



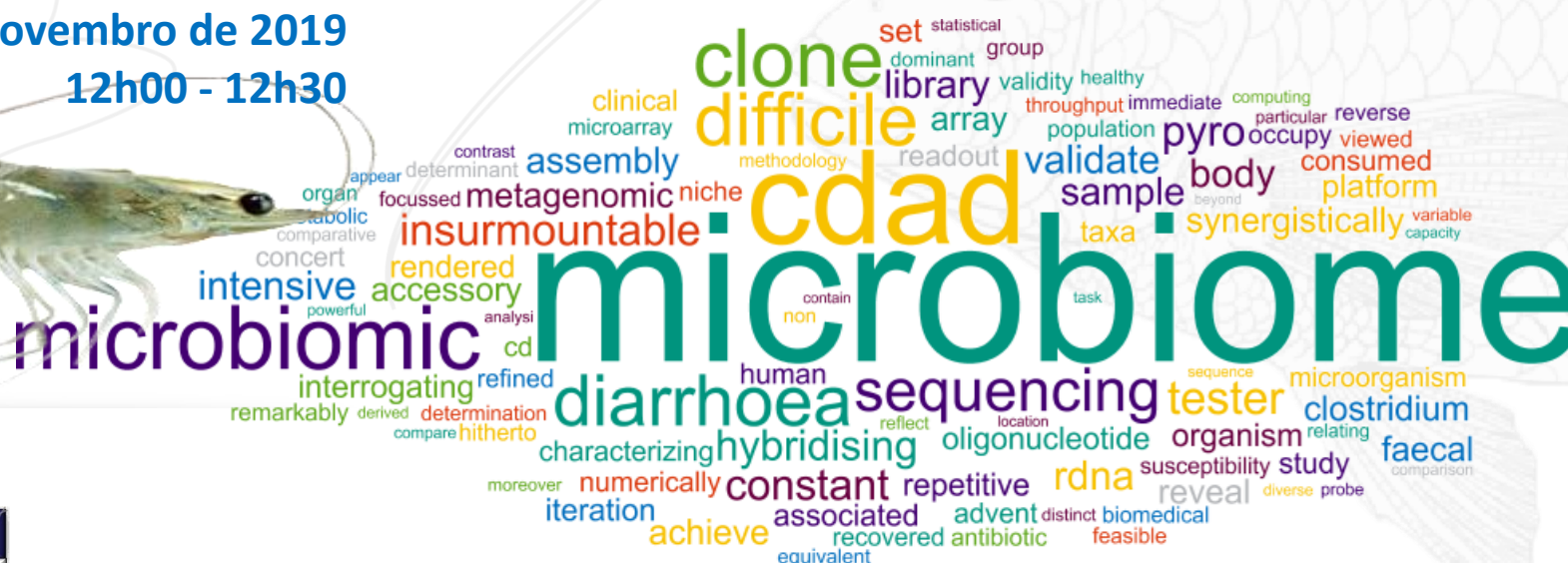
Microbiómicas como herramientas para una mejor comprensión del balance microbiano y el desarrollo de protocolos bio-seguros de cultivo del camarón.



“Microbiómicas” como ferramentas para uma melhor compreensão do equilíbrio microbiano e o desenvolvimento de protocolos de cultura de camarões bio-seguros.

Motte Emmerik, Quimi J., Lopez J., Intriago J., Macias P., Bermudez ME, Jerusik R, Benzoni G, Weissman D, Jegou F, Cedeño V, Mialhe E.

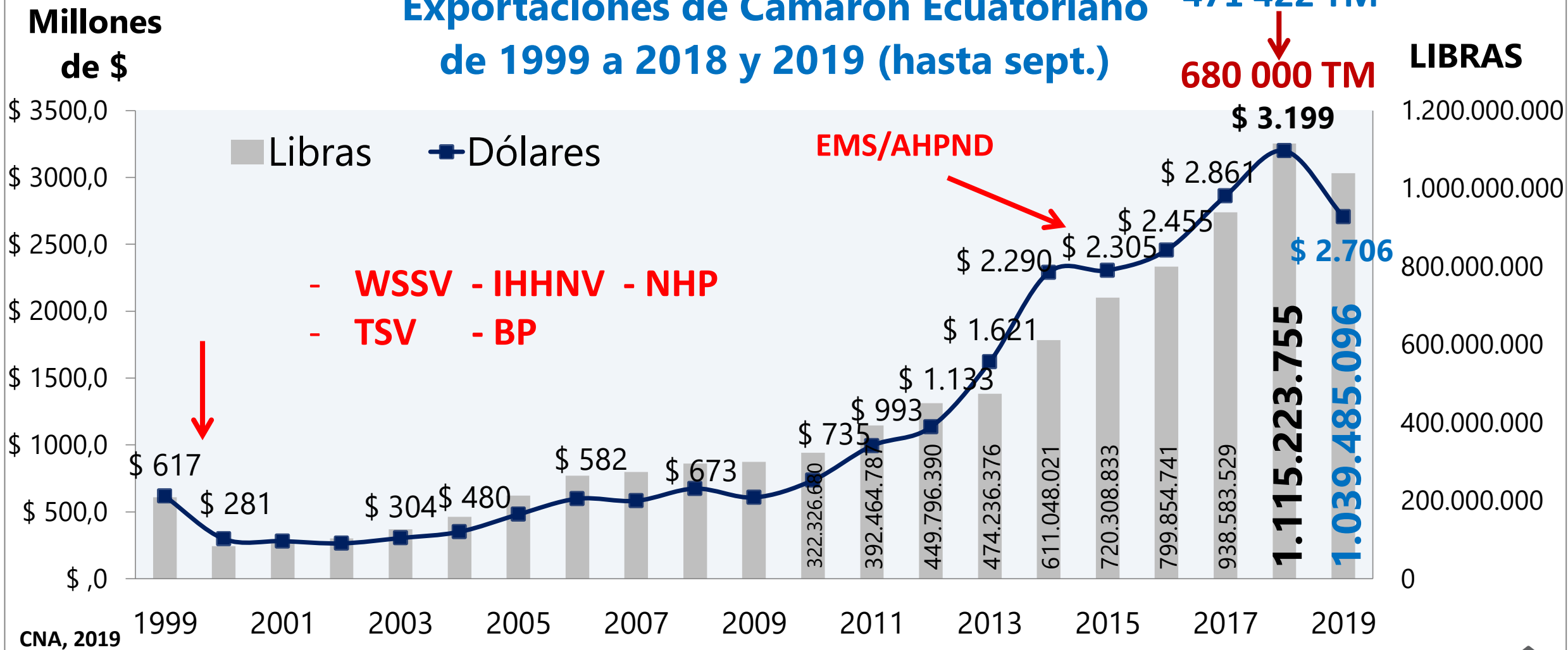
**Quarta-feira, 13 de Novembro de 2019
12h00 - 12h30**



A BRAND OF ADM



Exportaciones de Camarón Ecuatoriano de 1999 a 2018 y 2019 (hasta sept.)



Tasa de crecimiento promedio anual = 19% (2018) → 26% (2019)



Retos de la producción mundial en acuicultura

La FAO: Para satisfacer las necesidades de la población humana, la producción debería **↗ a 196 mtm, con 178 mtm para consumo humano (2025).**

Implica → **↗ la Eficiencia en la Producción de las especies cultivadas.**
↘ el impacto de las enfermedades.



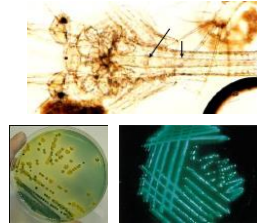
Para lograrlo

→ **Amplios esfuerzos en investigación para la acuicultura.**

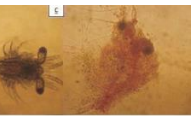
Retos de la producción mundial en acuicultura

Enfermedades por bacterias, hongos y parásitos

PROCARIOTAS	BACTERIAS	Extra-celulares	Vibrio spp. <i>V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. penaeicida,</i> Photobacterium spp. <i>V. vulnificus, V. sinaloensis, V. nigriulchritudo, V. campbelli, etc., Photobacterium damsela</i> γ-Proteobacteria VIBRIONACEAE	
			Pseudomonas spp. <i>P. putida, P. putrefaciens,</i> γ-Proteobacteria <i>P. fluorescens</i> PSEUDOMONADACEAE	
			Streptococcus spp. <i>Streptococcus parauberis, S. penaeicida</i> Firmicutes STREPTOCOCCACEAE	
			Spiroplasma spp. <i>Spiroplasma penaei</i> Firmicutes MYCOPLASMATACEAE	
		Intra-celulares	Mycobacterium spp. <i>M. peregrinum, M. fortuitum, M. marinum</i> Actinobacteria MYCOBACTERIACEAE	
			Necrotizing Hepatopancreatitis bacterium α- Proteobacteria RICKTTESIACEAE	 "NHP-B"



← Síndrome de bolitas o Zoea II
EMS / AHPND
→



Estreptococosis
Morales-Covarrubias
Pantoja y Lightner, 2014

Spiroplasma penaei sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp

EN VIGILANCIA

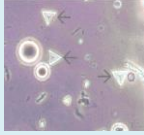
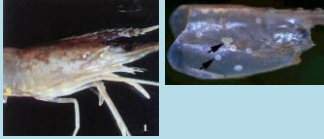

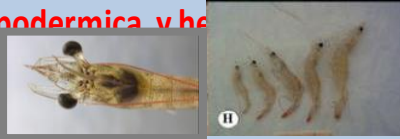

Parásito Intracelular formador de esporas	
FUNGI = MICROSPORIDIA	
EHP	Hepatopancreatic
Microsporidiosis	Shrimp Farming
<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>	


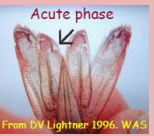

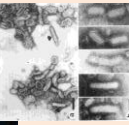




Pantoja y Lightner, 2014



Enfermedades por Virus de ADN

Enfermedades por Virus de ARN

VIRUS de ADN	ADNdc	BP Baculovirus	Baculovirus penaei	
		WSSV Whispovirus	White Spot Syndrome Virus Virus de la Mancha Blanca	
		SHIV Iridovirus	Shrimp Hemacyte Iridescent Virus Virus Iridescente de Hemocitos	
	ADNsc	IHHNV Brevidensovirus	Infectious Hypodermic and Hematopoietic Virus Virus de la Necrosis hipodermica y he Infeciosa	
		HPV Pm-Densovirus	Hepatopancreatic parvo-like Virus Virus Hepatopnacreatico	

VIRUS de ARN	ARNsc+	TSV Aparavirus	Taura Syndrome Virus Virus del Síndrome de Taura		
		YHV-type1-8 Okavirus	Yellow Head Syndrome Virus Virus del Síndrome de la		
	ARNdc	IMNV ¿Artivirus?	Infectious Mionecrosis Virus Virus de la Mionecrosis Infecciosa		
	ARN bipartite	CMNV gamma Nodavirus	Covert Mortlity Nodavirus Nodavirus de la Mortlidad encubie		
		PvNV Nodavirus	Penaeus vannamei Nodavirus Necrosis Muscular		
		MrNV Nodavirus	Macrobranchium rosenbergii nodavirus Enfermedad de la cola blanca		



TODOS BAJO VIGILANCIA



Retos de la producción mundial en acuicultura



Con estos antecedentes, el desafío es:

La Producción Rentable de Animales Sanos con un Impacto Ambiental Limitado.

- mejorar las tasas de crecimiento,
- mejorar la eficacia de la alimentación,
- innovar y mejorar los sistemas de producción,
- reducir las pérdidas por enfermedades, mejorando la respuesta inmune,
- mejorar las técnicas de diagnóstico y las medidas de prevención

Las “Microbiómicas” con el Estudio y manejo de la Microbiota, el uso de Probióticos y Productos de Sustitución Seguros pueden acelerar la consecución de estos objetivos.

Buscando la solución para una mejor producción

Múltiples productos benéficos → sistemas de cultivos (dependientes de las comunidades microbianas)

- Probióticos (en alimento o para Biocontrol, Biorremediación del agua y suelo)
- Prebióticos,
- Dietas mejoradas y/o Bioseguras,
- Antimicrobianos,
- Extractos naturales,
- Aceites esenciales,
- Ácidos orgánicos, etc.



→ cambio temporal de la abundancia, diversidad y función de la microbiota.

