004

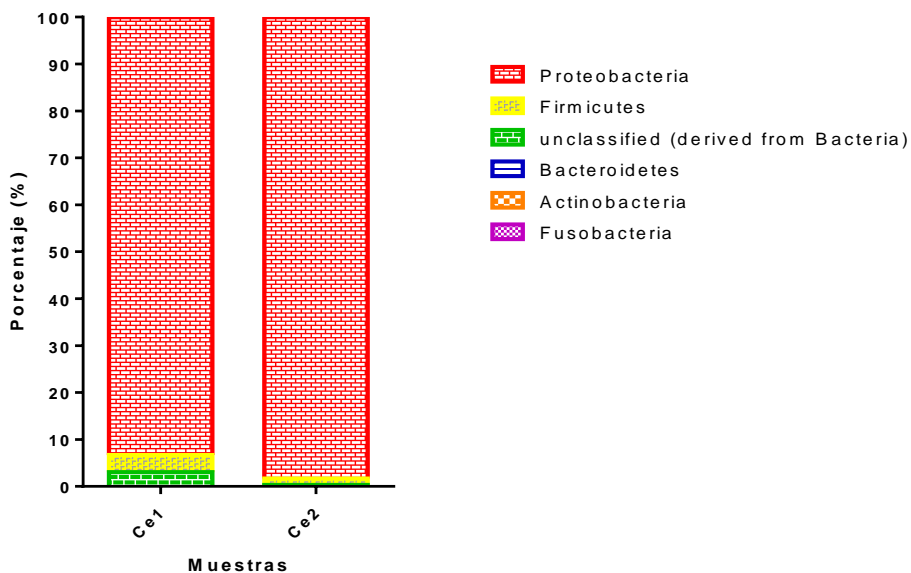


Gráfico 4. Distribución por phylum de las bacterias presentes en los co-cultivos de langostinos enfermos

Así mismo, se encontraron 25 géneros diferentes, siendo el más predominante *Vibrio* con el 88,96%, y en porcentajes menores los géneros *Listonella* con 5,82%, *Lysinibacillus* con 2,15%, no clasificados derivados de bacterias con 1,68%, entre otros géneros. Ver tabla y gráfico 5.

Tabla 5. Distribución de géneros a partir del dominio bacteria, de los co-cultivos de la hemolinfa de langostinos enfermos.

Género	Ce1 (%)	Ce2 (%)	Promedio (%)
<i>Vibrio</i>	92.543	85.377	88.960
<i>Listonella</i>	0.000	11.633	5.817
<i>Lysinibacillus</i>	3.622	0.672	2.147
<i>Unclassified (derived from Bacteria)</i>	3.034	0.319	1.677
<i>Unclassified (derived from Gammaproteobacteria)</i>	0.007	1.258	0.633
<i>Staphylococcus</i>	0.000	0.663	0.332
<i>Aliivibrio</i>	0.360	0.000	0.180
<i>Citrobacter</i>	0.264	0.000	0.132
<i>Klebsiella</i>	0.081	0.000	0.040
<i>Unclassified (derived from Alteromonadaceae)</i>	0.029	0.015	0.022
<i>Bacillus</i>	0.015	0.012	0.014
Otros	0.044	0.050	0.047

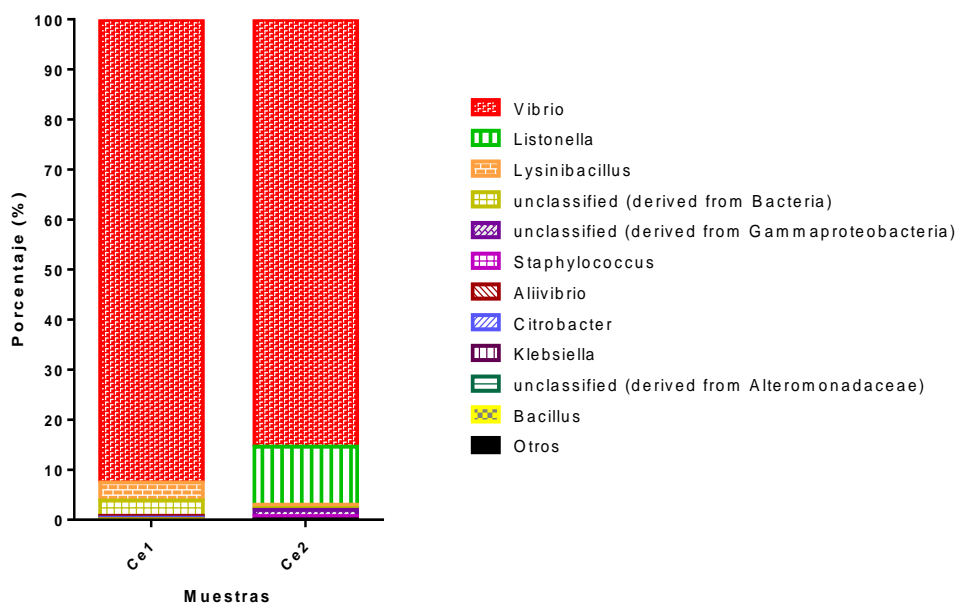


Gráfico 5. Distribución por género de las bacterias presentes en los co-cultivos de langostinos enfermos

El gráfico 6, muestra las curvas de rarefacción de los co-cultivos a partir de la hemolinfa de langostinos enfermos. Los resultados obtenidos fueron muy similares; presentando el metagenoma correspondiente a la muestra Ce2, ligeramente mayor número de especies en comparación de Ce1; además de una ligera mayor diversidad (Ce1= 6,75; Ce2= 5,86)

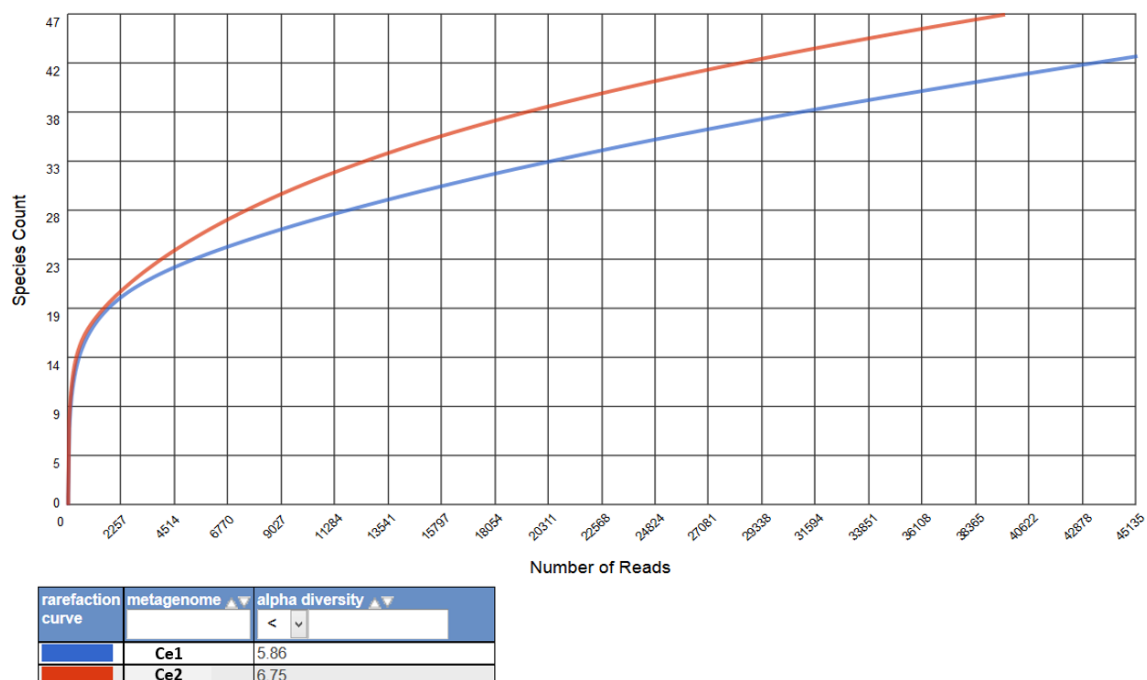


Gráfico 6. Curva de rarefacción de los co-cultivos bacterianos de la hemolinfa de langostinos sanos.

4.3. Análisis metagenómico de hemolinfa de langostinos sanos y enfermos

En la mezcla de hemolinfa de langostinos aparentemente sanos (Ds) predominó el phylum *Firmicutes* con el 43,21%, seguido de *Actinobacteria* con el 36,10%, *Proteobacteria* con el 11,78%; los no clasificados (derivados de bacterias) con 8,36%; y en menores porcentajes los phyla *Synergistetes* (0,55%) y *Bacteroidetes* (0,01%). Mientras que en la mezcla de hemolinfa de langostinos enfermos (De) predominó el grupo de los no clasificados (derivados de bacterias) con el 40,41%; seguido del phylum *Firmicutes* con el 35,40%, *Proteobacteria* con el 19,97%; *Actinobacteria* con el 4,16% y en menores porcentajes los phyla *Bacteroidetes* (0,04%) y *Cyanobacteria* (0,02). Ver tabla 6 y gráfico 7.

Tabla 6. Distribución de phylum de la mezcla de hemolinfa de langostinos aparentemente sanos (Ds) y enfermos (De).

Phylum	Ds (%)	De (%)
Firmicutes	43.206	35.397
unclassified (derived from Bacteria)	8.356	40.409
Actinobacteria	36.100	4.164
Proteobacteria	11.782	19.974
Synergistetes	0.550	0.000
Bacteroidetes	0.006	0.037
Cyanobacteria	0.000	0.018

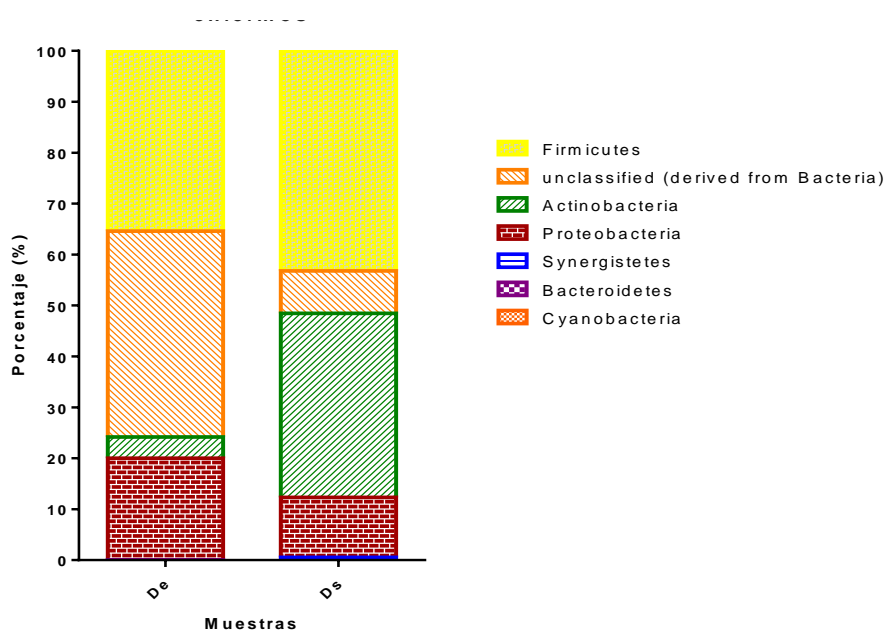


Gráfico 7. Distribución por phylum, de las bacterias presentes en la mezcla de hemolinfa de langostinos aparentemente sanos (Ds) y enfermos (De).

