

Tecnologías moleculares para la revelación de las comunidades bacterianas y el análisis por tecnologías moleculares potentes de las interacciones entre bacterias probióticas y patogénicas de la hemolinfa del langostino blanco *Litopenaeus vannamei*

Steve V. ACEDO L. ^{(1-5)*}, Juan G. QUIMI M. ^{(1-2-3-5)**}, Jodana LOPEZ ⁽³⁻⁴⁾, Peter BACA B. ⁽³⁾, Pedro MASÍAS R. ⁽³⁾, Luis CRUZ ⁽⁴⁻⁵⁾, Emmerik MOTTE D. ⁽¹⁻²⁻³⁻⁵⁾, Virna A. CEDEÑO E. ⁽¹⁻²⁻³⁻⁵⁾, Eric L. MIALHE M. ^{(1-2-3-5)***}

(1) Programa de Maestría en biotecnología molecular-Universidad Nacional de Tumbes INCA' Biotec SAC-Cienciaactiva-CONCYTEC, Perú; (2) CONCEPTO AZUL, Guayaquil, Ecuador; (3) INCA' BIOTEC SAC, Tumbes, Perú; (4) la FRAGATA S.A., Tumbes, Perú; (5) Innóvate-Perú PITEI-2-P-208-074-14 / C284-PNICP-PITEI-2015

Contacto: Skype: bios-031(S. Acedo) *, juange4 (J. Quimi) **, ericmialhe (E. Mialhe) ***

Dirección de E-mail: stevlad.aclaz@gmail.com (S. Acedo)*, juange8406@hotmail.com (J. Quimi)**, ericmialhe@yahoo.fr (E. Mialhe)***

Resumen

Tabla 1. Abundancias relativas de géneros representativos de la diversidad bacteriana en la hemolinfa de langostinos *L. vannamei*

Microbiota nativa HS	Microbiota cultivada HS	Géneros	Microbiota nativa	Microbiota cultivada
			HE	HE
0,652	13,930	<i>Vibrio</i>	4,144	99,189
10,686		<i>Staphylococcus</i>		0,245
0,307	0,204	<i>Sphingomonas</i>	45,051	0,220
5,081	2,734	<i>Acinetobacter</i>	1,204	0,010
		<i>Halospirulina</i>	2,490	0,010
17,831	13,967	<i>Pseudomonas</i>	2,473	0,006
1,206	0,363	<i>Caulobacter</i>	0,883	0,004
0,175	0,069	<i>Pantoea</i>	9,552	0,004
	22,555	<i>Propionigenium</i>		0,002
6,711	3,865	<i>Enterobacter</i>	0,103	0,002
3,723	3,787	<i>Klebsiella</i>	0,017	0,002
18,919	13,832	<i>Stenotrophomonas</i>	0,279	
11,515	9,488	<i>Achromobacter</i>		
	5,445	<i>Phyllobacterium</i>		
1,914	1,723	<i>Aerococcus</i>		
1,462	1,491	<i>Novosphingobium</i>	1,418	
1,415	0,922	<i>Brachybacterium</i>	0,381	
	0,012	<i>Hylemonella</i>	10,036	
8,615	0,001	<i>Corynebacterium</i>	1,247	
0,002		<i>Atopostipes</i>	3,064	
		<i>Hydrogenophaga</i>	2,417	
		<i>Cloacibacterium</i>	1,928	
		<i>Rhodococcus</i>	1,718	
9,787	5,612	Otros Géneros(<1%)	11,596	0,307
119	95	Total de Géneros	109	54

El langostino *Litopenaeus vannamei* está asociado con numerosos tipos de microorganismos presentes en el sedimento, perifiton, biofloc y agua, así como en la cutícula, tracto digestivo y en la hemolinfa. Estos microorganismos pueden ser, por una parte, probióticos, oportunistas, neutros y/o patógenos; por otra, cultivables o no cultivables. En la actualidad, los análisis microbiológicos realizados en el sector langostinero están clásicamente basados en cultivos microbianos sobre medios TSA o TCBS en donde se desarrollan unos pocos tipos de bacterias que en general corresponden al 1% de la diversidad microbiana total. Tal es así que los estudios relacionados a la microbiota de la hemolinfa de crustáceos han sido generalmente basados en el aislamiento e identificación de bacterias cultivables *in vitro*, ya sea bacterias gram negativas como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y de bacterias gram positivas tipo *Bacillus*. En este estudio, tecnologías moleculares, como la metagenómica dirigida al ADN ribosómico bacteriano han permitido superar dicha limitación conduciendo a la detección e identificación de todas las bacterias presente de la microbiota nativa y cultivada de la hemolinfa del langostino *L. vannamei* sanos y enfermos. El estudio reveló en total 385 géneros de bacterias diferentes pertenecientes a 17 filos. Mostrando el cambio de la composición bacteriana de la microbiota en situación de cultivo de las bacterias nativa de la hemolinfa sanas (HS) y enfermas (HE). Mientras que el género *Sphingomonas* representó 0,3%(HS) y 45,1%(HE) de la microbiota nativa, a comparación solamente del 0,2% en HS y HE de la misma microbiota luego de 24 horas de cultivo en medio líquido LB. Al contrario, el género *Vibrio* representó solamente 0,6% (HS) y 4,1% (HE) dentro de la microbiota