Objetivo:

Las “Microbiómicas”

- Evaluar el impacto que tiene la aplicación y formas de aplicación de los productos
- Mantener un Balance Microbiano Saludable y Funcional

¿Comprender y Conocer el o los Efecto(s) en el sistema de producción?

→ Desarrollar y Establecer Protocolos Específicos de Aplicación de los Productos Benéficos

Não vamos tentar inventar uma poção mágica !!



Microbiota y Microbioma: ¿cuál es la diferencia?

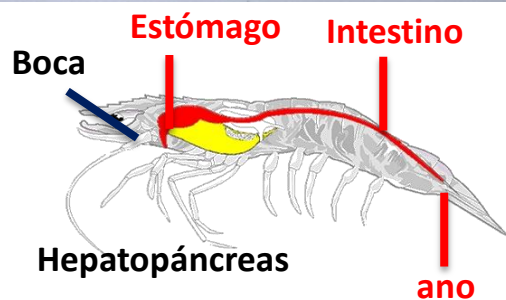
¿Que es la Microbiota?

Conjunto de microorganismos (comensales, simbióticos, patógenos, ...) que coloniza un hábitat específico.

¿Dónde la encontramos?

- **En tejidos específicos** (hemolinfa, hepatopancreas, Intestino, etc.)
- **En organismos completos** (larvas, microalgas, zooplancton)
- **En ambientes (agua, suelo, filtros, ...)**

Residen de forma más o menos permanente y realizan funciones específicas.



¿Que es el Microbioma?

Conjunto de genomas y sus genes, proteínas y metabolitos de una microbiota, incluye también sus funciones y el ambiente que habitan.

El microbioma del intestino es una parte crítica del funcionamiento general de los organismos.

¿Cuándo empieza a desarrollarse?



Contribuye a la promoción:

- Buena Salud del huésped
 - Función normal
- (balance microbiano sano = **Eubiosis**),
o puede ser perjudicial
 (desbalance microbiano = **Disbiosis**).

Equilibrio / Balance Microbiano

BUSCAMOS

Eubiosis = estado cuando la microbiota intestinal, teóricamente “normal” y “equilibrada”,

→ Beneficia la salud a nivel:

- **Comportamiento** (alimentación y reproducción)
- **Descomposición de alimentos,**
- **Asimilación de nutrientes,**
- **Mejora del crecimiento**
- **Mejora de la inmunidad**
- **Control de los patógenos**

propios de un individuo sano.

EUBIOSIS



SALUD



DISBIOSIS



ENFERMEDAD

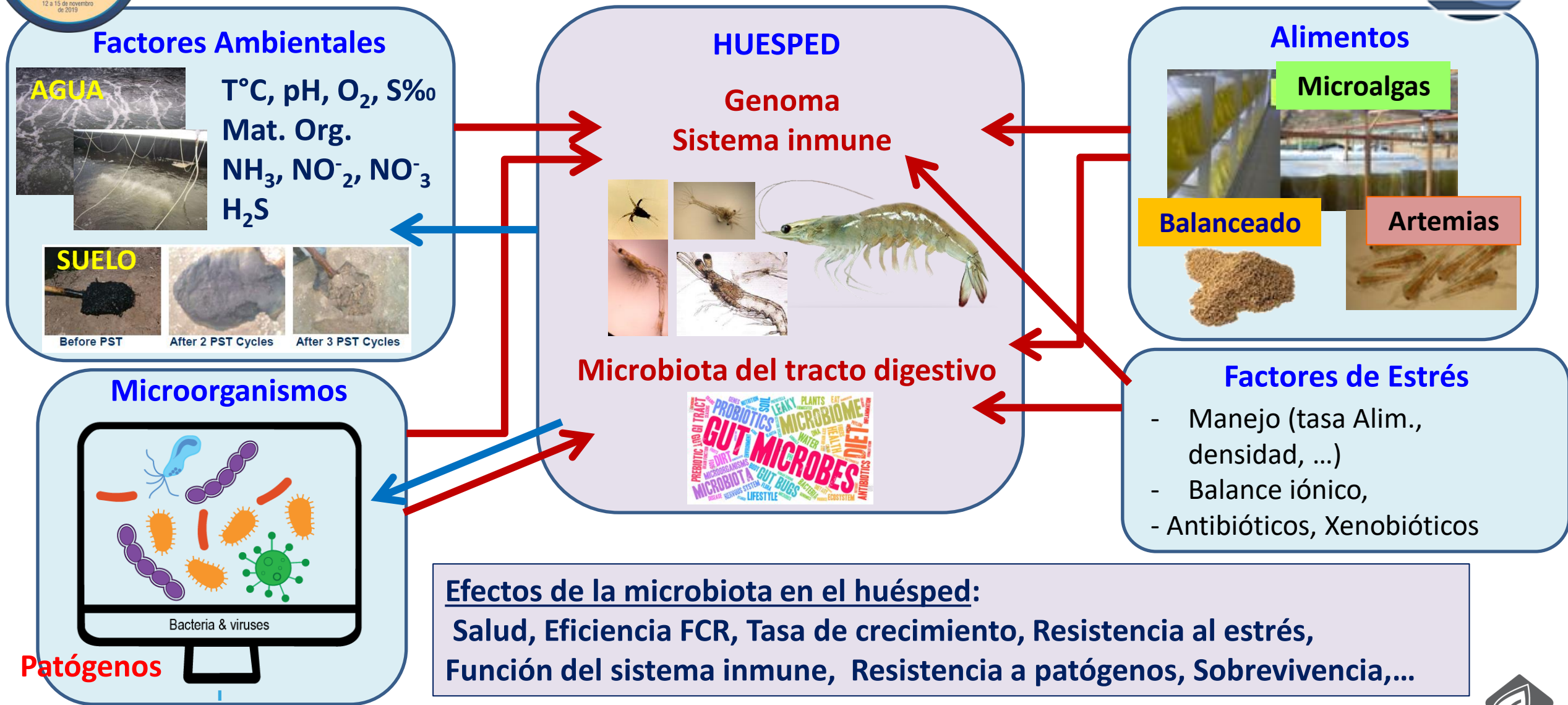


EVITAMOS

Disbiosis = desequilibrio en la composición bacteriana de un nicho ecológico en comparación con el patrón “normal” y “equilibrado”,

→ desaparición transitoria o definitiva de alguno de los efectos beneficiosos para la salud.

Interacciones entre los ambientes microbianos



Efectos de la microbiota en el huésped:
Salud, Eficiencia FCR, Tasa de crecimiento, Resistencia al estrés, Función del sistema inmune, Resistencia a patógenos, Supervivencia,...

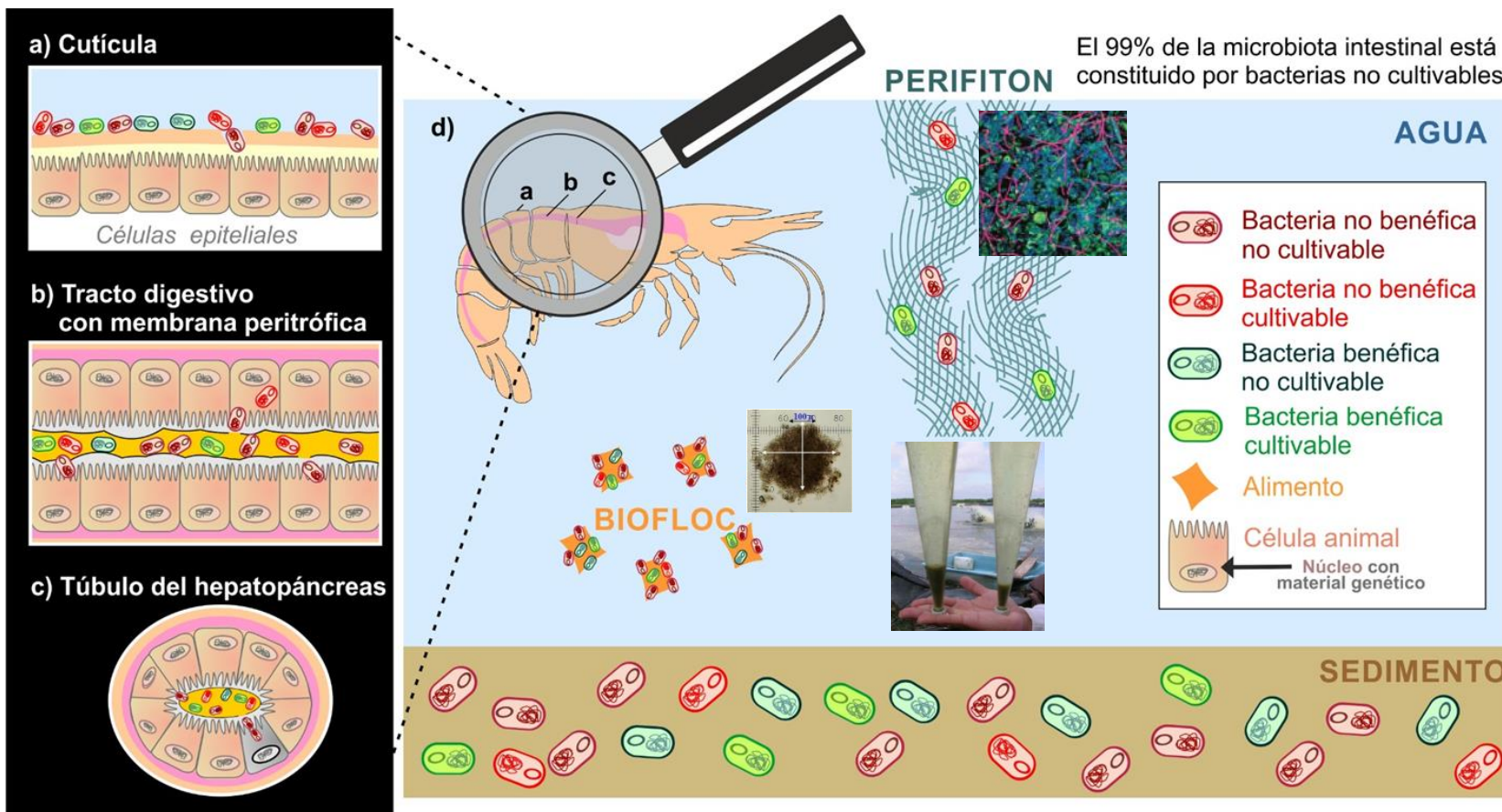
Microbiómicas / Multi-metaómicas

La caracterización de la diversidad y función del microbioma del camarón y otros ambientes, se convierte en una prioridad para mejorar la productividad y prevenir las enfermedades.