Así mismo, en langostinos aparentemente sanos se encontraron 30 géneros diferentes, entre los que destacan: *Staphylococcus* (39,47%), *Corynebacterium* (34,56%), no clasificados derivados de bacterias (8,36%), *Acinetobacter* (4,27%), entre otros. Mientras que en langostinos enfermos se encontraron 29 géneros diferentes destacando: el grupo no clasificado derivado de bacterias (40,41%), *Atopostipes* (21,67%), *Pseudomonas* (8,81%), *Enterococcus* (8,22%), *Brachymonas* (6,36%), entre otras. Ver tabla 7 y gráfico 8.

Tabla 7. Distribución de género de la mezcla de hemolinfa de langostinos aparentemente sanos (Ds) y enfermos (De).

Género	Ds (%)	De (%)
<i>unclassified (derived from Bacteria)</i>	8.356	40.409
<i>Staphylococcus</i>	39.468	0.000
<i>Corynebacterium</i>	34.560	3.612
<i>Atopostipes</i>	0.006	21.669
<i>Pseudomonas</i>	2.008	8.808
<i>Enterococcus</i>	0.000	8.218
<i>Brachymonas</i>	0.000	6.357
<i>Acinetobacter</i>	4.265	0.000
<i>Veillonella</i>	0.284	3.501
<i>Bradyrhizobium</i>	0.006	3.206
<i>Halomonas</i>	2.541	0.000
<i>Bacillus</i>	2.083	0.000
<i>Thermoanaerobacterium</i>	0.000	1.990
<i>Mycobacterium</i>	1.516	0.000
<i>Vibrio</i>	1.458	0.000
Otros	3.449	2.230

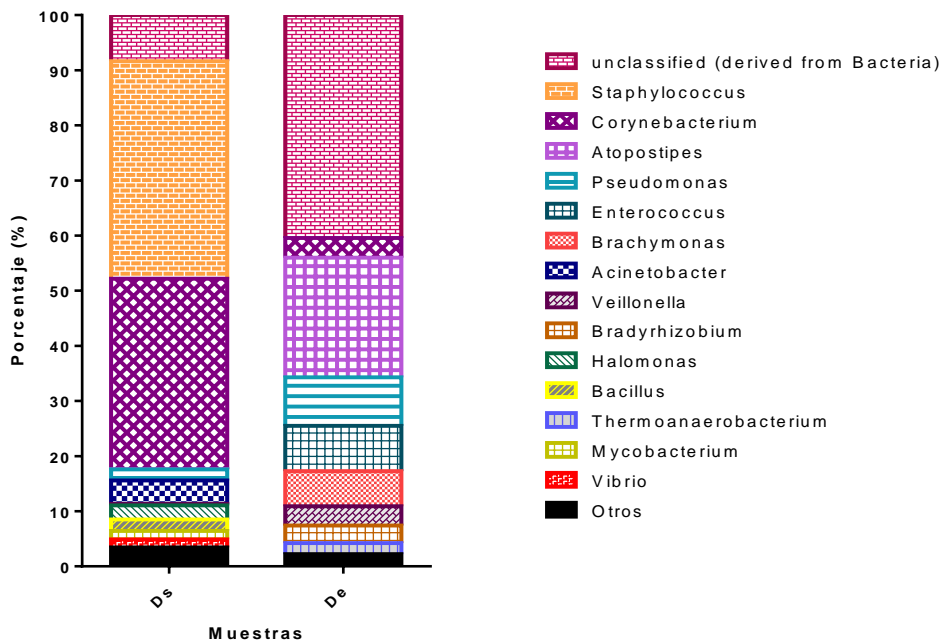


Gráfico 8. Distribución por género, de las bacterias presentes en la mezcla de hemolinfa de langostinos aparentemente sanos (Ds) y enfermos (De).

En el gráfico 9, se observa que el metagenoma de la mezcla de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos (Ds) presenta mayor número de especies, en comparación con el metagenoma encontrado en la mezcla de la hemolinfa de langostinos enfermos (De); Así mismo Ds contiene mayor diversidad especies (10, 28) que De (7,51), debido a que éste último presenta un mayor número de especies no clasificadas.

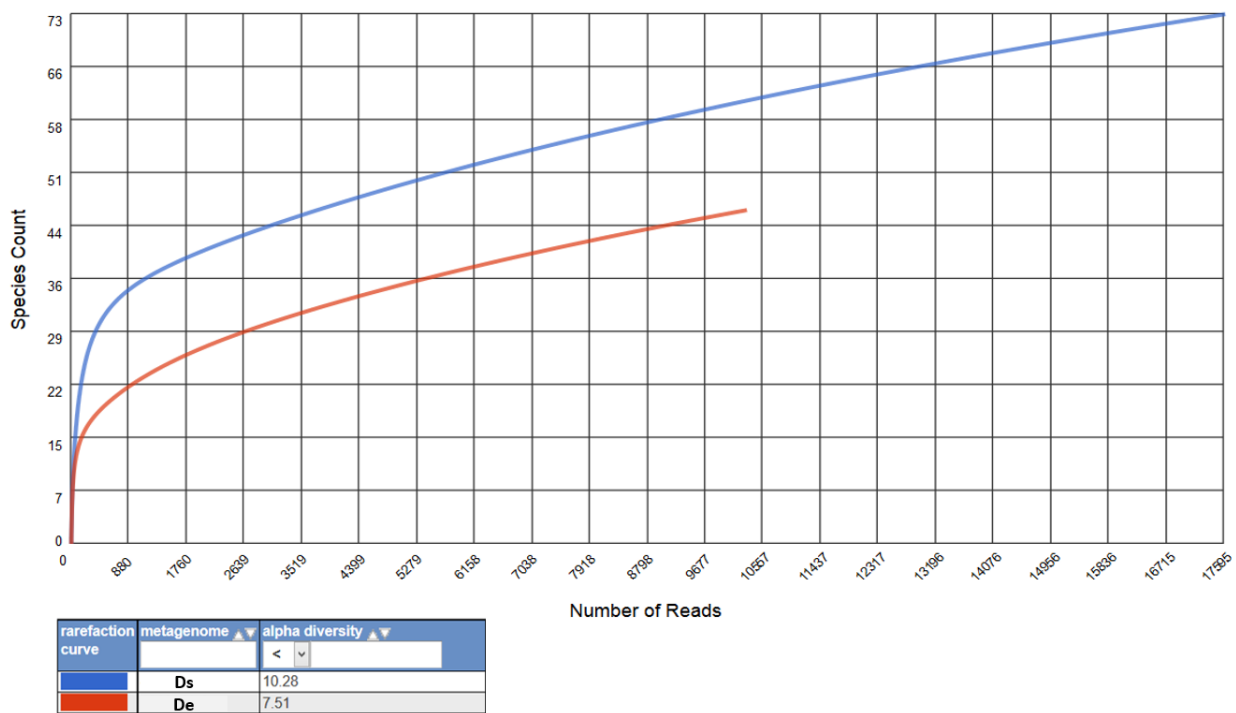


Gráfico 9. Curva de rarefacción de la mezcla de hemolinfa de langostinos aparentemente sanos (Ds) y enfermos (De).

5. DISCUSIÓN

Gopal *et al.*, (2005) y Lighner, (1977) reportaron que la hemolinfa de langostinos sanos es completamente estéril y que la presencia de bacterias en la hemolinfa es un indicativo de septicemia. Sin embargo, Gómez *et al.* (1998) demostraron la presencia de bacterias en la hemolinfa de langostinos *L. vannamei* sanos, encontrando entre ellas especies de *Vibrios*. Además, en dicha investigación, estos autores reportaron la presencia de bacterias en la hemolinfa *P. monodon* sanos, donde más del 50% correspondería a *Vibrio spp.*, y el restante a *Pseudomonas spp.* y *Aeromonas spp.*

Adicionalmente, Wang *et al.* (2014), en una investigación realizada sobre el camarón Kuruma *Marsopenaeus japonicus*, reportaron especies de vibrios y otras bacterias en su mayoría Gram negativas, incluyendo *Pseudoalteromonas spp.*, *Shewanella spp.*, *Alteromonas spp.*, *Marinomonas spp.*, *Tenacibaculum spp.*, *Psychromonas spp.*, *Neptumonas spp.*, *Enterobacter spp.*, y *Shewanella spp.*, mientras tanto Scott y Thune (1986) encontraron que la hemolinfa de crustáceos *Procambarus clarkii* sanos acogió varias cepas de bacterias Gram positivas, incluyendo a *Bacillus* y *Corynebacterium*, además de *Aeromonas* y *Vibrio*. Es por ello que Alburqueque-costa, Lima-Araujo and Dos Ferrnandes-Vieira (2013) sugieren que la hemolinfa de peneidos puede ser colonizada por especies de *Vibrios* sin necesidad de poner en riesgo la salud del animal.

Estas investigaciones se realizaron basándose en métodos dependientes del cultivo. Sin embargo, bajo las técnicas de aislamiento y caracterización molecular, se logró aislar cepas de *Bacillus beijingensis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Vibrio sinaloensis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus foraminis* y *Bacillus cereus* en animales aparentemente sanos.

Sorokulova *et al.* (2009), Chang *et al.* (2002) reportaron cepas de *B. cereus*, con capacidad quitinasa antifúngica; así mismo Jianguang *et al.* (2014); NavinChandran *et al.* (2014), mencionan que dichas cepas poseen capacidad antagónica contra patógenos del langostino, además de la producción de enzimas extracelulares; como suplemento alimenticio ha demostrado ser

eficiente en la estimulación del crecimiento e inmunidad en el langostino (Terhune, J., M. Liles, and J. Kloepper, 2015). Así mismo, Baskar and Kannan (2009), demostraron que además poseen efecto probiótico *in vivo*, reduciendo la mortalidad de post-larvas de *P. monodon* infectados con vibrios patógenos. Cepas de *B. firmus*, han sido reportadas con actividad antibacteriana (Setyati *et al.*, 2014) y además como probiótico (Nimrat and Vuthiphandchai, 2011); además cepas de *B. foraminis* han mostrado poseer actividad antagónica contra *Streptococcus iniae* y *Photobacterium damsela subsp. piscicida* en co-cultivo *in vitro* en ensayos de exclusión competitiva (Guo *et al.*, 2009). Así mismo, estas cepas bacterianas han sido utilizadas en la elaboración de compuestos para el tratamiento y prevención de infecciones en animales acuáticos (Terhune, Liles and Kloepper, 2015).

En el presente trabajo, además se logró aislar *Vibrio sinaloensis*, reportado como potencial patógeno a nivel de laboratorio y de cultivo (Suárez, 2008); aislado también del intestino y hepatopáncreas de *L. vannamei* (Flores-Miranda *et al.*, 2012., reportado además en *L. stylirostris* (Buller 2014) y en el pez *Lutjanus guttatus* (Gómez-Gil *et al.*, 2008).