El langostino *Litopenaeus vannamei* está asociado con numerosos tipos de microorganismos presentes en el sedimento, perifiton, biofloc y agua, así como en la cutícula, tracto digestivo y en la hemolinfa. Estos microorganismos pueden ser, por una parte, probióticos, oportunistas, neutros y/o patógenos; por otra, cultivables o no cultivables. En la actualidad, los análisis microbiológicos realizados en el sector langostinero están clásicamente basados en cultivos microbianos sobre medios TSA o TCBS en donde se desarrollan unos pocos tipos de bacterias que en general corresponden al 1% de la diversidad microbiana total. Tal es así que los estudios relacionados a la microbiota de la hemolinfa de crustáceos han

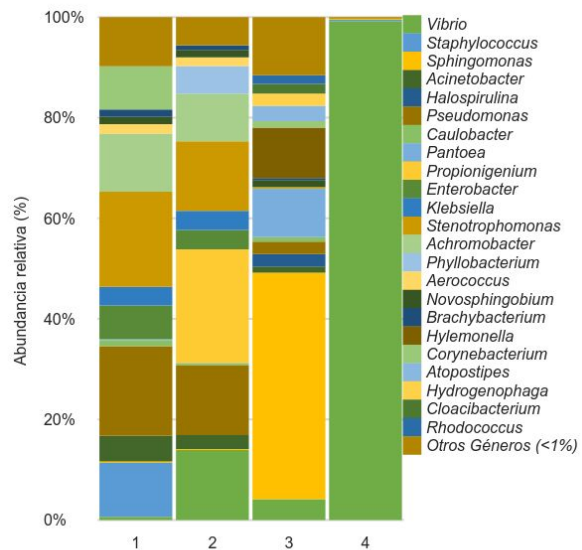


Figura 1. Diversidad bacteriana de la microbiota de la hemolinfa de langostinos sanos y enfermos caracterizadas por metagenómica dirigida al ADN ribosómico bacteriano. Análisis de la microbiota nativa (sin cultivar en medio líquido LB) y cultivada (cultivada en medio LB por 24 horas). HS (hemolinfa sana) y HE (hemolinfa enferma).

nativa, éste género representó el 13,9%(HS) y 99,2%(HE) de la misma microbiota luego de 24 horas de cultivo en medio líquido LB. Estos resultados indican que el uso de un medio de cultivo altere profundamente la composición nativa de la microbiota y conlleva a un falso diagnóstico con una sobre evaluación del género *Vibrio*.

Por otra parte, el análisis mediante tecnologías ómicas ha permitido a nivel genómico aislar y caracterizar molecularmente por su gen 16S ARNr a bacterias de animales sano y enfermos para sus posteriores estudios proteómicos mediante la técnica de espectrometría simple y doble masa MALDI TOF/TOF-TOF. La caracterización del exoproteoma por espectrometría de simple y doble masa (MALDI-TOF/TOF-TOF) de las interacciones bacterianas *in vitro*, ha conducido a identificar metabolitos antimicrobianos como Surfactin (m/z 1036.6898), Polimyxin (m/z 1203.7562), entre otras e identificar enzimas de la biosíntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos del tipo sintetasas de péptido no ribosomales (SPNR). Así también, a niveles metabolómicos a través de espectrometría de masas de imágenes MALDI-IMS se visualizó de manera *in situ* la presencia masa de moléculas biológicamente activas tales como Isoformas de surfactin (m/z 994.65, 1036.47), fengycin (m/z 1463,59), entre otras.