Un consorcio microbiano óptimo para la salud del huésped debe ser:

- Caracterizado,
- Analizado,
- Optimizado,
- Domesticado y
- Monitoreado,

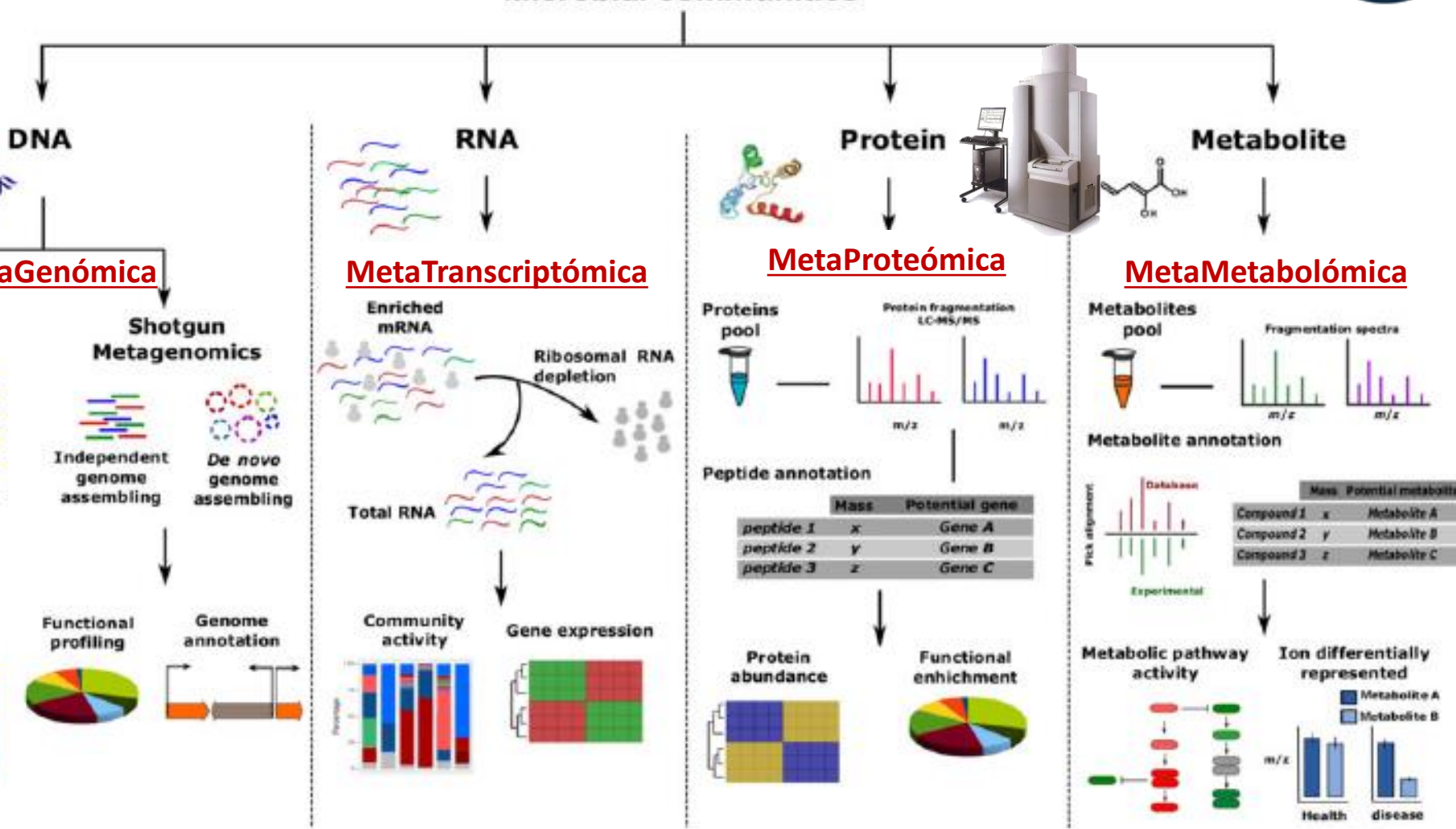
Lo que le corresponde a las “microbiómicas”
→ Tecnologías
Múlti-Metaómicas



Tecnologías Multi-Metaómicas

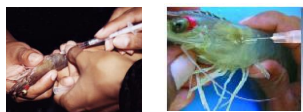
Microbial communities

Moléculas de la vida:

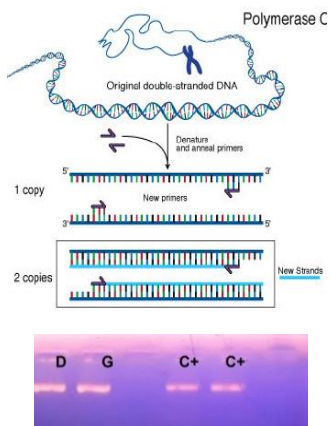


DIAGNOSTICO MOLCULAR

(Genómica)



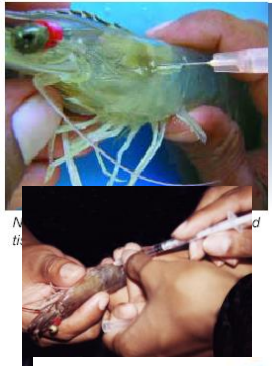
PCR



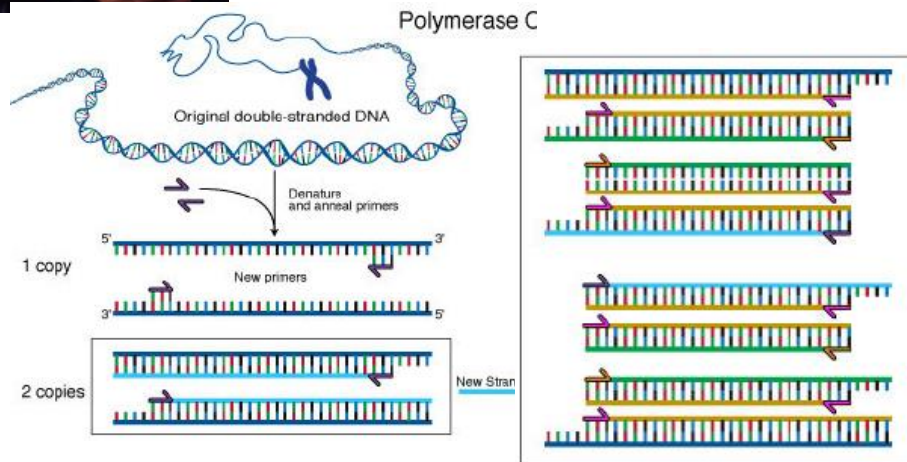
Complejos Análisis Bioinformáticos “ Big Data”

" Herramientas biotecnológicas para el control y prevención de enfermedades"

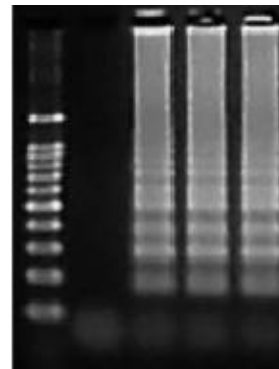
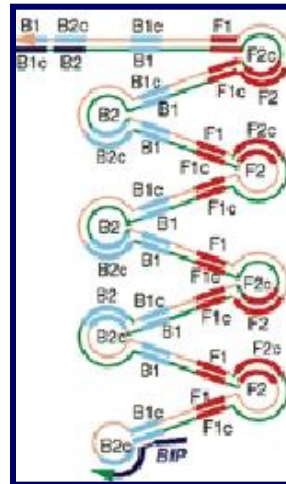
La primera línea de aplicación corresponde al diagnóstico y monitoreo de patógenos en sistemas de cultivo.



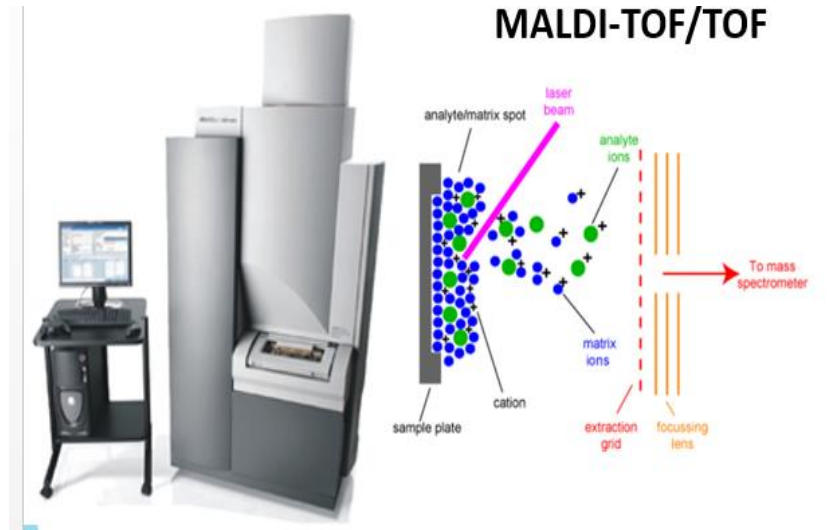
Reacción en cadena de la polimerasa
PCR, nested-PCR
RT-nested-PCR



Isothermal amplification = LAMP



Espectrometría de masa



DIAGNÓSTICOS MOLECULARES PARA PATÓGENOS DEL CAMARÓN

(larvas, juveniles, reproductores, vectores, alimentos y muestras ambientales)

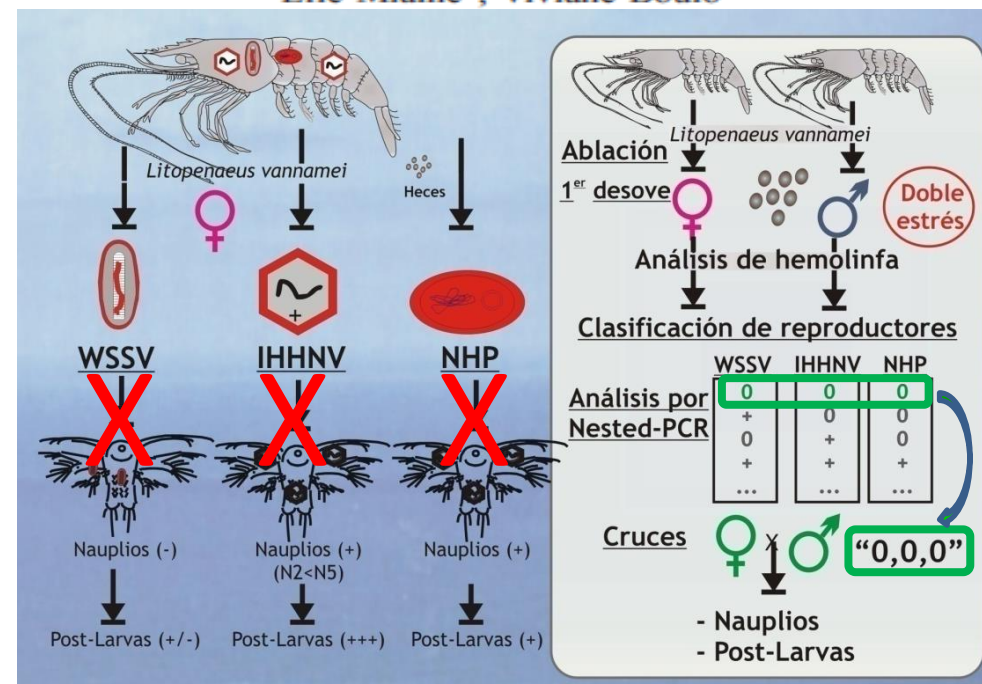
Certificación y eliminación de la transmisión vertical

La prevención de la transmisión de virus se basa principalmente en el **análisis individual de los reproductores para eliminar los animales portadores de patógenos** y subsecuentemente susceptibles de transmitirlos.

Eliminación de la transmisión horizontal por individuos portadores y vectores

Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*

Emmerik Motte^a, Edwin Yugcha^a, Juan Luzardo^a, Fernando Castro^b, Gael Leclercq^a, Juan Rodríguez^a, Paul Miranda^a, Oswaldo Borja^a, Javier Serrano^a, Manuel Terreros^a, Karina Montalvo^a, Alexandra Narváez^a, Narda Tenorio^a, Vima Cedeño^a, Eric Mialhe^a, Viviane Boulo^{a,c,*}