Cepas de *Pseudomonas stutzeri*, han sido halladas en ecosistemas terrestres y marinos; consideradas importantes para la degradación de compuestos como el naftaleno (Bosch, *et al.* 1999), oxidación de sulfuros (RubY, Wirsen and Jannasch, 1981) y desnitrificación de suelos (Kariminiaae-Hamedani, Kanda, and Kato, 2004; Diep *et al.* 2009); además ayuda a disminuir altos niveles de amonio en los sistemas de crianza larval de peces y langostinos (Deng *et al.*, 2014, Kariminiaae Hamedani *et al.*, 2004; Diep *et al.* 2009), por lo que es sugerido como un candidato potencial para mejorar la calidad de agua y la estructura de la comunidad microbiana en sistemas acuícolas (Deng *et al.* 2014); Así mismo, ha mostrado ser fuente potencial para la producción de sustancias bioactivas como los antibiótico (Uzair *et al.*, 2008; Isnansetyo and Kamei, 2009).

Esta investigación pone en manifiesto otras comunidades bacterianas en la hemolinfa de animales aparentemente sanos, diferentes a las reportadas en

otras investigaciones, pudiendo deberse a que forman parte de la comunidad autóctona de la hemolinfa o bien que estas bacterias ingresaron a ella por otras vías.

Por otro lado, en los animales enfermos se aislaron diferentes bacterias del género *Vibrio*: *Vibrio sinaloensis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio tubiashii*, y *Vibrio nigripulchritudo*, entre otras especies: *Pseudomonas hibiscicola*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Chryseobacterium sp*, *Acinetobacter pittii*, *Kocuria sp.* y *Bacillus cereus*. *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo* y *V. sinaloensis*, reportados como patógenos potenciales en el cultivo de langostino (Uma *et al.*, 2008; Zhou J. *et al.* 2012); *V. tubiashii* aislado a partir de moluscos marinos enfermos *Crassostrea virginica*, *C. gigas* y *Ostrea edulis* (Farmen and Hickman-Brenner, 2006; Macián 2000) y como patógeno en el cultivo de *Marsopeneus japonicus* (Bower, McGladdery and Price, 1994).

Bacillus cereus, usado comúnmente como probiótico en sistemas acuícolas (Navinchandran *et al.* 2014, Nimrat and Vuthiphandchai 2011, Li *et al.*, 2015); *Pseudomonas hibiscicola*, ha sido aislada de ambientes marinos (Cui *et al.*, 2015) y estuarinos co-existiendo con comunidades de dinoflagelados (Alavi *et al.*, 2001).

Aerococcus viridans, aislado a partir de la hemolinfa de *Homarus lobster* (Lavallée *et al.*, 2001) y considerado como agente causal de la enfermedad de Gaffkemia (Treece and Fox, 1999). También ha sido reportado en poblaciones naturales de cangrejos *Cancer irroratus* y *Cancer borealis* a partir de aguas costeras marinas (Gallagher *et al.*, 1979).

Staphylococcus epidermidis; reportado como patógeno en organismos acuáticos (Gil *et al.*, 2000; Kubilay and Ulukoy, 2004; Kusuda y Sigiya, 1981); aislado también del intestino del langostino estuarino *Penaeus indicus* (Esakkiraj *et al.*, 2010).

Chryseobacterium sp. aislado a partir de los apéndices torácicos del camarón duende *Branchinella thailandensis* enfermos (Purivirojkul 2013) y considerado

como patógenos potenciales para animales acuáticos (Sevellec *et al.* 2014; Bernardet, *et al.* 2005; Bernardet *et al.* 2006; Zamora *et al.* 2012; Pridgeon, Klesius and García 2013)

Kocuria sp., utilizada como probiótico en el cultivo de trucha arcoíris y con capacidad antagónica contra *Vibrio anguillarum* (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014; Sharifuzzaman and Austin B. and Austin D. 2012).

En lo que respecta a los co-cultivos bacterianos de la hemolinfa y haciendo uso de técnicas de secuenciación del ADN, se determinó que sobre los co-cultivos bacterianos de la hemolinfa de animales aparentemente sanos, predominó el género *Vibrio* con el 63,30%, seguido del grupo no clasificados derivados de bacteria con el 20,59%, *lysini bacillus* con 8,94%, *Bacillus* con el 2,79% entre otras especies en menor porcentaje. Entre las especies de *Lysinibacillus* se han reportado cepas con potencial antifúngico (Kumar *et al.*, 2012) y antibacteriano en vegetales (Yong *et al.*, 2015, Ahmad *et al.*, 2014).

Mientras que en los co-cultivos de animales enfermos, el porcentaje de *Vibrio* fue mayor con un porcentaje de 88,96%, seguido de *Listonella* con el 5,82%, *lysini bacillus* con 2,15%, y otros géneros en menores porcentajes. Los dos primeros géneros están implicados como patógenos de camarones peneidos y peces (Austin B. and Austin D. 2012; Buller, 2014).

Una visión diferente se pudo encontrar en la metagenómica directa, en donde la microbiota de la hemolinfa de animales aparentemente sanos estuvo constituida por *Staphylococcus* con el 39,47%, *Corynebacterium* con el 34,56%, *Acinetobacter* con el 4,27%, *Bacillus* con el 2,08%, entre otros géneros en menores porcentajes. Varias especies de *Staphylococcus* entre ellas: *S. aureus*, *S. epidermis* y *S. warneri* han sido aisladas a partir de peces enfermos (Austin B. and Austin D. 2012). Especies de *Corynebacterium* constituyen parte de la población bacteriana de camarones (Ranjit, 2000) y también han sido aisladas a partir de estanques de langostinos durante el periodo inicial del cultivo de *L. vananmei* (Zongli and Kai, 2011)

En la metagenómica directa, los langostinos que mostraron signos de enfermedad se encontraron gran cantidad de microorganismos no clasificados derivados de bacterias con el 41%, *Atopostipes* con el 21,67%, *Pseudomonas* con el 8,81%, *Enterococcus* con el 8,22%, *Brachymonas* con el 6,36%, entre otros géneros en menores porcentajes. *Brachymonas* han sido encontradas en los efluentes acuícolas (Tsukuda *et al.* 2015).

Al parecer la patogenicidad de los animales muestreados no sólo puede ser atribuida a especies del género *Vibrio*, sino también a otros tipos de bacterias que pueden estar consideradas dentro del grupo de los no clasificados derivados de bacterias; sin embargo, existen unas bacterias que son más cultivables que otras debido a que los medios de cultivos cumplen con sus exigencias nutricionales, favoreciendo así su proliferación y modificando la estructura real de la microbiota. Al parecer en este caso destacarían las especies del género *Vibrio* las cuales a nivel de cultivo y co-cultivo proliferan en más del 60%, sin embargo, a nivel de metagenómica este porcentaje se ve muy reducido.

Cabe indicar que no todas las muestras de hemolinfa condujeron a obtener un crecimiento bacteriano a nivel de co-cultivos, lo cual también ha sido reportado por Wang X. y Wang J. (2015), quienes indicaron que la colonización de la microbiota en la hemolinfa no es un evento ubicuo.

Estos resultados de metagenómica conducirían a tener la respuesta del por qué el uso de ciertas sustancias antimicrobianas en los sistemas de crianza de langostino no ha sido efectivo para la eliminación de ciertos patógenos; quizá se estaba tratando de eliminar a un patógeno mal identificado.

Así mismo, del por qué la adición de ciertos probióticos comerciales no ha tenido la eficacia deseada; pudiendo ser que realmente no tenían el poder de inhibición de las bacterias o el poder de mejorar el sistema de crianza. En el presente trabajo, también se investigó este hecho, evaluando probióticos comerciales (datos no mostrados) a través de ensayos direccionados a la detección de genes

antimicrobianos; pero los ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que no eran realmente efectivos.

Por lo tanto, estos resultados confirman lo manifestado por Wang X. y Wang J. (2015), quienes indican que la hemolinfa de ciertos crustáceos aparentemente sanos no siempre es estéril, y que posee una microbiota endémica. En concordancia con lo manifestado con Gómez *et al.* (1998); estos autores también reportan que la hemolinfa de animales aparentemente sanos posee una baja carga bacteriana, representada comúnmente por especies del género *Vibrio*. Sin embargo, en esta investigación también se pudo determinar la presencia de otros géneros bacterianos presentes en mayor porcentaje.

Además, se corroboró que dicha estructura es modificada cuando los animales enfrentan un cuadro de enfermedad y/o estrés, apareciendo nuevas especies y sustituyendo algunos géneros presentes en animales aparentemente sanos; pudiendo ser estos los causantes de las patologías.

Es así que la metagenómica se perfila como una de las herramientas más innovadoras para conocer la estructura de la microbiota, y las variaciones que ocurren en esta frente a una situación adversa (estrés) ya que mostró con mayor detalle la composición de los microorganismos presentes en la hemolinfa, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

6. CONCLUSIONES

- Se determinó en este estudio que la hemolinfa de langostino *L. vannamei* aparentemente sanos, no siempre es estéril, y puede ser albergada por una microbiota bacteriana compuesta por microorganismos de diversos géneros, no limitándose únicamente a especies del género *Vibrio*.
- Se determinó que los medios de cultivo (cultivos aislados y co-cultivo) favorecen a la proliferación de ciertos géneros bacterianos destacando entre ellos a bacterias del género *Vibrio*, es por ello que al realizar el análisis microbiológico tradicional es el género que más predomina debido posiblemente a que asimila más rápido los nutrientes lo que conlleva a una rápida multiplicación.
- Se determinó a nivel metagenómico la posible estructura de la microbiota autóctona en la hemolinfa del langostino sanos y enfermos, como análisis previos (de un determinado entorno), para valorizar a la técnica de metagenómica como herramienta en la caracterización de nuevos microorganismos que hasta hoy no se han reportado en la hemolinfa del langostino.