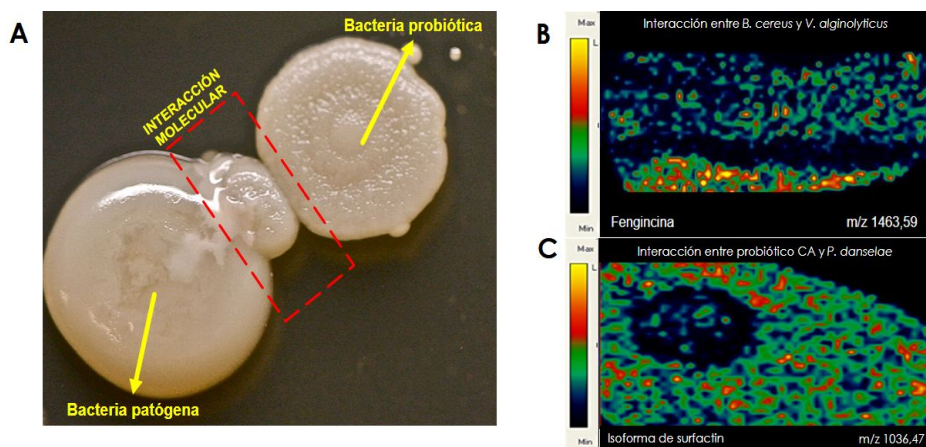


Figura 3. Visualización *In situ* de espectros de masa de metabolitos antimicrobianos de interacciones en medio gelosado a través de MALDI-IMS. Los puntos de color naranja muestran la distribución de los metabolitos identificados. En A) interacción en placa con Agar TSA entre bacteria probiótica y patógena. B) Visualización de la masa m/z 1463.59 en la interacción entre *B. cereus* y *V. alginolyticus* correspondiente a fengycin. C) visualización de la masa m/z 1036.47 y 994.65 de la interacción entre Probiótico CA y *P. danselae* correspondiente a Isoformas de lipopeptido antimicrobiano surfactin.

Conclusiones

- 1) La microbiología tradicional actualmente utilizadas en el sector camaronero son esencialmente dependientes de cultivo, aislamiento de cepas bacterianas, caracterización molecular y detección de genes de toxinas.
- 2) La tecnología metagenómica nos conduce a revelar las comunidades microbianas en un 99 % a comparación de la microbiología clásica.
- 3) Los medios de cultivo cambian la diversidad bacteriana de las muestras de hemolinfa, favoreciendo al crecimiento de ciertos taxones como los *Vibrios* e inhibiendo la abundancia de otros.
- 4) La hemolinfa del langostino *L. vannamei* representa una fuente novedosa y prometedora de probióticos y de moléculas antimicrobianas que podrían utilizarse contra los patógenos bacterianos que afectan su acuicultura.
- 5) La aplicación conjunta de estas tecnologías ómicas: metagenómica, genómica, proteómica y metabolómica, han conducido a un verdadero cambio en el diagnóstico microbiano y, subsecuentemente en entender la dinámica de las interacciones interespecificas bacterianas dentro del microbioma del langostino, en particular de la hemolinfa.

Referencias bibliográficas

- Aguiar-Pulido V, Huang W, Suarez-Ulloa V, Cickovski T, Mathee K, Narasimhan G. 2016 Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome Analysis. *Evol Bioinform Online*. 12:5-16.
- Albuquerque-Costa, R., Lima-Araújo, R., & dos Fernandes-Vieira, R. H. S. 2013. Phenotyping of vibrios isolated from marine shrimp hemolymph. *Ciencias Marinas*, 39(3).
- Bhattacharyya M et al., 2017 The conserved phylogeny of blood microbiome. *Mol Phylogenet Evol*. 12:109:404-408).
- Cardona E, Gueguen Y, Magré K, Lorgeoux B, Piquemal D, Pierrat F, Noguier F, Saulnier D. 2016 Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiol*. 16:157
- Desriac F, Le Chevalier P, Brillet B, Leguerinel I, Thuillier B, Paillard C, Fleury Y. 2014 Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol Lett*. 350:107-16.
- Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G. y Galdiero, S. (2016). Marine antimicrobial peptides: nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 785.
- Rather, I. A., Galope, R., Bajpai, V. K., Lim, J., Paek, W. K., & Park, Y. H. (2017). Diversity of Marine Bacteria and Their Bacteriocins: Applications in Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-13.
- Sha Y, Liu M², Wang B, Jiang K, Qi C, Wang L. 2016 Bacterial population in intestines of *Litopenaeus vannamei* fed different probiotics or probiotic supernatant. *J Microbiol Biotechnol*. 26:1736-1745.
- Salazar, N., & Clara, G. (2016). Insights into Microbe–Microbe Interactions in Human Microbial Ecosystems: Strategies to Be Competitive. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Wang XW, Wang JX. 2015 Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. *Mol Immunol*. 68(2 Pt B):404-11
- Xiong J¹, Wang K, Wu J, Qiuqian L, Yang K, Qian Y, Zhang D, 2015 Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99:6911-9.