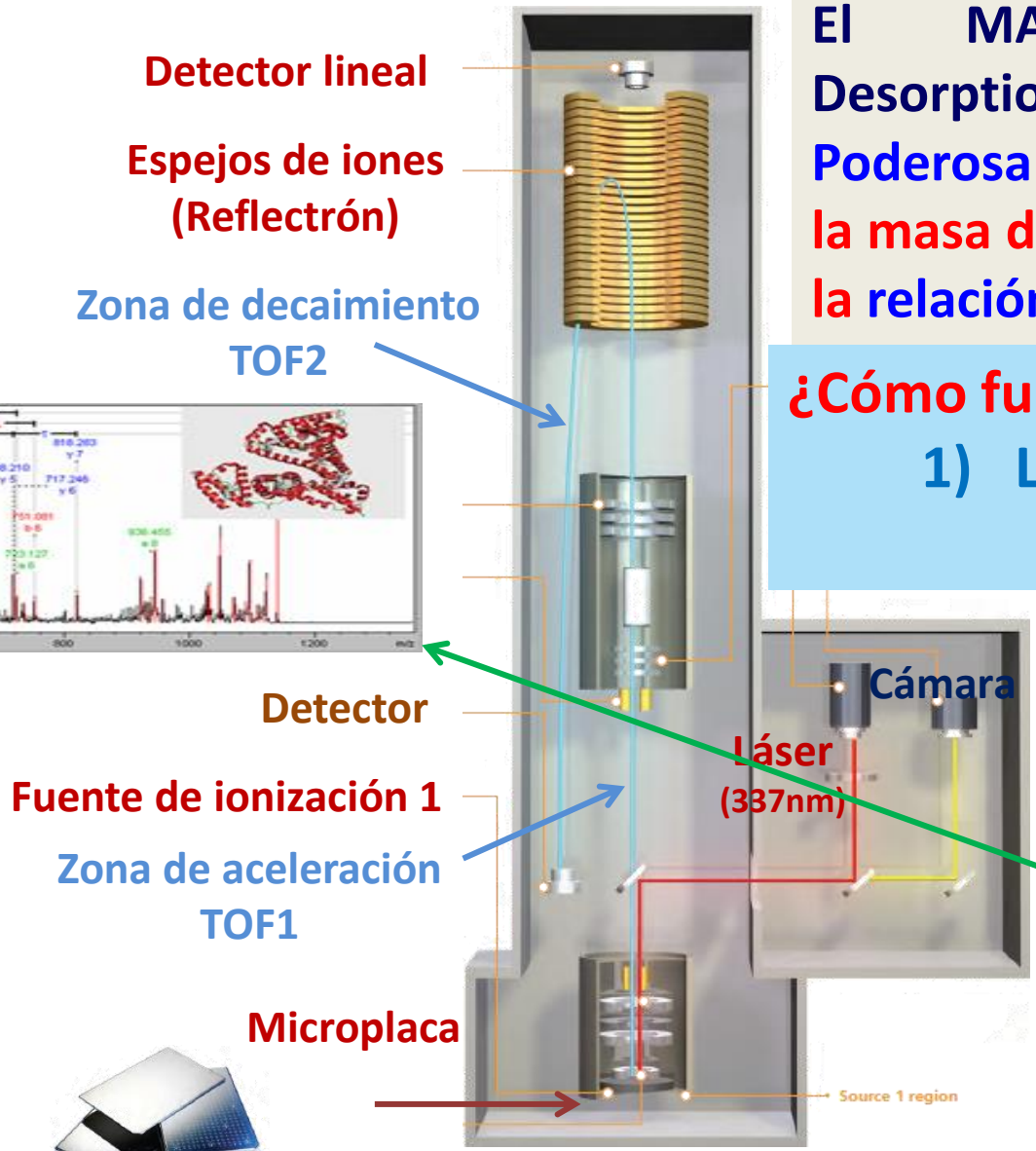
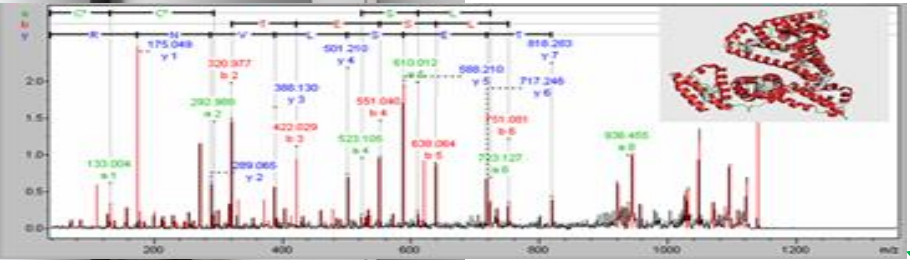
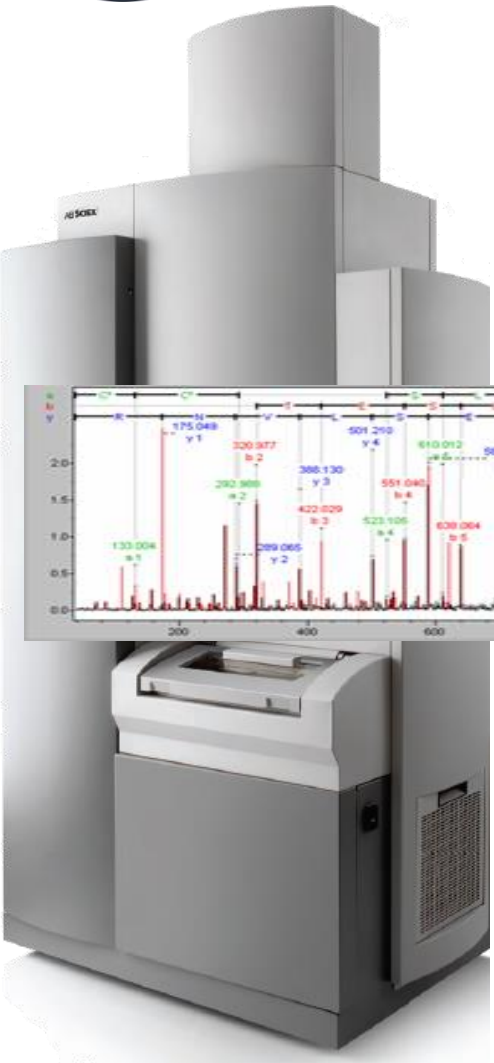


Diagnóstico por Proteómica: MALDI-TOF TOF

El MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight Mass) Poderosa técnica micro-analítica → **determinar la masa de moléculas** por medio de la **medida de la relación masa/carga (m/z).**

¿Cómo funciona?

- 1) Las macromoléculas mezcladas a una **matriz sólida**
- 2) Irradiación → **láser pulsado.**
- 3) Desorción de los iones de **fase sólida** → **fase gaseosa.**
Separación de iones: relación **masa/carga.**
- 4) **Resultado = Espectro**



Detección de proteínas virales de WSSV e IHNV en hemocitos

MetaProteómica: MALDI-TOF TOF

Identificación de toxinas en cepas causantes de EMS/AHPND

WSSV	Prec m/z	Mejor Secuencia	GENES
hemocitos	2440,178	YNIHISEENYASRFSKINR	156
	2495,2361	FIGESMQHVQKEWSSAVNNGNR	160
	2434,291	DRNSKMEIRNYGARGSGINTGR	77
IHHNV	Prec m/z	Best Sequence	Proteína
hemocitos	2134,106	YGIERLSYFGLGHAIFKR	Non Structural 1
	1333,62	QAEITDDIRK	Non Structural 2
	1599,817	RDAHNEDEEHAER	CAPSIDE
	1828,9871	SSNSSATETQRYKMVK	CAPSIDE

<i>V. parahaemolyticus</i>	Prec m/z	Mejor Secuencia	Proteína
EMS/AHPND	1118,566	HTPIIPEVGR	PirA
	2189,8911	DETYHLQRPDNAFYHQR	
	2139,9131	GELTIQYQWGAPFMAGGWK	

Detección e Identificación de toxinas

Prec m/z	Mejor Secuencia	Proteína	Organismo
2494,978	AKFQKQIMSLPTTADDLTDVAR	Putative toxin-antitoxin system toxin component, PIN family	Oscillatoria
1333,49	ENRFKKDIKR	Addiction module toxin, RelE/StbE family	Microcystis
1599,631	MLAGLYQPTEGHLR	Toxin secretion ATP-binding protein	Photobacterium
1328,63	GRPGEISNDQVR	Insecticidal toxin complex protein TccC3	<i>V. parahaemolyticus</i>



“Microbiómicas como herramientas para una mejor comprensión del balance microbiano y el desarrollo de protocolos de cultivo del camarón bio-seguros”

El segundo campo de aplicaciones de las Microbiómicas, corresponde al **estudio de comunidades microbianas**, tanto para comprender la **diversidad asociada con animales sanos y enfermos**, como para seguir y estudiar el efecto de los probióticos y productos utilizados en la prevención de enfermedades.

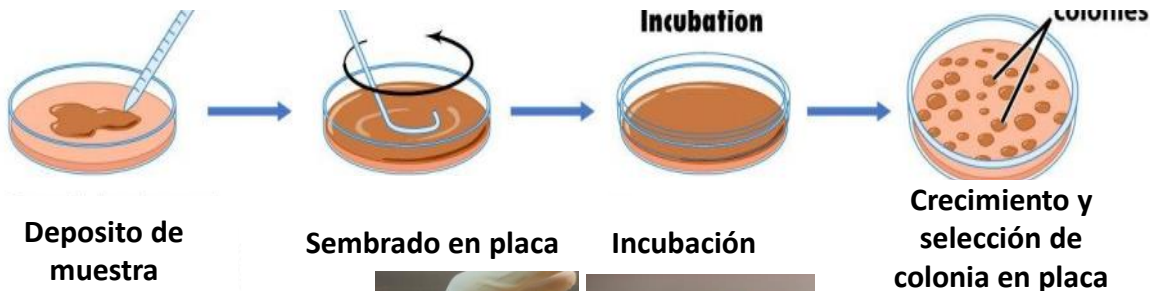
Taxonomía molecular (secuenciación gen 16S y metagenómica)

Vibrio spp.
V. Corallilyticus
V. Neptunius
V. Tubiashi
V. Europaeus
V. sinaloensis

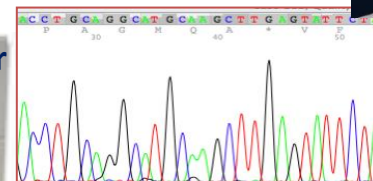
Identificación molecular de cepas cultivables y co-cultivables

Microbiota cultivable

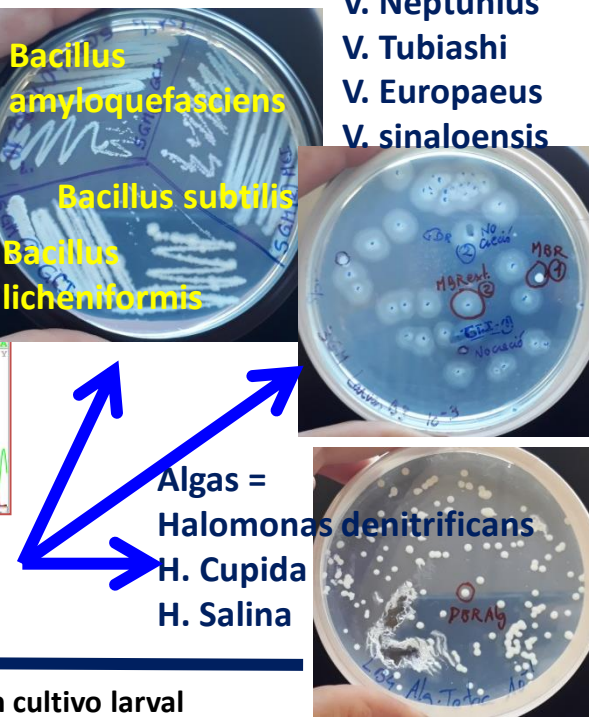
Aislamiento y purificación de cepas bacterianas



Extracción de ADN y Amplificación genes 16SrRNA, etc.

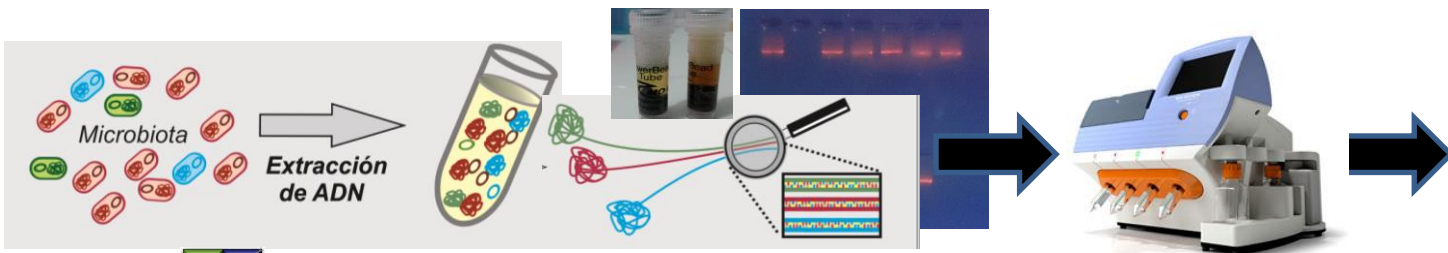


Análisis de secuencias únicas

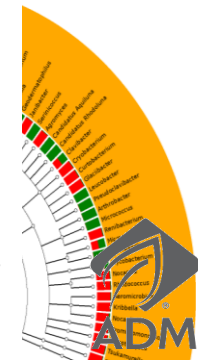
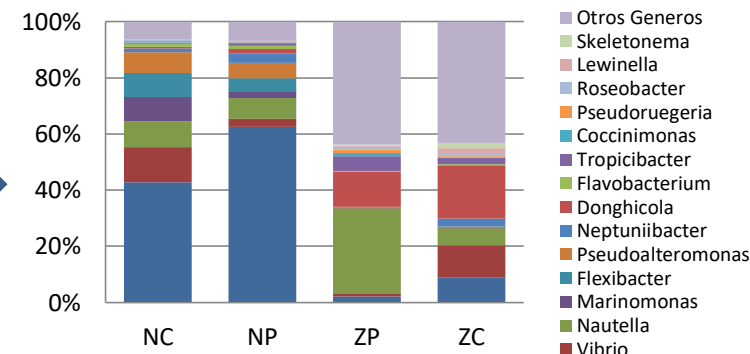