7. RECOMENDACIONES

- Enriquecer los medios de cultivos con diferentes fuentes nutricionales, para conocer una mayor diversidad bacteriana, ya que las exigencias de desarrollo bacteriano varían de una especie a otra, y de esta manera poder aislar una mayor cantidad de microorganismos presentes en la hemolinfa.
- Repetir las pruebas de metagenómica directa de la hemolinfa de animales sanos, con muchos más ejemplares de manera individual para conocer fehacientemente la estructura microbiana y así poder determinar a los microorganismos predominantes en la microbiota de la hemolinfa.
- Realizar infecciones experimentales de los mismos individuos, para conocer las variaciones que puede sufrir la estructura microbiana, en presencia de bacterias potencialmente patógenas mediante análisis metagenómicos y así poder determinar si estas especies influyen en el desarrollo de una septicemia.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Acosta, A. 2013. *Comunidades microbianas en sedimentos marinos contaminados por el vertido de Prestige*. Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Ahmad, V., A. Igbal, M. Haseeb and M. Khan. 2014. Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus jx416856* against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste. *Anaerobe*. 27: 87-95
- Alavi, M., T. Miller, K. Erlandson, R. Schneider and R. Belas. 2001. Bacterial community associated with Pfiesteria-like dinoflagellate cultures. *Environmental Microbiology* 3(6): 380-396.
- Albuquerque-Costa, R., R. Lima-Araújo and R. H. S. dos Fernandes-Vieira. 2013. Phenotyping of vibrios isolated from marine shrimp hemolymph Fenotipado de cepas de *Vibrio* aisladas de la hemolinfa de camarones marinos. *Ciencias Marinas* 39(3): 317-321.
- Alfaro, R., M. Guevara e I. Gonzales. 2010. Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Revista Peruana de Biología* 17(3): 359-364.
- Amann, R., W. Ludwig and K. Schleifer. 1995. Phylogenetic Identification and *In situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbial Rev.* 59:143–169.
- Austin, B. and D. Austin. 2012. *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*. New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Austin, B., L. Stuckey, P. Robertson, I. Effendi and D. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*. 18: 93–96.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191:3–11.
- Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. Semenkovich *et al.* 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15718-15723.
- Baskar, P.V. and S. Kannan. 2009. Marine Bacteria as Probiotics to Control *Pathogenic Vibrio* on Infected Shrimp. *Academic Review* (1): 77-85.
- Bernardet, J. F., M. Vancanneyt, O. Matte-Tailliez, L. Grisez, P. Tailliez, C. Bizet, M. Nowakowski *et al.* 2005. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains

- isolated from diseased aquatic animals. *Systematic and applied microbiology* 28(7): 640-660.
- Bernardet, J.F., C. Hugo and B. Bruun. 2006. The Genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*: In *The Prokaryotes, a Handbook on the biology of bacteria*. Ed. Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer and S. Stackebrandt, 638-676. New York, USA: Springer
- Bosch, R., E. R Moore, E. García-Valdés, and D. H. Pieper. 1999. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Journal of bacteriology* 181(8): 2315-2322.
- Bower, S. M., S. E. McGladdery and I. M. Price. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* 4:1-199.
- Brock, J. A. and D. V Lightner. 1990. Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *Diseases of marine animals* 3: 245-349.
- Buller, N. 2014. *Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals: a practical identification manual*. 2nd edition. Bentley, Australia: Cabi
- Chang, W., C. Chen and S. Wang. 2002. An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus cereus* with Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source. *Current microbiology* 47(2): 0102-0108.
- Chung-Te, L., C. I-Tung, Y. Yi-Ting, K. Tzu-Ping, H. Yun-Tzu, H. Jiun-Yan, H. Ming-Fen *et al.* 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(34): 10798-10803.
- Collado, M., C. Bauerl and G. Pérez-Martínez. 2012. Defining microbiota for developing new probiotics. *Microbial Ecology in Health and Disease* (23): 18579.
- Cornick, J.W. and J. E. Steward. 1966. Microorganisms Isolated from the *Hemolymph* of the Lobster (*Homarus americanus*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* 23 (9): 1451–1454.
- Costa, R., I. Mermound, S. Kovlavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Legroumellec *et al.* 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164 (1):297–309.
- Cui, H., M. Yang, L. Wang and C. J. Xian 2015. Identification of a New Marine Bacterial Strain SD8 and Optimization of Its Culture Conditions for Producing Alkaline Protease. *PloS one* 10(12): e0146067.
- Deng, B., L. Fu, X. Zhang, J. Zheng, L. Peng, J. Sun, H. Zhu *et al.* 2014. The denitrification characteristics of *Pseudomonas stutzeri* SC221-M and its

- application to water quality control in grass carp aquaculture. *PloS one* 9(12): 114886.
- Diep, C. N., P. M. Cam, N. H. Vung and T. T. Lai. 2009. Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment. *Bioresource technology* 100(16): 3787-3791.
- Eikmeyer, F. G., P. Köfinger, A. Poschenel, S. Jünemann, M. Zakrzewski, S. Heinel, E. Mayrhofer *et al.* 2013. Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *Journal of biotechnology* 167(3): 334-343.
- Esakkiraj, P., M. Rajkumarbharathi, A. Palavesam and G. Immanuel. 2010. Lipase production by *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp *Penaeus indicus*. *Annals of microbiology* 60(1): 37-42.
- Farmer, J. J. and F. W. Hickman-Brenner. 2006. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In *The prokaryotes*. A handbook on the biology of bacteria: Proteobacteria: Gamma subclass. Ed. Dworkin M., S. Falkow, E. Rosenberg. K-H Schleifer and E. Stackebrandt, 508-563. Minnesota, USA: Springer
- Flores-Miranda, M., A. Luna-González, Á. I. Campa Córdova, J. A. Fierro-Coronado, B. O. Partida-Arangure, J. Pintado and H. A. González-Ocampo. 2012. Isolation and characterization of infectious *Vibrio sinaloensis* strains from the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical* 60(2): 567-576.
- Gallagher, M. L., J. H. Rittenburg, R. C. Bayer and D. F. Leavitt. 1979. Incidence of *Aerococcus Viridans* (Var.) Homari in Natural Crab (*Cancer Irrorat* Us, *Cancer Borealis*) Populations from Maine Coastal Waters. *Crustaceana* 37(2): 316-317.
- Garnier, M., Y. Labreuche, C. Garcia, M. Robert and J. L. Nicolas. 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial ecology* 53 (2): 187–196.
- Gill, S., M. Pop, R. DeBoy, P. Eckburg, P. Turnbaugh, B. Samuel, J. Gordon *et al.* 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312 (5778): 1355–1359
- Gil, P., J. Vivas, C. S. Gallardo, and L. A. Rodriguez. 2000. First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain. *Journal of Fish Diseases* 23(4): 295-298.
- Givens, C., K. Burnett, L. Burnett and J. Hollibaugh. 2013. Microbial communities of the carapace, gut, and hemolymph of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine biology* 160(11): 2841-2851.

- Glass, E., J. Wilkening, A. Wilke, D. Antonopoulos and F. Meyer. 2010. Using the Metagenomics RAST Server (MG-RAST) for Analyzing Shotgun Metagenomes. *Cold Spring Harbor Protocols* 1: 1-9
- Gomez-Gil B., L. Tron, A. Roque, J. Turnbull, V. Inglis and A. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163(1): 1-9.
- Gomez-Gil, B., E. Fajer-Avila, J. Pascual, M. C. Macian, M. J. Pujalte, E. Garay and A. Roque. 2008. *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58(7): 1621-1624.
- Gómez-Gil, B., A. Roque y F. A. Guerra. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. *Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM. Mazatlán, Sinaloa México* 315-346.
- Goers, L., P. Freemont and K. Polizzi. 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface* 11 (96): 20140065.
- Gopal, S., S. Otta, S. Kumara, I. Karunasagara, M. Nishibuchib and I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 102 (2005) 151– 159.
- Guo, J. J., K. F. Liu, S. H. Cheng, C. I. Chang, J. J. Lay, Y. O. Hsu, J. Y. Yang *et al.* 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research* 40(5): 609-618.
- Harcombe, W. 2010. Novel cooperation experimentally evolved between species. *Evolution* 1-6.
- Hooper, L., T. Midtvedt and J. Gordon. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22:283–307
- Ishimaru, K.M., M. Akagawa and K. Muroga. 1995. *Vibrio penaeicida* sp nov. A pathogen of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1:134–138.
- Isnansetyo, A. and Y. Kamei. 2009. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36(10): 1239-1248.

- Jayasree, L., P. Janakiram and R. T. Madhavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society* 37:523–532.
- Kamada, N., G. Y. Chen, N. Inohara and G. Núñez. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology* 14(7) 685-690.
- Kariminiaae-Hamedani, H. R., K. Kanda and F. Kato. 2004. Denitrification activity of the bacterium *Pseudomonas* sp. ASM-2-3 isolated from the Ariake Sea tideland. *Journal of bioscience and bioengineering* 97(1): 39-44.
- Kato, S, S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii and Y. Igarashi. 2005. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7099–7106.
- Keegan, K., E. Glass and F. Meyer 2016. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. Martin F. and S. Uroz (eds.). *Microbial Environmental Genomics (MEG)* (1399) 1: 207-233 pp.
- Kopke, B., R. Wilms, B. Engelen, H. Cypionka and H. Sass. 2005. Microbial diversity in Coastal Subsurface Sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Appl Environ Microbiol* 71: 7819-7830.
- Kubilay, A. and G. Ulukoy. 2004. First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey. *Bulletin-european association of fish pathologists* 24(3): 137-143.
- Kusuda, R. and A. Sugiyama. 1981. Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased fishes, 1: on the morphological, biological and biochemical properties. *Fish Pathology*.
- Lavallée, J., K. L. Hammell, E. Spangler and R. J. Cawthorn. 2001. Estimated prevalence of *Aerococcus viridans* and *Anophryoides haemophila* in American lobsters *Homarus americanus* freshly captured in the waters of Prince Edward Island, Canada. *Diseases of aquatic organisms* 46(3), 231.
- Li, J., Y. Xu, L. Jin and X. Li. 2015. Effects of a probiotic mixture (*Bacillus subtilis* YB-1 and *Bacillus cereus* YB-2) on disease resistance and non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture Research* 46(12): 3008-3019.
- Lightner, D.V. 1977. Shrimp diseases. In: *Sindermann, C.J. Ed. Disease Diagnosis and Control in North American Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, 10–77.
- Lightner, D. V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge

- Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the western hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106:110-130
- Lokmer, A. and K. Wegner. 2014. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *International Society for Microbial Ecology* 1-13
- Macian, M. C., E. Garay, F. Gonzalez-Candelas, M. J. Pujalte and R. Aznar. 2000. Ribotyping of *Vibrio* populations associated with cultured oysters (*Ostrea edulis*). *Systematic and applied microbiology* 23(3), 409-417.
- Markowitz, V. M., I. M. A. Chen, K. Chu, E. Szeto, K. Palaniappan, Y. Grechkin, A. Ratner *et al.* 2012. IMG/M: the integrated metagenome data management and comparative analysis system. *Nucleic acids research*. 40 (D1): D123-D129.
- Marmann, A., A. Aly, W. Lin, B. Wang and P. Proksch. 2014. Co-Cultivation- A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. *Mar. Drugs* 12: 1043-1065
- McFall-Ngai, M., M.G. Hadfield, T. C. Bosch, H. V. Carey, T. Domazet-Loaso, A. E. Douglas *et al.* 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 3229–3236.
- Mendoza, D. 2011. Panorama de la Acuicultura Mundial, en América Latina y el Caribe y en el Perú. Dirección General de Acuicultura, Ministerio de la Producción. Lima, Perú
- Meyer, F., D. Paarmann, M. D'Souza, R. Olson, E. Glass, M. Kubal, T. Paczian *et al.* 2008. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:386
- Ministerio de la producción. 2013. <http://www.produce.gob.pe/index.php/estadistica/acuicultura>.
- Morales, C., y S. María. 2011. Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. *Revista Científica* 21 (005).
- Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye and N. Oseko. 1994. Mass mortality of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus*, in japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathol.* 29 (2): 135-139.
- NavinChandran, M., P. Iyapparaj, S. Moovendhan, R. Ramasubburayan, S. Prakash, G. Immanuel and A. Palavesam. 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus*

- monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 36 (2014): 38e45.
- Nimrat, S. and V. Vuthiphandchai. 2011. *In vitro* evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. *African Journal of Biotechnology* 10(22): 4643-4650.
- Olson, J.B., R. W. Thacker and D. J. Gochfeld. 2014. Molecular community profiling reveals impacts of time, space, and disease status on the bacterial community associated with the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87: 268–279.
- Otta, S., E. Praveena, T. Bhuvanewari and P. Patil. 2014. Early mortality syndrome (EMS) / acute hepatopancreatic Necrosis disease (AHPND)-an update. In: Otta S., Poornima M., and Patil P. (ed.) *Training Manual on Health management practices for finfish and shellfish of brackishwater environment* 98-100.
- Pérez-Sánchez, T., I. Ruiz-Zarzuela, I. Blas and J. L. Balcázar. 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture* 6(3): 133-146.
- Perkel, J. 2011. Making contact with sequencing's fourth generation. *BioTechniques* 50(2): 93-95.
- Phianphak, W, S. Rengpipat, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus spp.* for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Science Research Chula University* 24: 42–51.
- Pridgeon, J. W., P. H. Klesius and J. C. Garcia. 2013. Identification and virulence of *Chryseobacterium indologenes* isolated from diseased yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of applied microbiology* 114(3): 636-643.
- Purivirojkul, W. 2013. Application of probiotic bacteria for controlling pathogenic bacteria in fairy shrimp *Branchinella thailandensis* culture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13(1).
- Rascovan, N. 2013. *Abriendo la caja negra de los microbiomas ambientales argentinos. Caracterizaciones funcionales y ecológicas en lagunas de altura andinas y suelos de la pampa húmeda con secuenciación de alto rendimiento.* Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Ranjit, S. 2000. *Impact of feed and feed ingredients on the environment and microflora of farmed shrimp.* Tesis Doctoral. Central Institute of Fisheries Education, Versova.
- Rendón, L. y J. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista Aquatic* 19: 27-32

- Rengpipat, S, W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 301– 313.
- Rodicio, M. R. and M. C. Mendoza. 2004. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 22(4): 238.
- Ruby, E. G., C. O. Wirsen, and H. C. Jannasch. 1981. Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos Rift hydrothermal vents. *Applied and environmental microbiology* 42(2): 317-324.
- Rungrassamee, W., A. Klanchui, S. Maibunkaew, S. Chaiyapechara, P. Jiravanichpaisal and N. Karoonuthaisiri. 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PloS one* 9(3): e91853.
- Santiago, M., A. Espinosa y M. Bermúdez. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40 (3): 22-32
- Schink, .2002. Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:257–261
- Schmeisser, C., H. Steele and W. Streit. R. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied microbiology and biotechnology* 75(5): 955-962.
- Schotler, M., M. Lebuhn, T. Heulin, and A. Hartmann. 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:647-660.
- Scott, J.R. and R. L. Thune 1986. Bacterial flora of hemolymph from red swamp crawfish *Procambarus clarkii* (Girard), from commercial ponds. *Aquaculture* 58: 161.
- Setyati, W., E. Martani, Triyanto, Subagiyo and M. Zainuddin. 2014. Selection, Identification and Optimization of the Growth Water Probiotic Consortium of Mangrove Ecosystems as Bioremediation and Biocontrol in Shrimp Ponds. *JPHPI* (17): 243-253
- Sevellec, M., S. A. Pavey, S. Boutin, M. Filteau, N. Derome and L. Bernatchez. 2014. Microbiome investigation in the ecological speciation context of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) using next-generation sequencing. *Journal of evolutionary biology* 27(6): 1029-1046.
- Sharifuzzaman, S. M. and B. Austin.2009. Kocuria SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 108: 2162 – 2170.
- Sindermann, C. J. 1990. *Principal diseases of marine fish and shell fish*. 2nd edition. New York, USA: Academic Press, Inc.

- Singh, R. K., D. P. Kumar, M. K. Solanki, P. Singh, A. K. Srivastva, S. Kumar and P. L. Kashyap. 2013. Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18. *Journal of basic microbiology* 53(5): 451-460.
- Sorokulova, I., A. Krumnow, L. Globa and V. Vodyanoy. 2009. Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36(8): 1123-1126.
- Soto, S.A., B. Gomez, R. Lozano, M. Betancourt and M. Morales. 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol* 1 (5):1689-99.
- Staley, J.T. and A. Konopka. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39: 321-346.
- Streit, W. R. and R. A. Schmitz. 2004. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Current opinion in microbiology* 7(5): 492-498.
- Suárez, C. 2008. *Cuantificación y caracterización molecular de bacterias de hemolinfa de camarones Litopenaeus vannamei durante brotes del síndrome de mancha blanca y evaluación de sensibilidad a cinco productos antibacterianos*. Trabajo de grado para optar el título de microbiólogo industrial. Colombia. 1-233.
- Sun, S, J. Chen, W. Li, I. Altintas, A. Lin, S. Peltier, K. Stocks *et al.* 2011. Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource. *Nucleic Acids Research*. gkq1102.
- Tamaki, H., S. Hanada, Y. Sekiguchi, Y. Tanaka and Y. Kamagata. 2009. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ Microbiol* 11: 1827-1834.
- Terhune, J., M. Liles and J. Kloepper. 2015. Bacillus bacteria for use in treating and preventing infection in aquatic animals U.S. Patent No. 9,205,116. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Thomas, T., J. Gilbert and Meyer, F. 2012. Metagenomics—a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation* 2(1): 1.
- Tran, L., L. Nunan, R. Redman, L. Mohny, C. Pantoja, K. Fitzsimmons and D. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ* 105(1): 45-55.

- Treece, G. D. and J. M. Fox. 1999. *Design, operation and training manual for an intensive culture shrimp hatchery*. Texas, USA: Texas A&M University Sea Grant College Program.
- Tsukuda, S., L. Christianson, A. Kolb, K. Saito and S. Summerfelt. 2015. Heterotrophic denitrification of aquaculture effluent using fluidized sand biofilters. *Aquacultural Engineering* 64: 49-59.
- Trujillo, T., G. Aguirre-Guzmán, J. Sánchez y J. Rábago-Castro. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio sp.* en juveniles de camarón blanco del Pacífico (Boone, 1931). *Ciencia y Mar* IX (27): 11-18.
- Tuyub, J., D. Rendíz, R. Rojas, G. Gaxiola and M. Arena. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus* 3:280.
- Tubiash, H. S., R. K. Sizemore and R. R. Colwell. 1975. Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: most probable numbers. *Applied microbiology* 29(3): 388-392.
- Uma, A., S. Meena, K. Saravanabava and B. Muralimanohar .2008. Identification of bacterial pathogens infecting *Penaeus monodon*, tiger shrimp by 16S rDNA amplification and sequencing. *Tamilnadu J Veterinary and Animal Science* 4: 188–192.
- Uma, A., T. J. Abraham, M. J. P. Jeyaseelan and V. Sundararaj. 1999. Effect of probiotic feed supplement on performance and disease resistance of Indian white shrimp *Penaeus indicus* H. Miline Edwards. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 14: 159-164.
- Uzair, B., N. Ahmed, V. U. Ahmad, F. V. Mohammad and D. H. Edwards. 2008. The isolation, purification and biological activity of a novel antibacterial compound produced by *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS microbiology letters* 279(2): 243-250.
- Verschuere, I., G. Rombaut, O. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64: 655-671.
- Vijayabharathi, V., R. Parthasarathy, S. Gokilavani and D. Ravi. 2013. Assessment of the Bacterial Flora in Hemolymph and Hematological Changes in Bacteria-Infected Fresh Water Crab *Paratelphusa Hydrodromas* (Herbst 1974). *Indian Journal Of Applied Research*: 1-3
- Wang, X.-W. and J.-X. Wang. 2015. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. *Mol. Immunol* 1-6.
- Wang, X. W., J. D. Xu, X. F. Zhao, G. R. Vasta and J. X. Wang. 2014. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining

- the expression of antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry* 289(17): 11779-11790.
- Wilke, A., J. Bischof, W. Gerlach, E. Glass, T. Harrison, K.P. Keegan, T. Paczian *et al.* 2016. The MG-RAST metagenomics database and portal in 2015. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44
- Yong, D., R. Ee, Y. L. Lim, C. Y. Chang, W. F. Yin and K. G. Chan. 2015. Insights on quorum-quenching properties of *Lysinibacillus fusiformis* strain RB21, a Malaysian municipal solid-waste landfill soil isolate, via complete genome sequence analysis. *Genome announcements* 3(3): e00409-15.
- Zaid, A., H. G. Hughes, E. Porceddu and F. Nicholas. 2001. Glossary of biotechnology for food and agriculture: Arevised and augmented edition of the glossary of biotechnology and genetic engineering. *FAO*, Roma (Italia).
- Zamora, L., A. I. Vela, M. A. Palacios, L. Domínguez and J. F. Fernández-Garayzábal. 2012. First isolation and characterization of *Chryseobacterium shigense* from rainbow trout. *BMC veterinary research* 8(1): 1.
- Zeidan, A., P. Radström and, E. Niel. 2010. Stable coexistence of two *Caldicellulosiruptor* species in a de novo constructed hydrogenproducing coculture. *Microbial Cell Factories* 9:102
- Zhou, J, W. Fang, X. Yang, S. Zhou, L. Hu, X. Li, X. Qi *et al.* 2012. A Nonluminescent and Highly Virulent *Vibrio harveyi* Strain Is Associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *PLoS ONE* 7(2): e29961.
- Zongli, Y. and Z. Kai. 2011. Bacterial flora composition and its dynamics in shrimp pond during the culture period of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Huazhong Agricultural University*.

9 ANEXOS

Tinción Gram

- Con ayuda de un asa de platino, tomar una alícuota del cultivo bacteriano suspendido en medio líquido, y colocarla sobre una lámina porta objetos.
- Realizar el extendido de la muestra sobre la lámina mediante movimientos giratorios.
- Dejar secar a temperatura ambiente y flamear al mechero (fijación)
- Teñir con cristal violeta, esperar 1 min y enjuagar con agua (no directamente sobre la muestra)
- Agregó lugol y esperar 1 minuto y enjuagar con agua
- Agregar alcohol acetona, esperar 15 minutos y enjuagar con agua. (Las bacterias Gram negativas se decoloran y las positivas no)
- Enjuagar con agua
- Agregar safranina, esperar 30 segundos; enjuagar y dejar secar a temperatura ambiente (tinción de contraste).
- Observar al microscópio óptico con el objetivo de 100X, utilizando aceite de inmersión.

Preparación de soluciones

- **PBS 1X**

- 137mM de Cloruro de Sodio (NaCl_2).
- 2.7mM de Cloruro de Potasio (KCl).
- 10mM de Fosfato de Sodio Di básico (Na_2HPO_4).
- 1.8mM de Fosfato de Potasio Di hidrogenado (KH_2PO_4).

Ajustar a pH 7.4

Esterilizar en autoclave

- **TE 1X**

- 10 mM Tris-HCL (pH 8.0)

- 1mM EDTA (pH 8.0)

Esterilizar en autoclave

- **SET**

- 20% de sucrosa

- 50mM Tris-HCl (pH 8)

- 50 mM EDTA)

Tabla 8. Distribución por phylum de los bacterias presentes en los co-cultivo a partir de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos, utilizando el servidor MG RAST

Phylum	4669176.3		4669180.3		4669187.3(Cs3)	
	(Cs1)	%	(Cs2)	%		%
Actinobacteria	3	0.01	7	0.02	246	1.32
Bacteroidetes	0	0.00	0	0.00	9	0.05
Chloroflexi	0	0.00	10	0.02		0.00
Firmicutes	14097	28.24	2398	5.61	1948	10.44
Fusobacteria	14	0.03	2	0.00	2	0.01
Proteobacteria	35733	71.58	39820	93.22	5168	27.69
unclassified (derived from Bacteria)	71	0.14	481	1.13	11288	60.49
Verrucomicrobia	1	0.00	0	0.00	0	0.00
	49919	100	42718	100	18661	100

Tabla 9. Distribución por género de los bacterias presentes en los co-cultivo a partir de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos, utilizando el servidor MG RAST

Genus	4669176.3		4669180.3		4669187.3(Cs3)	
	(Cs1)	%	(Cs2)	%		%
Vibrio	35530	71.175	39779	93.118	4779	25.610
unclassified (derived from Bacteria)	71	0.142	481	1.126	11288	60.490
Lysinibacillus	11118	22.272	1941	4.544	2	0.011
Bacillus	2653	5.315	358	0.838	412	2.208
Anoxybacillus	237	0.475	3	0.007	947	5.075
Staphylococcus	1	0.002	89	0.208	360	1.929
unclassified (derived from Enterobacteriaceae)	0	0.000	0	0.000	188	1.007
Acinetobacter	0	0.000	0	0.000	111	0.595
Leifsonia	0	0.000	0	0.000	62	0.332
Micrococcus	0	0.000	0	0.000	59	0.316
Lactobacillus	2	0.004	5	0.012	46	0.247
Mycobacterium	0	0.000	7	0.016	42	0.225
Pseudomonas	0	0.000	1	0.002	42	0.225
Proteus	84	0.168	21	0.049	0	0.000

Clostridium	0	0.000	0	0.000	40	0.214
Streptococcus	0	0.000	0	0.000	36	0.193
Corynebacterium	0	0.000	0	0.000	34	0.182
Listonella	86	0.172	3	0.007	0	0.000
Alkalibacterium	0	0.000	0	0.000	30	0.161
Cupriavidus	0	0.000	0	0.000	30	0.161
Aerococcus	0	0.000	0	0.000	22	0.118
Dietzia	0	0.000	0	0.000	21	0.113
Geobacillus	0	0.000	0	0.000	19	0.102
Trichococcus	0	0.000	0	0.000	17	0.091
Enterococcus	37	0.074	0	0.000	0	0.000
unclassified (derived from						
Gammaproteobacteria)	30	0.060	2	0.005	0	0.000
Photobacterium	0	0.000	1	0.002	10	0.054
Sporosarcina	26	0.052	1	0.002	0	0.000
Turicella	0	0.000	0	0.000	9	0.048
Ilyobacter	14	0.028	2	0.005	2	0.011
Rothia	0	0.000	0	0.000	8	0.043
Ureibacillus	1	0.002	0	0.000	7	0.038
Shewanella	1	0.002	0	0.000	5	0.027
Brevibacterium Candidatus	0	0.000	0	0.000	5	0.027
Amoebophilus	0	0.000	0	0.000	5	0.027
Megamonas	0	0.000	0	0.000	5	0.027
Thermomicrobium	0	0.000	10	0.023	0	0.000
Nocardioides	2	0.004	0	0.000	3	0.016
unclassified (derived from						
Alphaproteobacteria)	0	0.000	8	0.019	0	0.000
Actinomadura	0	0.000	0	0.000	3	0.016
Aeribacillus	6	0.012	0	0.000	0	0.000
Paenibacillus	6	0.012	0	0.000	0	0.000
Cytophaga	0	0.000	0	0.000	2	0.011
Klebsiella	0	0.000	0	0.000	2	0.011
Planomicrobium	5	0.010	0	0.000	0	0.000
Virgibacillus	2	0.004	0	0.000	1	0.005
Massilia	0	0.000	3	0.007	0	0.000
Abiotrophia	0	0.000	0	0.000	1	0.005
Arcobacter	0	0.000	0	0.000	1	0.005
Capnocytophaga	0	0.000	0	0.000	1	0.005
Enterococcus	0	0.000	0	0.000	1	0.005
Eubacterium	0	0.000	0	0.000	1	0.005
Hymenobacter	0	0.000	0	0.000	1	0.005

unclassified (derived from Peptostreptococcaceae)	0	0.000	0	0.000	1	0.005
unclassified (derived from Alteromonadaceae)	0	0.000	2	0.005	0	0.000
Leuconostoc	0	0.000	1	0.002	0	0.000
Salinivibrio	0	0.000	1	0.002	0	0.000
Chthoniobacter	1	0.002	0	0.000	0	0.000
Desulfitobacterium	1	0.002	0	0.000	0	0.000
Erwinia	1	0.002	0	0.000	0	0.000
Frankia	1	0.002	0	0.000	0	0.000
Geobacillus	1	0.002	0	0.000	0	0.000
Methylobacterium	1	0.002	0	0.000	0	0.000
Viridibacillus	1	0.002	0	0.000	0	0.000
Total	49919	100	42719	100	18661	100

Tabla 10. Distribución por phylum de los bacterias presentes en los co-cultivo a partir de la hemolinfa de langostinos enfermos, utilizando el servidor MG RAST

Phylum	4669178.3 (Ce1) %		4669184.3 (Ce2) %	
Actinobacteria	0	0.000	4	0.012
Bacteroidetes	3	0.022	0	0.000
Firmicutes	495	3.636	440	1.363
Fusobacteria	1	0.007	0	0.000
Proteobacteria	12700	93.300	31723	98.305
unclassified (derived from Bacteria)	413	3.034	103	0.319
	13612	100	32270	100

Tabla 11. Distribución por género de las bacterias presentes en los co-cultivos a partir de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos, utilizando el servidor MG RAST

genus	4669178.3 (Ce1)	%	4669184.3 (Ce2)	%
Vibrio	12597	92.543	27551	85.377
Listonella	0	0.000	3754	11.633
Lysinibacillus	493	3.622	217	0.672
unclassified (derived from Bacteria)	413	3.034	103	0.319
unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	1	0.007	406	1.258
Staphylococcus	0	0.000	214	0.663
Aliivibrio	49	0.360	0	0.000
Citrobacter	36	0.264	0	0.000
Klebsiella	11	0.081	0	0.000
unclassified (derived from Alteromonadaceae)	4	0.029	5	0.015
Bacillus	2	0.015	4	0.012
Microbacterium	0	0.000	4	0.012
Photobacterium	1	0.007	1	0.003
Veillonella	0	0.000	3	0.009
Cytophaga	1	0.007	0	0.000
Flavobacterium	1	0.007	0	0.000
Gramella	1	0.007	0	0.000
Ilyobacter	1	0.007	0	0.000
Marinobacterium	1	0.007	0	0.000
Acinetobacter	0	0.000	2	0.006
Microbulbifer	0	0.000	2	0.006
Marinobacterium	0	0.000	1	0.003
Salmonella	0	0.000	1	0.003
Vagococcus	0	0.000	1	0.003
Weissella	0	0.000	1	0.003
Total	13612	100	32270	100

Tabla 12. Distribución por phylum de los bacterias presentes en la mezcla a partir de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos, utilizando el servidor MG RAST

Phylum	4680186.3 (De)	%	4680191.3 (Ds)	%
Actinobacteria	226	4.164	6238	36.100
Bacteroidetes	2	0.037	1	0.006
Cyanobacteria	1	0.018	0	0.000
Firmicutes	1921	35.397	7466	43.206
Proteobacteria	1084	19.974	2036	11.782
Synergistetes	0	0.000	95	0.550
unclassified (derived from Bacteria)	2193	40.409	1444	8.356
Total	5427	100	17280	100

Tabla 13. Distribución por género de las bacterias presentes en la mezcla a partir de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos y enfermos, utilizando el servidor MG RAST

Genus	4680191.3 (Ds)	%	4680186.3 (De)	%
unclassified (derived from Bacteria)	1444	8.356	2193	40.409
Staphylococcus	6820	39.468	0	0.000
Corynebacterium	5972	34.560	196	3.612
Atopostipes	1	0.006	1176	21.669
Pseudomonas	347	2.008	478	8.808
Enterococcus	0	0.000	446	8.218
Brachymonas	0	0.000	345	6.357
Acinetobacter	737	4.265	0	0.000
Veillonella	49	0.284	190	3.501
Bradyrhizobium	1	0.006	174	3.206
Halomonas	439	2.541	0	0.000
Bacillus	360	2.083	0	0.000
Thermoanaerobacterium	0	0.000	108	1.990
Mycobacterium	262	1.516	0	0.000
Vibrio	252	1.458	0	0.000
Fingoldia	171	0.990	0	0.000
unclassified (derived from Betaproteobacteria)	2	0.012	32	0.590
unclassified (derived from Synergistetes)	95	0.550	0	0.000

Propionibacterium	1	0.006	26	0.479
Rhodopseudomonas	77	0.446	0	0.000
Aeribacillus	64	0.370	0	0.000
Sphaerotilus	59	0.341	0	0.000
Pantoea	0	0.000	18	0.332
unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	42	0.243	1	0.018
Proteus	43	0.249	0	0.000
Acidovorax	0	0.000	11	0.203
Providencia	34	0.197	0	0.000
Salmonella	0	0.000	10	0.184
Comamonas	0	0.000	4	0.074
unclassified (derived from Enterobacteriaceae)	0	0.000	4	0.074
Rhodococcus	0	0.000	3	0.055
Escherichia	0	0.000	2	0.037
Cytophaga	1	0.006	1	0.018
Alicyclophilus	0	0.000	1	0.018
Anoxybacillus	0	0.000	1	0.018
Flavobacterium	0	0.000	1	0.018
Gordonia	0	0.000	1	0.018
Nitrospira	0	0.000	1	0.018
Nodularia	0	0.000	1	0.018
Pseudoalteromonas	0	0.000	1	0.018
Thiomonas	0	0.000	1	0.018
Variovorax	0	0.000	1	0.018
Arthrobacter	1	0.006	0	0.000
Bifidobacterium	1	0.006	0	0.000
Burkholderia	1	0.006	0	0.000
Dietzia	1	0.006	0	0.000
Exiguobacterium	1	0.006	0	0.000
Methylophilus	1	0.006	0	0.000
Tolomonas	1	0.006	0	0.000
	17280	100	5427	100