Identificación molecular de cepas no cultivables

Metagenómica



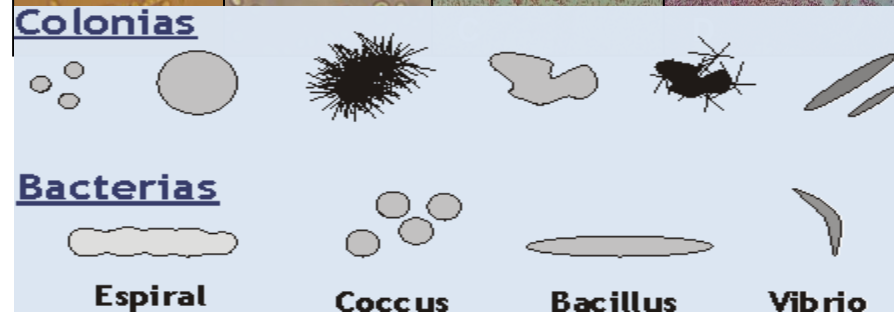
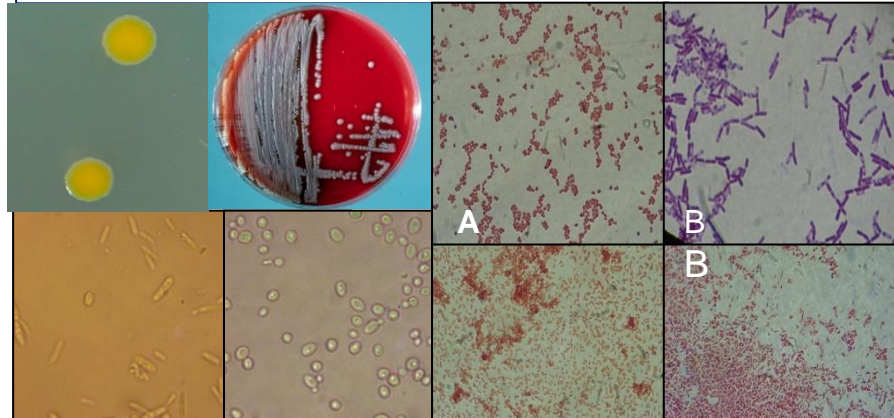
Generos predominantes en cultivo larval



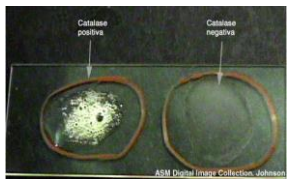
Caracterización de cepas cultivables

Evaluación de actividades enzimáticas y antagónicas,

Características morfológicas y tinción de Gram



Catalasa

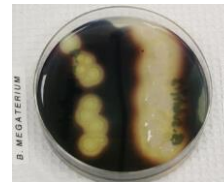


Oxidasa

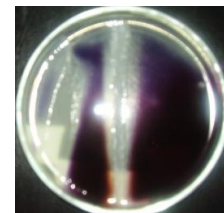
Proteasa



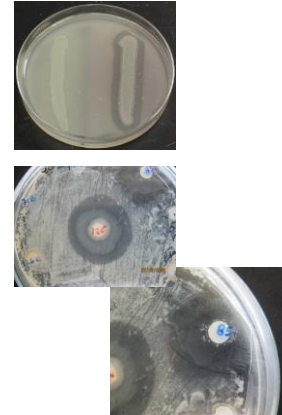
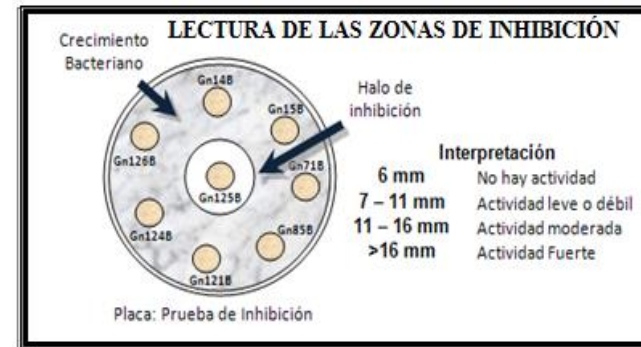
Amilasa



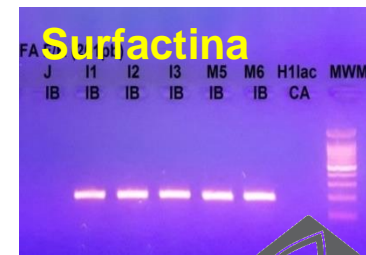
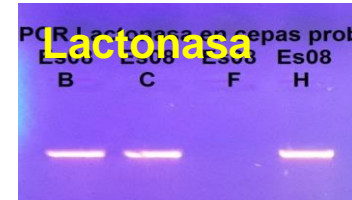
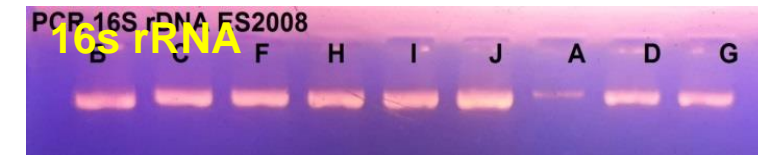
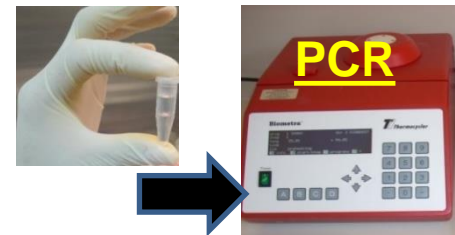
Lipasa



Antagonismos



Identificación genes de interés:



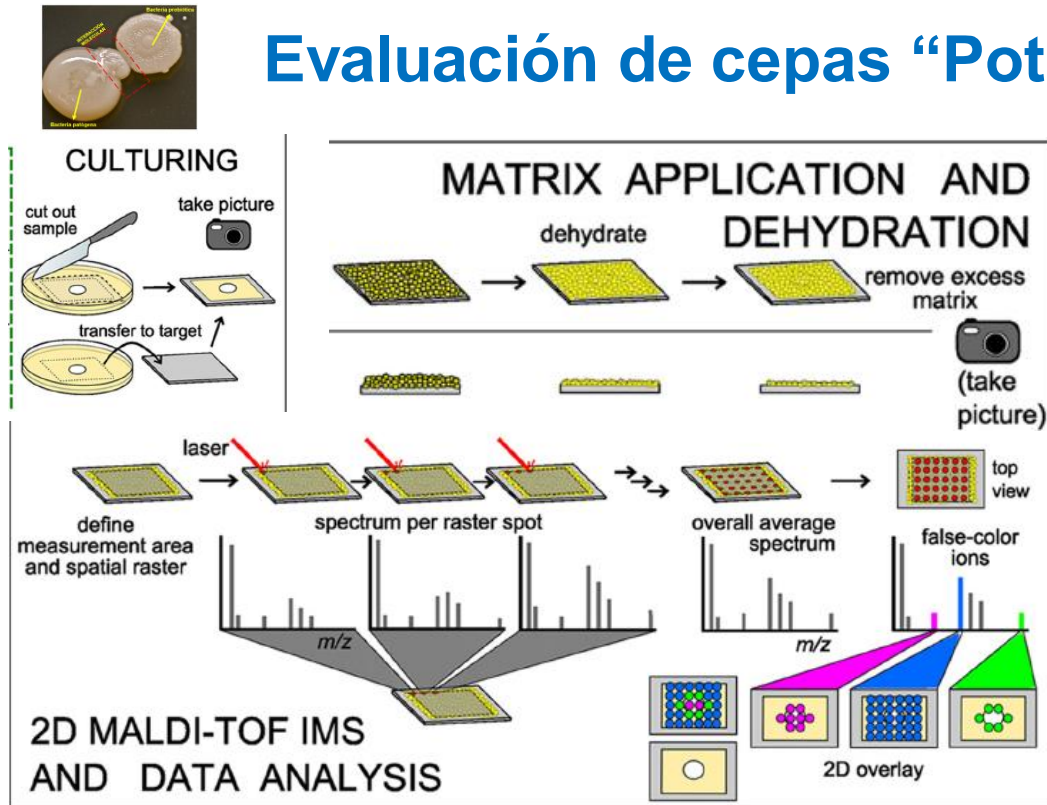
Metabolómica: Exo-metabolomas

Primer on Agar-Based Microbial Imaging Mass Spectrometry

Jane Y. Yang,^a Vanessa V. Phelan,^b Ryan Simkovsky,^d Jeramie D. Watrous,^a Rachele M. Trial,^e Tinya C. Fleming,^e Roland Wenter,^f Bradley S. Moore,^{b,f} Susan S. Golden,^d Kit Pogliano,^e and Pieter C. Dorrestein^{a,b,c}

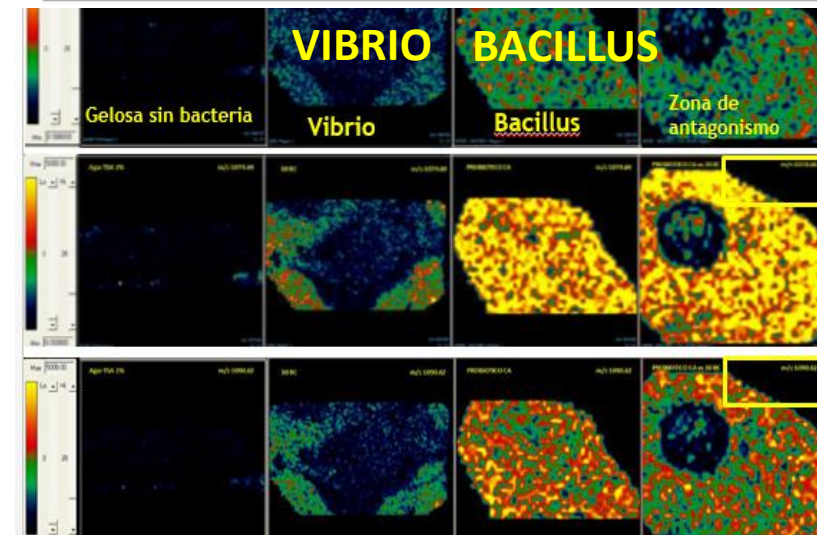
Precursor (m/z)	Mejor secuencia	Conf.	Nombre de proteína
1812,66	MYKTGLARWMPDG R	99	Bacilomicina D sintetasa B
870,3719	VWSSH	99	Surfactina
870,3528	AGILMPR	99	Micosubtilina sintetasa (subunidad B)
2016,479	TGDLARRLPDGNIEY LGR	99	Gramicidina sintetasa lineal (subunidad D)
1263,408	YGELYGGWYR	99	Iturina A Sintetasa B
1439,3929	QTAQAFVQDPFR	99	Sintetasa de péptido no ribosomal
1037,333	STVEFGRR	97,9	Bacitracina
1277,411	AGQFSMGMQR	90,2	transportador ABC de clorofenilamidas (antibiótico)

Evaluación de cepas “Potenciales Probióticos”



Peptidos Antimicrobianos :

- Bacillomycin
- Bacilysin
- Iturin
- Surfactin
- Subtilin
- Micosubtilin
- Gramicidin
- Bacitracin





“Microbiómicas como herramientas para una mejor comprensión del balance microbiano y el desarrollo de protocolos de cultivo del camarón bio-seguros.”

- **Análisis de la microbiota de ambientes de cultivo y animales en condición de salud y enfermedad, mediante secuenciación y metagenómica.**
- Evaluación de la aplicación de microorganismos probióticos específicos.



A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota

Fernanda Cornejo-Granados^{*}, Luigui Gallardo-Becerra^{*},
Miriam Leonardo-Reza, Juan Pablo Ochoa-Romo and Adrian Ochoa-Leyva

Un meta-análisis revela los factores ambientales y del huésped que configuran la estructura y la función de la microbiota del camarón.

Primer meta-análisis de la microbiota de camarones
→ Secuencias del gen ribosomal 16S disponibles.