Tabla 14. Distribución por especie de las bacterias presentes en la mezcla a partir de la hemolinfa de langostinos aparentemente sanos y enfermos, utilizando el servidor MG RAST

metagenome	source	domain	phylum	Genus	species	abundance	avg eValue	avg % ident	avg align len	# hits
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Acinetobacter	Acinetobacter baumannii	1	-25	100	58	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Acinetobacter	Acinetobacter johnsonii	719	-145	98.92	277	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Acinetobacter	Acinetobacter junii	13	-122	100	222	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Acinetobacter	Acinetobacter radioresistens	1	-31	100	67	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Acinetobacter	Acinetobacter sp.	3	-120	100	218	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Aeribacillus	Aeribacillus pallidus	64	-30	100	65	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Arthrobacter	Arthrobacter oxydans	1	-120	100	218	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Atopostipes	Atopostipes suicloacalis	1	-62	100	121	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Bacillus	Bacillus clausii	128	-30	100	66	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Bacillus	Bacillus horikoshii	1	-110	99.52	207	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Bacillus	Bacillus megaterium	1	-78	100	147	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Bacillus	Bacillus psychrosaccharolyticus	1	-43	100	89	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Bacillus	Bacillus smithii	229	-29	100	64	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Bifidobacterium	Bifidobacterium catenulatum	1	-154	100	274	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Burkholderia	Burkholderia andropogonis	1	-27	100	61	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium amycolatum	8	-62.5	99.73	121.25	3
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium cystitidis	2	-21.5	100	51.5	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium freneyi	4	-118	99.53	215	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium massiliense	1	-24	100	55	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium propinquum	54	-37.26	100	78.06	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium pseudogenitalium	228	-51.83	99.08	107.67	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium sp.	5432	-96.13	99.97	178.84	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium sundsvallense	195	-21	100	50	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium tuberculostearicum	48	-64.48	99.88	124.28	1

4680191.3	RDP	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophaga	Cytophaga sp.	1	-21	100	51	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Dietzia	Dietzia maris	1	-50	100	99	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Exiguobacterium	Exiguobacterium sibiricum	1	-77	100	145	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Finegoldia	Finegoldia magna	171	-91.26	98.92	177.49	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Halomonas	Halomonas aquamarina	292	-106	100	194	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Halomonas	Halomonas cupida	147	-43	100	88	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Methylophilus	Methylophilus sp. Ship	1	-138	100	249	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Mycobacterium	Mycobacterium angelicum	1	-158	99.65	283	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Mycobacterium	Mycobacterium intracellulare	259	-25	100	57	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Mycobacterium	Mycobacterium leprae	1	-66	100	127	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Mycobacterium	Mycobacterium					
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Mycobacterium	madagascariense	1	-27	100	60	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Propionibacterium	Propionibacterium acnes	1	-117	100	212	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Proteus	Proteus vulgaris	43	-148.7	97.96	282.72	2
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Providencia	Providencia rettgeri	34	-158	100	283	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas fluorescens	109	-120.22	100	218.01	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas putida	28	-52	100	104	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas sp. LBUM636	207	-155	99.3	285	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas thivervalensis	3	-36	100	77	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Rhodopseudomonas	Rhodopseudomonas palustris	77	-103.55	100	191.21	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Sphaerotilus	Sphaerotilus natans	59	-111	98.64	220	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus aureus	10	-66.81	98.76	135.19	8
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus caprae	2	-109	100	200	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus cohnii	4174	-32.06	100	70.1	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus epidermidis	1976	-87.68	99.25	167.32	11
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus haemolyticus	4	-48	99.22	97.25	3
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus hominis	80	-115.16	99.06	213.16	2
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus microti	2	-83	99.71	158.5	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus nepalensis	1	-34	98.63	73	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus pasteurii	568	-70.41	99.96	135.58	5
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus	Staphylococcus warneri	1	-124	98.33	239	1

4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Staphylococcus unclassified (derived from Synergistetes)	Staphylococcus xylosus	2	-59	99	121.5	2
4680191.3	RDP	Bacteria	Synergistetes	from Synergistetes)	Synergistetes bacterium SGP1	95	-24	100	56	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria unclassified (derived from Bacteria)	Tolomonas unclassified (derived from Bacteria)	Tolomonas auensis	1	-78	99.33	149	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria unclassified (derived from Betaproteobacteria)	uncultured bacterium	uncultured beta proteobacterium	1444	-116.79	98.81	222	30
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Bradyrhizobium unclassified (derived from Gammaproteobacteria)	uncultured Bradyrhizobium sp.	2	-35.5	100	75.5	2
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	uncultured gamma proteobacterium	uncultured gamma proteobacterium	1	-29	100	64	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Veillonella	Veillonella dispar	42	-104.31	98.43	205.5	2
4680191.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Vibrio	Vibrio alginolyticus	49	-35	100	74	2
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Vibrio	Vibrio alginolyticus	2	-99	99.78	183.5	1
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Vibrio	Vibrio harveyi	249	-121.81	97.92	239.66	2
4680191.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Vibrio	Vibrio parahaemolyticus	1	-51	100	101	1

Tabla 15. Distribución por especie de las bacterias presentes en la mezcla a partir de la hemolinfa de langostinos enfermos, utilizando el servidor MG RAST

Metagenome	source	domain	phylum	Genus	species	abundance	avg eValue	avg % ident	avg align len	# hits
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Acidovorax	Acidovorax sp. 2FB7	11	-31	100	67	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Alicyclophilus	Alicyclophilus sp. R-24604	1	-127	98.02	252	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Anoxybacillus	Anoxybacillus sp. HT8	1	-148	99.27	275	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes unclassified (derived from Bacteria)	Atopostipes unclassified (derived from Bacteria)	Atopostipes suicloacalis bacterium rM11	1176 2	-29.7 -82	100 99.7	65.48 154	1 1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Brachymonas	Brachymonas denitrificans	345	-68	100	130	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium elkanii	79	-57	100	111	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium liaoningense	95	-160	100	285	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Comamonas	Comamonas aquatica	4	-53.75	99.85	107.5	2
4680186.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium cystitidis	179	-40	100	83	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium macginleyi	14	-122	99.56	226	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	Corynebacterium sp. Corynebacterium Corynebacterium	2	-54	100	107	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacterium	tuberculostearicum	1	-21	100	50	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophaga	Cytophaga sp.	1	-135	99.2	250	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Enterococcus	Enterococcus cecorum	438	-36.46	100	76.43	2
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Enterococcus	Enterococcus columbae	1	-23	100	54	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Enterococcus	Enterococcus faecalis	6	-23.5	100	54.83	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Enterococcus	Enterococcus faecium	1	-21	100	50	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Escherichia	Escherichia coli Flavobacterium	2	-70	99.26	135	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacterium	branchiophilum	1	-20	100	50	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Gordonia	Gordonia sputi	1	-38	100	79	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Nitrosospira	Nitrosospira sp. Nsp57	1	-80	99.34	152	1

4680186.3	RDP	Bacteria	Cyanobacteria	Nodularia	Nodularia sphaerocarpa	1	-21	98.04	51	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pantoea	Pantoea agglomerans	1	-98	100	181	1
							-			
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pantoea	Pantoea ananatis	14	125.07	99.1	234.43	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pantoea	Pantoea deleyi	1	-112	97.71	218	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pantoea	Pantoea stewartii	2	-69	98.89	134.5	2
4680186.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Propionibacterium	Propionibacterium acnes	26	-128	99.17	242	1
					Pseudoalteromonas sp. 'A4 isolate-1'					
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudoalteromonas	Pseudoalteromonas sp. 'A4 isolate-1'	1	-91	100	169	1
					Pseudomonas					
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas extremaustralis	464	-55	100	108	1
							-			
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas fluorescens	11	103.18	99.95	190.55	2
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas sp. 7323	2	-71	100	135	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas	Pseudomonas thivervalensis	1	-61	100	118	1
					Rhodococcus					
4680186.3	RDP	Bacteria	Actinobacteria	Rhodococcus	Rhodococcus corynebacterioides	3	-56	99.22	115	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Salmonella	Salmonella bongori	10	-46.4	100	93	1
					Thermoanaerobacterium					
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Thermoanaerobacterium	Thermoanaerobacterium saccharolyticum	108	-104	97.58	207	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria unclassified (derived from Bacteria)	Thiomonas	Thiomonas sp. WJ68	1	-68	98.48	132	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	2191	-101	97.88	208.05	61
					unclassified (derived from Betaproteobacteria)					
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	uncultured beta proteobacterium	32	-48.97	97.94	111.72	3
					unclassified (derived from Enterobacteriaceae)					
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	uncultured Enterobacteriaceae bacterium	4	-153	99.64	275	1
					unclassified (derived from Gammaproteobacteria)					
4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	uncultured gamma proteobacterium	1	-76	99.31	144	1

4680186.3	RDP	Bacteria	Proteobacteria	Variovorax	Variovorax paradoxus	1	-66	100	127	1
4680186.3	RDP	Bacteria	Firmicutes	Veillonella	Veillonella dispar	190	109.34	99.22	203.71	2

Secuencias de las bacterias cultivables, alineadas en el software MEGA 6.

Cepa 2BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGG
 GAGCTTGCTCCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTG
 CCTGTAAGATCGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTCCTTC
 CTCCGCATGGAGGAAGGCGGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCC
 CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCAACGATGCGTA
 GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
 CGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTCGTAAAGCTCTGTTGTAAGGGAAGAA
 CAAGCGCCGGTTAACTGCCGGTGCCCTGACGGTACCTTACCAGAAAGCCACGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATCA
 TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC
 TCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCG
 GAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
 AGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG
 GGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
 ACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTC
 TGACCACCCTGGAGACAGGGCCTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTG
 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
 GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
 GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGGG
 AGCCAATCCCACAAAACCGTTCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA
 TGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCANCATG

Cepa 3BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTNGTAGTGGGGGA
 CAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGNNGGGG
 ATNTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC
 ACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTG
 GACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGG
 ATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTT
 GACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTT
 CGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTG
 GCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCG

TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTAATACTGACA
 CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
 CGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAA
 CGCATTAAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
 TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGA
 AGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTT
 CGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
 TGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAAGG
 TGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
 CAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTAC
 AAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCG
 GATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATC
 AGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
 GGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGGGGACGG

Cepa 5BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTT
 ATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
 CCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
 CATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATG
 CCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
 AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC
 ATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGAGGA
 AGGCGGNGTNGTTAATAGCGNNNTCGTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCCGG
 CTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAAT
 TACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGG
 GCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGG
 TAGAATTTAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGC
 GAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTG
 TGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGT
 ACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCTCA
 GAAGCTTGTAGAGATACGAGTGTGCCTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCTGCATG
 GCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
 CTTATCCTTGTTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGA
 TAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG
 GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCNGNCAACTTGCGAGAGTGAG
 CGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
 AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAGAAGTGGGTA
 GTTAAACCTTCGGGGGGACGCTCACCCTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAA

Cepa 9BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

ATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACT
 GATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
 ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATT
 CTTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGG
 GCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGC
 GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
 CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAA
 GAACAAGTACCGGAGTAAGTCCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
 CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGA
 AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG
 TGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
 GTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
 GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
 CATCTCCTGACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGGATGACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCNNTTAT
 GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGNACAAAGGGCTGCGAGACCGCN
 AGGTTAAGCGAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCANGCTGCAACTCGC
 CTGCATGAAGCCNGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG

Cepa 14BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
 CACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
 GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTGTA
 AAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAAGTCCCGGTACCTTGACGG
 TACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
 GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTA
 AGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGA
 CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
 ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
 GCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGC
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA

CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGCCACTCCTGGAGACAGGACGTTCCCCTTCG
 GGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTG
 GGC ACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGAACAAA
 GGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCCAATCCCATAAATCTATTCTCAGTTCCGGAT
 TGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
 ATG

Cepa 59BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAA
 GAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
 CCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTG
 AACCGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCC
 GCGTTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC
 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
 CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
 GCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
 AAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATT
 ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG
 CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCANAANAGGAAAGT
 GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGA
 GGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
 ACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTC
 TGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCAT
 GGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
 CCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
 TACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCT
 AATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAG
 CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC

Cepa 1BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGA
 GTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTA
 ATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATA
 CCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGAT
 ATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATC
 CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
 GCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGA
 GGAAGGCGGGGTTCGTTAATAGCGNNNTCGTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCAC
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCG
 GAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCC
 CGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGG
 GGGGTAGAATTTACAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGG
 TGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAG
 GTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGCTTAAGTAGACCGCCTGGG
 GAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
 TGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATC
 CTCAGAAGCTTGTAGAGATACGAGTGTGCCTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCTG
 CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCG
 GTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT
 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCNNNCACTTGCGAGAGT
 GAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCC
 ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGG
 GTAGTTTAACTTCGGGGGGACGCTCACCACTTTGNGGNTCANGACTGGGGTGAA
 GTCGTACAGGGGTAACC

Cepa 7BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGA
 GGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATC
 TACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTA
 CGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC GCGATTGAATGAGCCGATGTCGG
 ATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTG
 AGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTG
 GGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCATCTG
 GTTAATACCCGGGTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGT

AAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTG
 GGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCT
 GGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCT
 ACCTGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTG
 GCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCA
 AACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGT
 TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACTTTCC
 AGAGATGGATCGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
 AGCTCGTGTGCGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCT
 TAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACAC
 GACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTGAGCCAATCCC
 AGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
 TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACC
 TTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGNCNATGACTGGGGTGAAT

Cepa 8BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATG
 AAGTGCTTGCACTTCTGACGTTAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAAGGAATC
 TACCTATAAGCGGGGGATAACATTCGGAAACGGGTGCTAATACCGCATAATATCTT
 CTTCCGCATGGAAGAAGATTGAAAGACGGCTCTGCTGTCACTTATAGATGACCTTG
 CGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGCATAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATG
 CCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTATAAGAGAAGAACA
 AATTGTAGAGTAACTGCTACAGTCTTGACGGTATCTTATCAGAAAGCCACGGCTAA
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT
 GGGCGTAAAGGGAGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTT
 AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAATGTGGA
 ACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAG
 GCGACATTCTGGTCTGTTACTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGG
 TTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGC
 ATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCTTTGA
 CCACNCTAGAGATAGNGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGT
 TGTCGTCAGCTCGTGTGCGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 CTATTATTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAA
 CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCATGCCCTTATGACTTGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCAAACCCGCGAGGGCAAGCAAAT
 CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCG
 GAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG

TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAA
CCTTTATGGAGCCAGCCGCC

Cepa 10BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTT
ATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
CCTAGGAAATTGCCCTGNTGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
CATAATACCTNCGGGTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATG
CCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTGAGGA
AGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGG
CTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGT
AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGT
GGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTA
CGGTGCGAAGATTAATACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAG
AACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTATCCTTGTTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGAT
AAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGG
CTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAACTTGCAGAGGTGAGC
GAATCCCAAAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGA
AGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGTAGGTAG
TTTAACTTCGGGAGGACGCTTACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAT

Cepa 11BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAC
GAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAAC
CTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATAT
TGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCATTATAGATGGATCC
GCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAA
ATGTGTAAGTAAGTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTA

AGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAA
 CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCANAG
 ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAT
 GTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
 ACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCA
 TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC
 GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGG
 GGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG
 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGG
 CACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGG
 NAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTA
 GTCTGCAACTCGACTATATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCT
 ACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT
 GTAACACCCGAAGCCGGNGGAGTAACCATTTGGAGCTAGCCGTCGA

Cepa 12BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTT
 AACTGACCCTTCGGGNGACGTTAACGGCGTTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
 CCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
 CATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATG
 CCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAACGATCCCT
 AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC
 ATGCCGCGTGTNTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCAGTGAGGA
 AAGTGGTGTAGTTAATATNNGCATCATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGC
 TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATT
 ACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGG
 CTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAA ACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGT
 AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGCCG
 AAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGT
 GGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTA
 CGGTGCGAAGATTA AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCTACAG
 AAGCTTGCGGAGACGCGAGTGTGCCTTCGGGAACTGTAAGACAGGTGCTGCATG
 GCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
 CTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTCATGTCCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTG
 ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGG
 GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGNNGCCAACTTGCGAAAGTGAG
 CGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
 AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAGAAGCAGGTA

GTTAACCTTCGGGAGGACGCTTGNCACCTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTC
GTA

Cepa 15BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GCTCAGGATGAACGCTAGCGGGAGGCCTAACACATGCAAGCCGAGCGGTAGAGA
TTCTTCGGAATCTTGAGAGCGGCACGGGTGCGGAACACGTGTGCAACCTGCCT
TTATCTGGGGGATAGCCTTTCGAAAGGGAGATTAATACCCCATATAATGAGTG
GCATCACTTGTTATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGA
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGTCAATGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGG
TGATCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GAGGAATATTGGACAATGGGTGAGAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACG
ACGGCCCTATGGGTTGTAACTTCTTTTGTACAGGGATAAACCTTTCCACGTGTGG
AAAGCTGAAGGTACTGTACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAG
GCGGATCTGTAAGTCAGTGGTGAATCTCATAGCTTAACTATGAACTGCCATTGA
TACTGCAGGTCTTGAGTAAGGTAGAAGTAGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAA
TGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTATGTCTTAACTGA
CGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGATGCTAACTCGTTTTTGGTTTTTCCGATTCAGAGACTAAGCGAAAG
TGATAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGAACGCAAGTTTGAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGATTATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAA
CCTTACCAAGACTTAAATGGGAATTGACAGATTTAGAAATAGATCCTCCTTCGGGC
AATTTTCAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTAGGTTAA
GTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTCAGTGTCCATCATTGAGTTGGGGACTC
TAGTGAGACTGCCTACGCAAGTAGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA
CGGCCCTTACGTCTTGGGCCACACACGTAATACAATGGCCGGTACAGAGGGCAGC
TACACAGCGATGTGATGCAAATCTCGAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCT
GCAACTCGACTCTATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGTCTGG
GGTACCTGAAGTCGGTGACCGTAACAGGAGCTGCCTAGGGTAAAACAGGTAACTA
GGGCTAAGTCGTA

Cepa 17BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGA
GTTGTCTGACCCTTCGGGGAACGACAACGGCGTCGAGCGGCAGGGTGAGTA
ATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATA
CCGCATAACAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGAT
ATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGTGAGACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA

GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGTGA
 GGAAGGGTGTGTATTTAATAGATGCACATTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACC
 GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGG
 AATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCC
 GGGGCTCAACCTCGGAACAGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGAGGG
 GGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGT
 GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGA
 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAG
 GTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGG
 GAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGG
 TGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATC
 CTCAGAAGAGACTGGAGACAGTCTTGTGCCTTCGGGAACTGAGAGACAGGTGCTG
 CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTATCCTTGTGGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCG
 GTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT
 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAACTTGCAGAG
 TGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC
 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGCA
 GGTAGTTTAACCTTCGGGAGGACGCTTGCCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGA
 AGTC

Cepa 18BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGAGAG
 GTAGCTTGCTACTGATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCC
 TATTAGTGGGGGACAACATTTGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGG
 AGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAG
 CTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAG
 GATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG
 AAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAA
 TACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAG
 CGCGCGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAAT
 TGCATTGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTG
 GCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
 CTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTA
 GTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTA
 AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATAGTAAGA ACTTTCCAGAGAT
 GGATTGGTGCCTTCGGGAACTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
 TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCTTATTTGC
 CAGCGAGTAATGTCCGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGG
 CGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTAC

AATGGTCCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCG
 ATCGTAGTCCGGATTGNAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTA
 ATCGCGGATCAGAATGNCGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGTAGCTAGCCTAACTGCAAAGAGG
 GCGGTTACCANGNTGTGGNCNATGACTGGGGTGA

Cepa 19BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCTG
 AAGCCCCTAGCTTGCTAGGGGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGA
 GTGACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATA
 CGACAGTACATCGCATGGTGTGTTGTGGAAAGGGTTTGTACTGGTTTTGGATGGG
 CTCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGT
 AGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
 GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAA
 GAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
 GCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC
 TCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGCTGTGAAAGCCTGGGGCTTAACCCCGGGTCTG
 CAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGT
 GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTG
 GGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACC
 CTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTT
 TCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
 CTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATT
 AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACCAGACCGTCCC
 AGAGATGGGATTTCCACTTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGA
 GCTCGTGTGTCGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCA
 TGTTGCCAGCACGCTCCTTCGGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGG
 TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGG
 GCTTCAC

Cepa 20BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

TCAGGATGAACGCTGGCGGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGACGAG
 GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTA
 CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTGA
 ACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCGCG
 CCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA
 CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCC
 GCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAT
 GTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
 CGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC
 CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT
 CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCANAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC

GACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTT
 CCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACC
 GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCC
 TCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
 TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTT
 AAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACAC
 ACGTGCTACAATGGACAATAAAAGGGTAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCC
 CATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTATATGAAGCTGGA
 ATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGATC
 ACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAG

Cepa 21BC: 16SrRNAF518/2BC/16SrRNAR800

GGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGAT
 TAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
 CTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATT
 TTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGA
 CCCGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGT
 AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
 AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAG
 AACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
 ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
 CGGCTCAACCGTGAGGGTTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGA
 AAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGT
 GGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTG
 TTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
 GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
 CCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
 GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
 TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTG
 GAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
 TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
 GGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGG
 TGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGA

DEDICATORIA

A mi pequeña Lianarine Maricris, por ser mi fuente de inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Msc. Luis Cruz, jefe de producción de la empresa “LA FRAGATA” por facilitarnos las muestras de langostino, así mismo se agradece al equipo científico y técnico de la empresa INCA´BIOTEC S.A.C. dirigida por el Dr. Eric Mialhe, Dr. Virna Cedeño, Dr. Emmerick Mote, M.Sc. Juan Quimi, Tec. Jordana López, Tec. Rodrigo Chota, Tec. Cesar Chanta, Tec. Petter Baca, y Tec. Pedro Masías que colaboraron con el desarrollo de la presente investigación.

A las personas que apoyaron en los muestreos M.Sc. (c) Erick Suarez, M. Sc. (c) Luis Acedo, y Br. José Camisán.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes: Dra. Enedia Vieyra, Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Mg. Tessy Peralta Ortiz, Mg. Alberto Ordinola Zapata; por la formación profesional impartida hacia mi persona.

A mi familia, por el apoyo y comprensión durante el desarrollo de la maestría.

Al M.Sc. Ricardo Avellán Llaguno e Ing. Jhon Ortiz Sandoya, por los aportes desinteresados brindados en el presente trabajo de investigación

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de la Producción, Perú; bajo el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y productividad- INNOVATE PERÚ.