Base de datos SCOPUS usando 37 palabras claves

- 536 artículos (usados para meta-analysis)
- 110 Estudios, Seq. Sanger / Metagenómica
- 16 Estudios → 199 muestras.

Muestras:

48,2% → de laboratorios.
32.7% → de las fincas
19.1% → de tipo salvaje (wt).

45.2% → adult,
41.2% → juvenile,
11.6% → larvae,
2.0% → post-larvae.

75.9% → intestino,
9.0% → hepatopáncreas,
8.5% → camarones enteros,
1.5% → heces de camarón
0.5% → branquias.

88.9% de individuos sanos
11.1% de individuos enfermos

Región hipervariable del gen 16S V4_V5
37.2% → Illumina MiSeq
33,2% → Roche 454
29.6% → on Torrent



China (47.2%),
Taiwán (12,6%),
Tailandia (11,1%),
Estados Unidos (10.6%),
México (9.0%),
Ecuador (7.0%),
Indonesia (1,5%) y
Japón (1.0%)

63,3% de especies marinas
Alvinocaris longirostris (1%),
Litopenaeus vannamei (52.8%)
Penaeus monodon (9.5%)
36.7% de agua dulce
Macrobrachium spp. (23.2%),
Neocaridina denticulata (13.6%)



Meta-Análisis: Características generales de la microbiota.



Análisis Estadísticos (ANOSIM, PERMANOVA)

Estudio de Factores biológicos en la Estructuración de los microbiomas del camaron.

- Ambiente (marino vs. agua dulce)
- Estilo de vida (silvestre vs. cultivo)
- Órganos
- Estadíos de desarrollo
- Alimentación (carbohidratos, lípidos, proteínas, ...)
- Estado de salud (Sano vs. Enfermo)

La más alta diversidad corresponde a muestras de tipo:

Agua dulce,
Silvestre,
Intestino,
Adulto,
Dieta tipo silvestre
Individuos saludables.

PICRUSt :

para predecir las funciones potenciales de la microbiota

Funciones más enriquecidas

El órgano (93),
Etapa de desarrollo (12)
Estilo de vida (9).



Meta-Análisis: Características generales de la microbiota.



El phylum

- **Proteobacterias** (promedio = **65.99%**),
- la mayoría de las especies de bacterias del intestino, hepatopáncreas, heces, branquias y camarones enteros provienen de este filo.

El medio ambiente (marino y de agua dulce) factor que influencia la agrupación y la diversidad de la microbiota del camarón.

En camarones marinos agrupamiento de Orden:

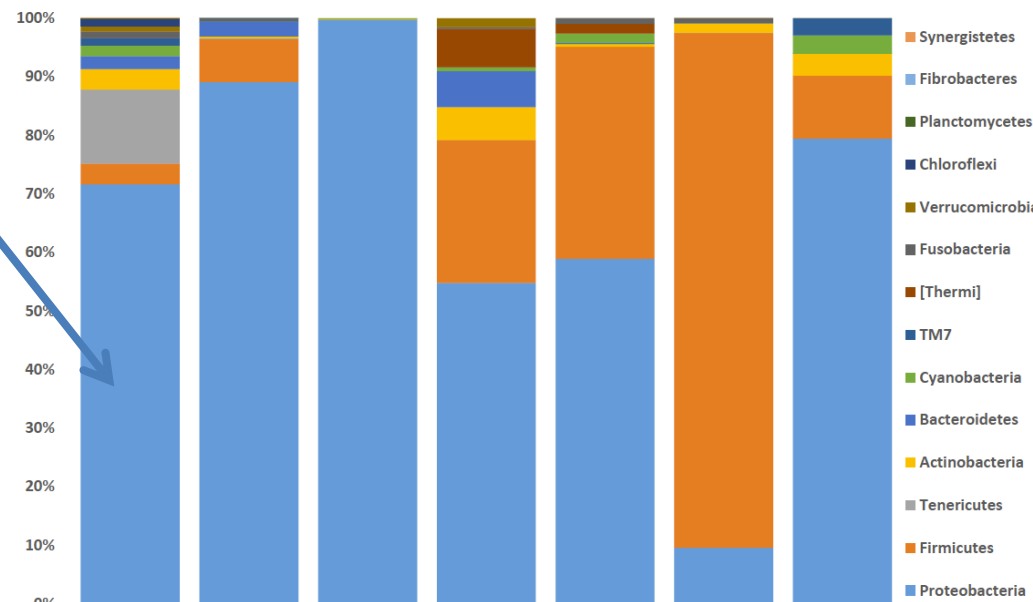
- Enterobacteriales,
- Vibrionales,
- Rhodobacteriales
- Alteromonadales

En camarones de agua dulce agrupamiento de Orden:

- Burkholderiales
- Clostridiales

Firmicutes (promedio= **16.42%**),
Actinobacteria (promedio = **3.24%**),
Bacteroidetes (promedio = **2.17%**),
Fusobacteria (promedio = **0.76%**)

Contabilizando el 88% de las secuencias totales.



MARINO

AGUA DULCE

La mayor parte de la abundancia de OTU a nivel de phylum mostró que:

126 de las 199 muestras

73 de las 199 muestras

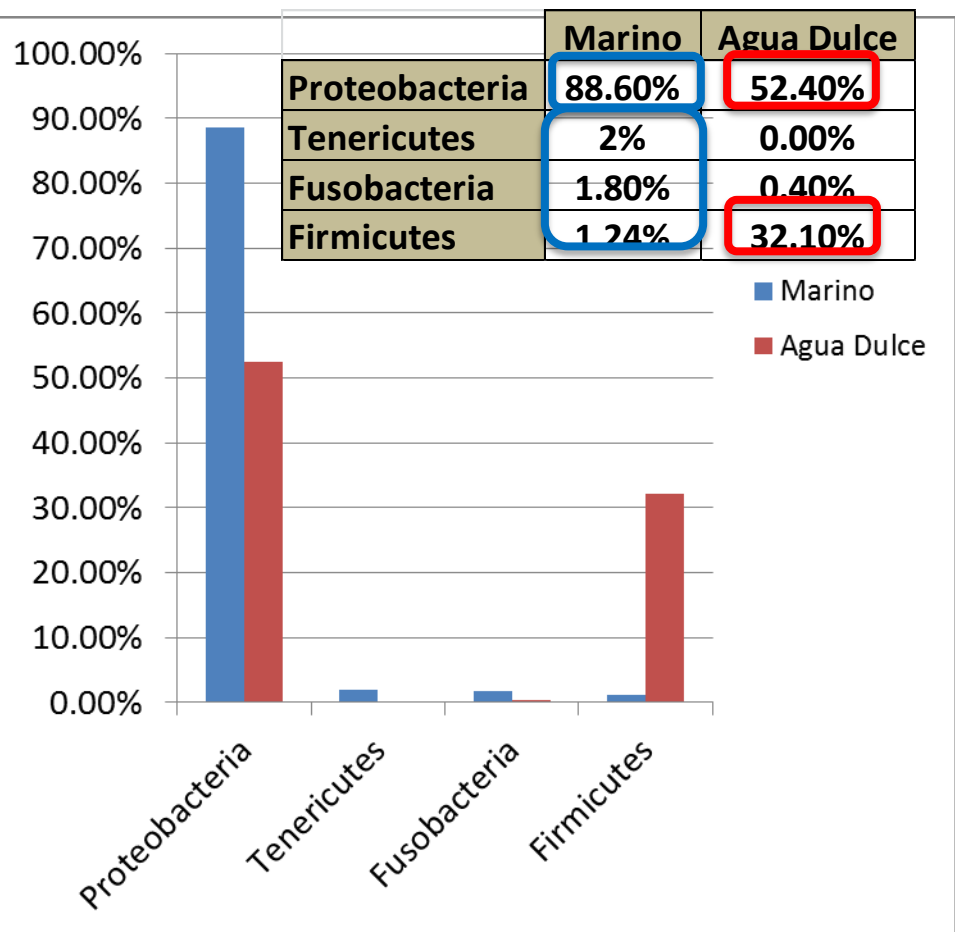
Familias

- Rhodobacteraceae → 3.1%
- Vibrionaceae → 48.6%
- Helicobacteraceae → 2.2%
- Pseudoalteromonadaceae → 18.7%

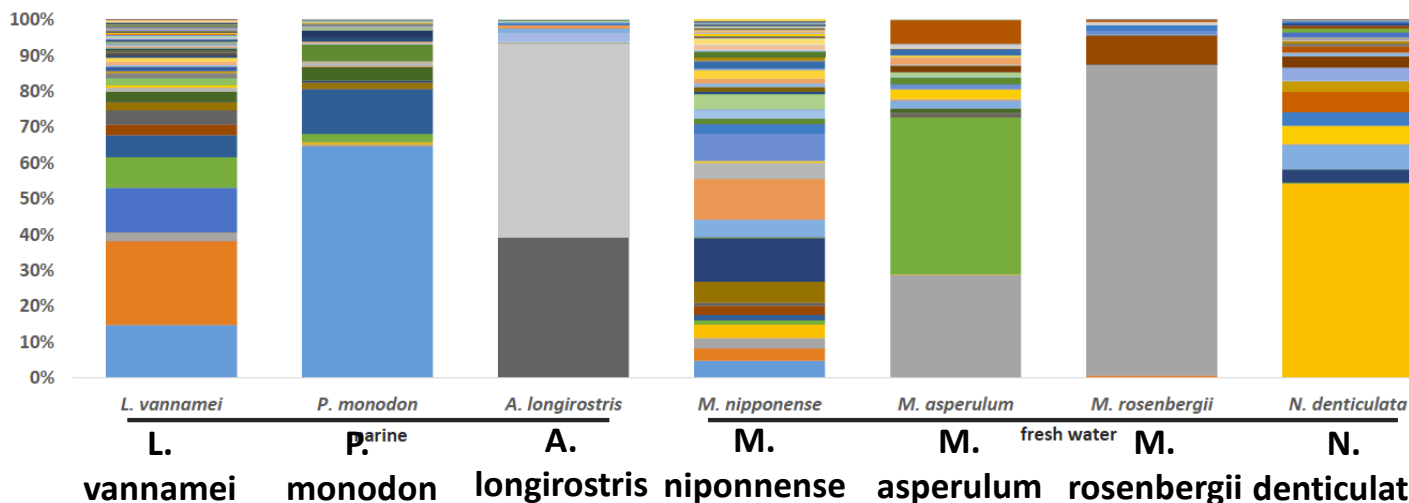
fueron las más abundantes en muestras marinas

Familias

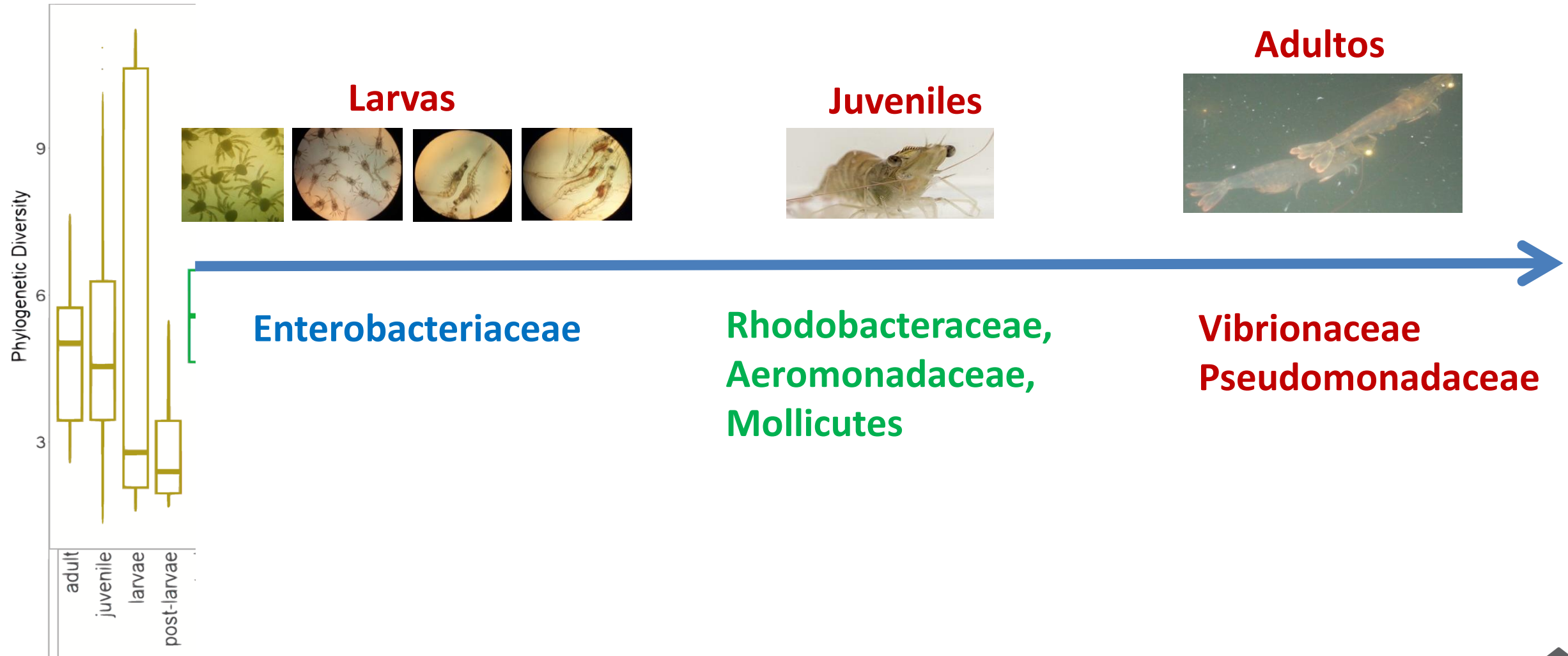
- Oxalobacteraceae → 10.8%
 - Comamonadaceae → 6.8%
 - Bacillaceae → 4.1%
- fueron las más abundantes en agua dulce



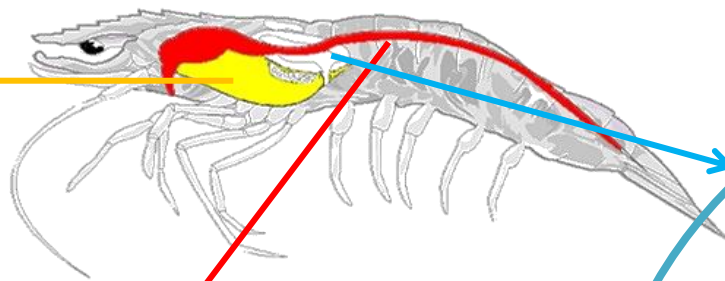
Abundancia de OTU a nivel de Familias



Cuando las muestras fueron identificadas por etapa de desarrollo.



Resultados: Identificación molecular de bacterias cultivables de camarones enfermos.



HEPATOPANCREAS

Pseudomonas putida
Acinetobacter johnsonii
Vibrio parahaemolyticus
Bacillus firmus

INTESTINO

Vibrio alginolyticus
Vibrio brasiliensis
Vibrio campbellii
Vibrio harvey
Vibrio hepatarius
Photobacterium damsela
Providencia rettgeri
Bacillus megaterium

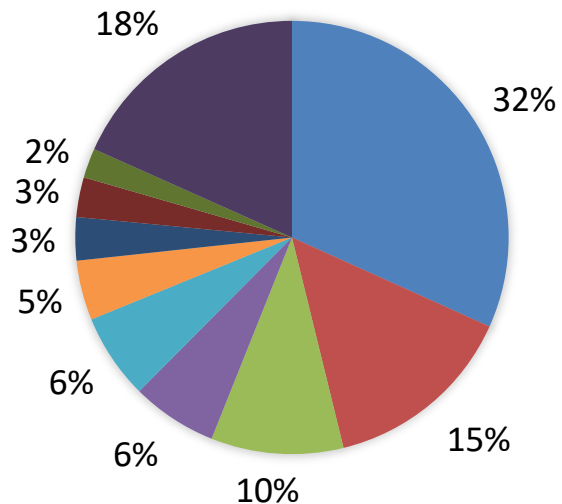
HEMOLINFA

Vibrio harvey
Vibrio hispanicus
Vibrio nigripulchritudo
Vibrio sinaloensis
Pseudomonas hibiscicola
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus warneri
Staphylococcus hominis
Staphylococcus haemolyticus
Aerococcus viridans
Acinetobacter pittii
Chryseobacterium gambrini
Bacillus cereus

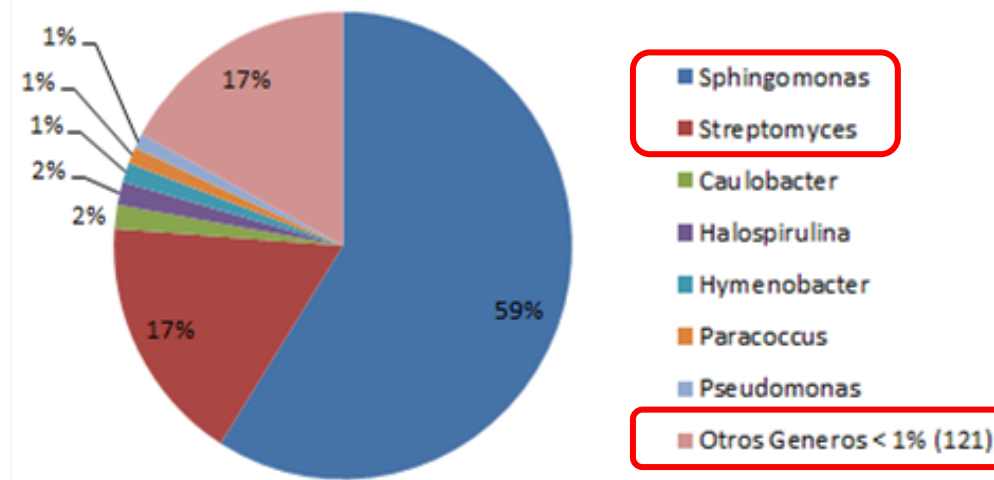
Resultados: Análisis metagenómico de bacterias en la hemolinfa.

GENEROS PREDOMINANTES EN HEMOLINFA DIRECTA DE CAMARONES SANOS

- Halospirulina
- Bradyrhizobium
- Lactococcus
- Maritimimonas
- Burkholderia
- Streptococcus
- Neisseria
- Hylemonella
- Mycena
- Otros Generos < 2%

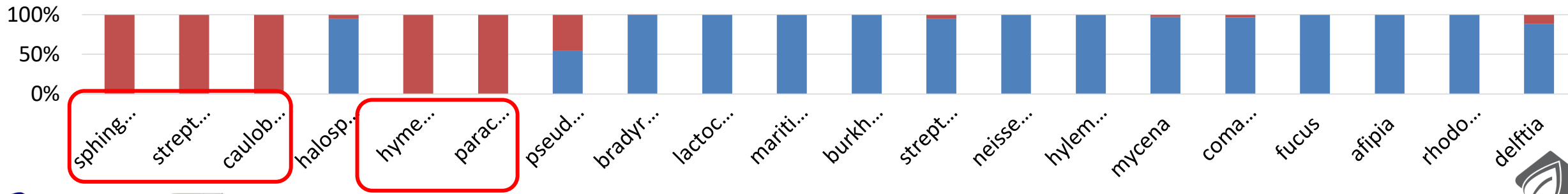


GENEROS PREDOMINANTES EN HEMOLINFA DIRECTA DE CAMARONES ENFERMOS



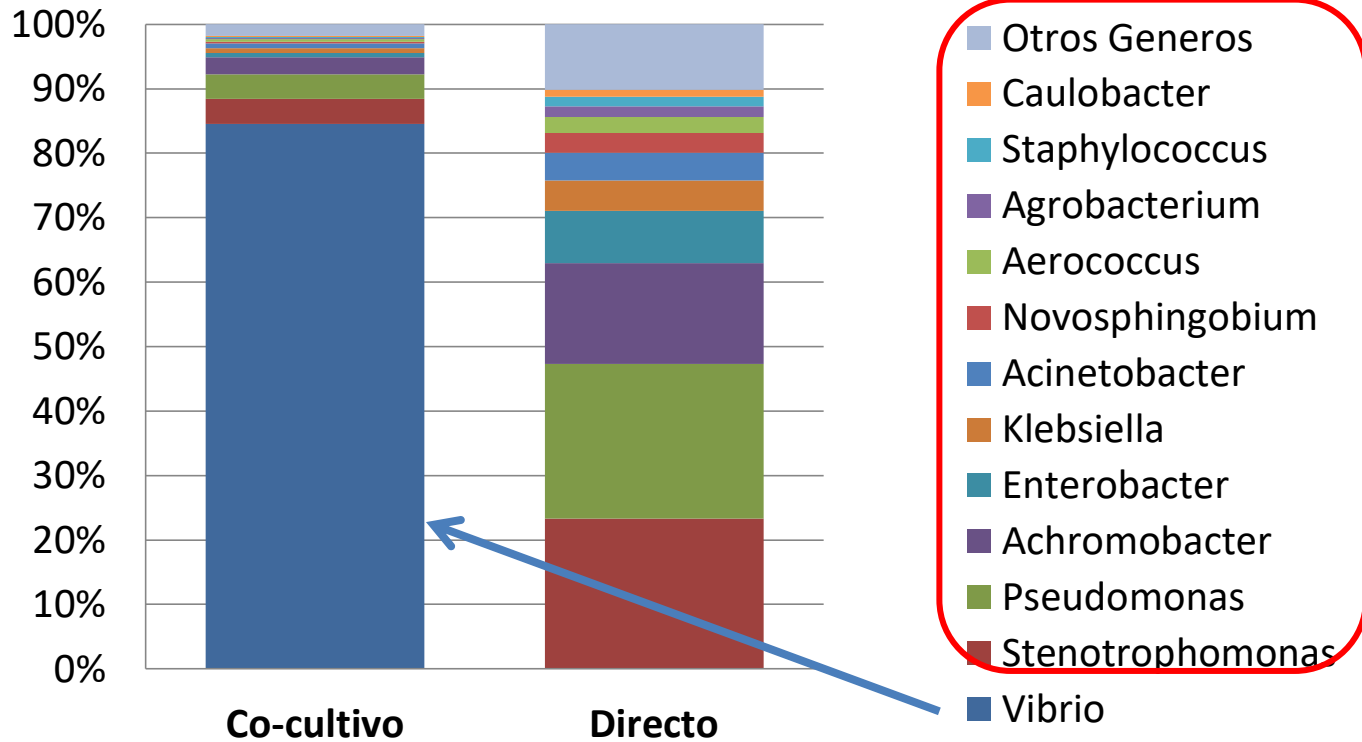
Disbiosis

Porcentaje de abundancia de generos en hemolinfa de camarones

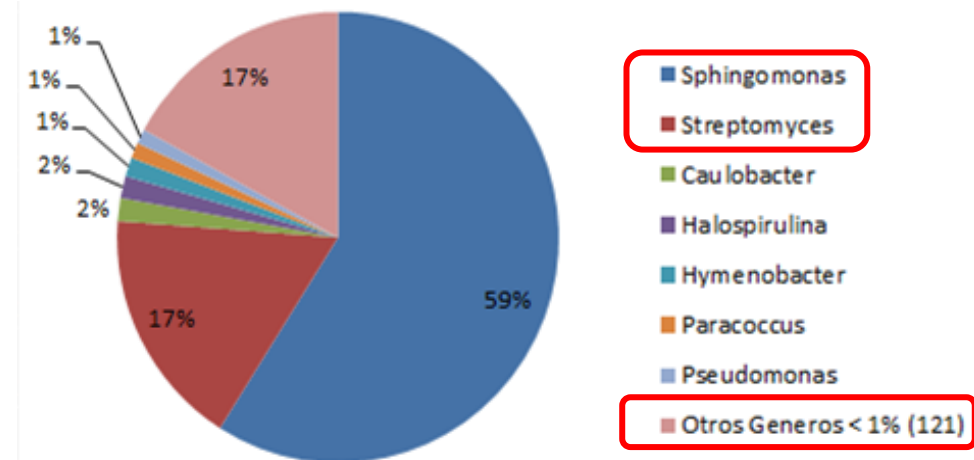


Resultados: análisis metagenómico de bacterias en **co-cultivo** y **directo** de hemolinfa.

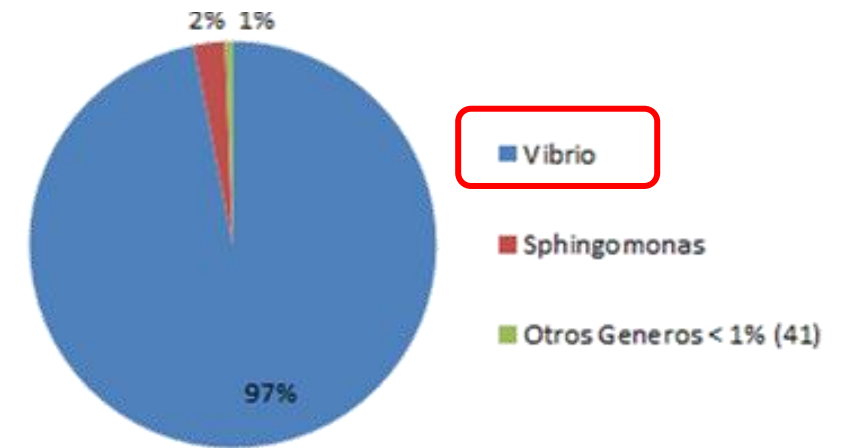
Géneros predominantes en la hemolinfa de camarón sano



GENEROS PREDOMINANTES EN HEMOLINFA DIRECTA DE CAMARONES ENFERMOS

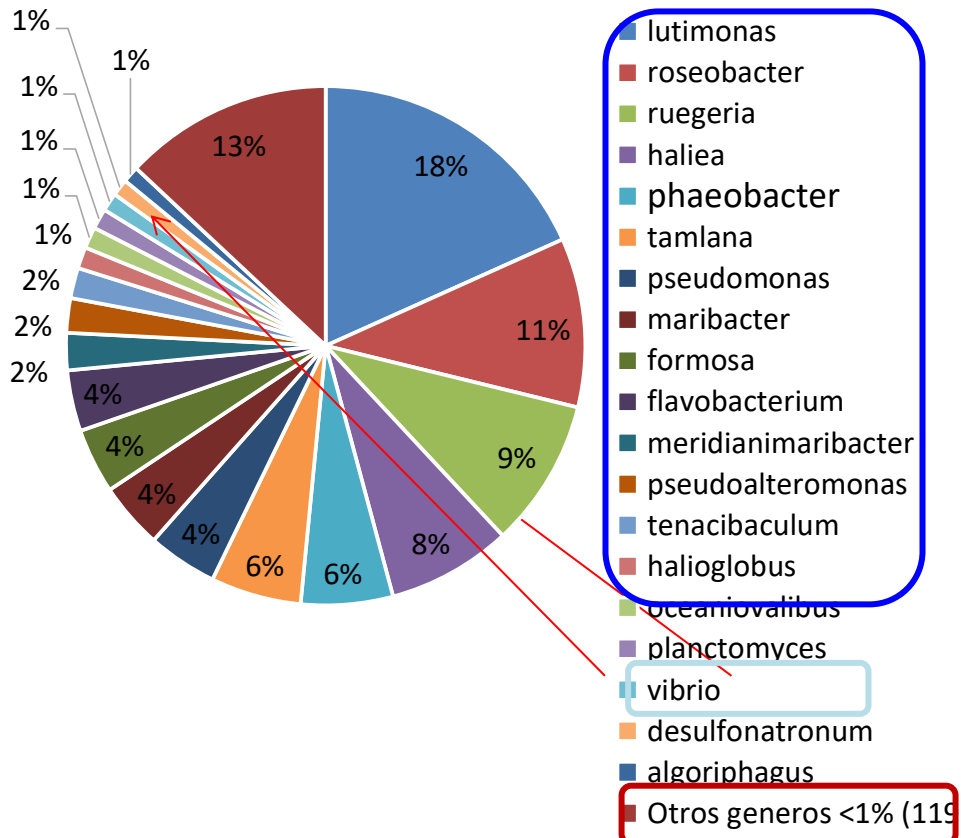


GENEROS PREDOMINANTES EN CO-CULTIVOS DE HEMOLINFA DE CAMARONES ENFERMOS



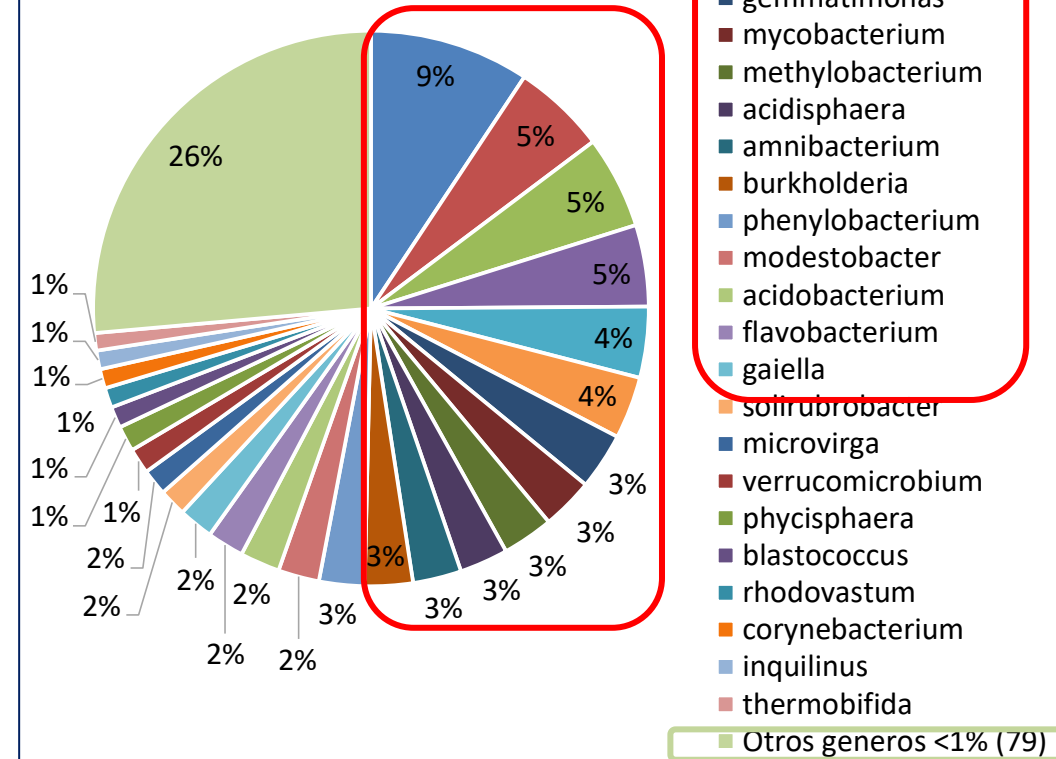
Resultados: análisis metagenómico de bacterias del **hepatopáncreas**.

GENEROS PREDOMINANTES EN HEPATOPANCREAS DE CAMARONES SANOS



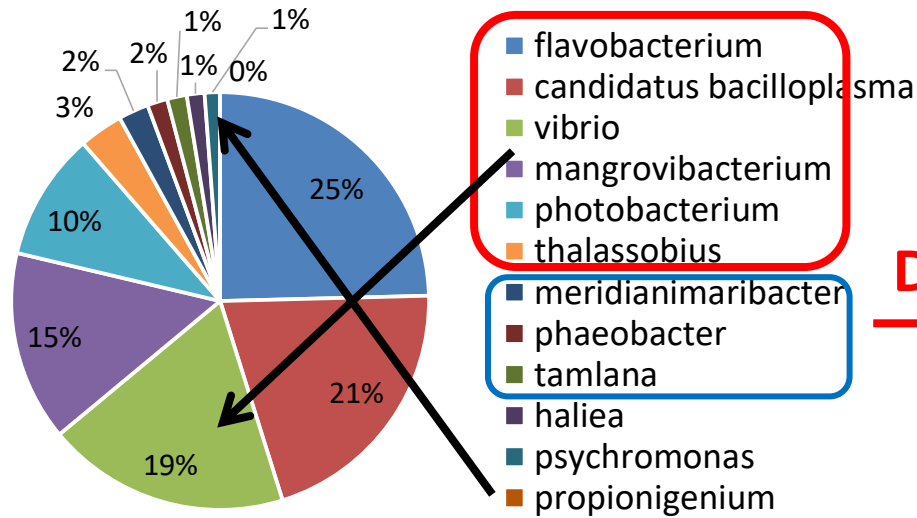
LOS GUARDIANES (Sentinelas)
Roseobacter / Ruegeria / Paeobacter
 → rol en ciclo global del carbono y sulfuro y produce compuestos bioactivos.
 - Simbióticos con fitoplancton, macroalgas, invertebrados...
 - Probióticos en larvicultura de peces.

GENEROS PREDOMINANTES EN HEPATOPANCREAS DE CAMARONES ENFERMOS

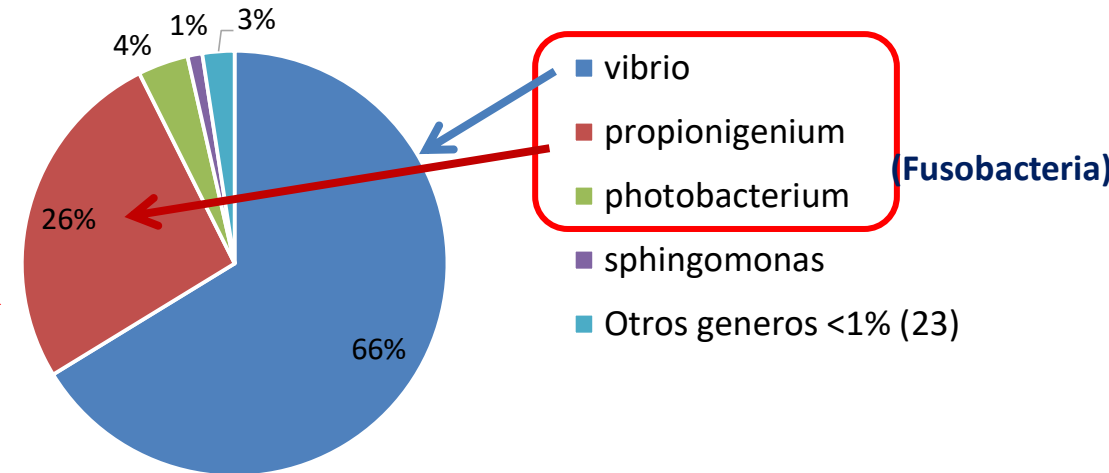


Resultados: análisis metagenómico de bacterias del **intestino**.

GENEROS PREDOMINANTES EN INTESTINO DE CAMARONES SANOS



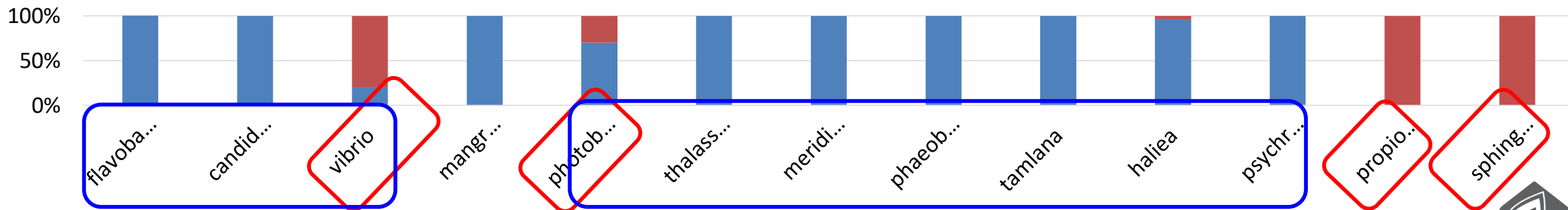
GENEROS PREDOMINANTES EN INTESTINO DE CAMARONES ENFERMOS



Disbiosis

Porcentaje de abundancia de generos en intestino de camarones

■ sano ■ enfermo



Resultados: Análisis microbiómicos en: Agua, Microalgas, Artemia, Larvas "Mysis, PLs" de varios laboratorios, en situaciones normales y con mortalidades.

En casos de Eventos de Mortalidad → la abundancia de Proteobacteria aumenta a favor Gamma-Proteobacteria, Alfa-proteobacterias
 → abundancia variable (Rickettsiales, Sphingomonadales (Killioniaceae) solo con mortalidad severa.

Otros miembro de Alfa-proteobacterias

→ Bacterias Comensales (GUARDIANES)

Rhodobacteraceae =

"Ruegeria", "Donghicola", "Thalassobius")

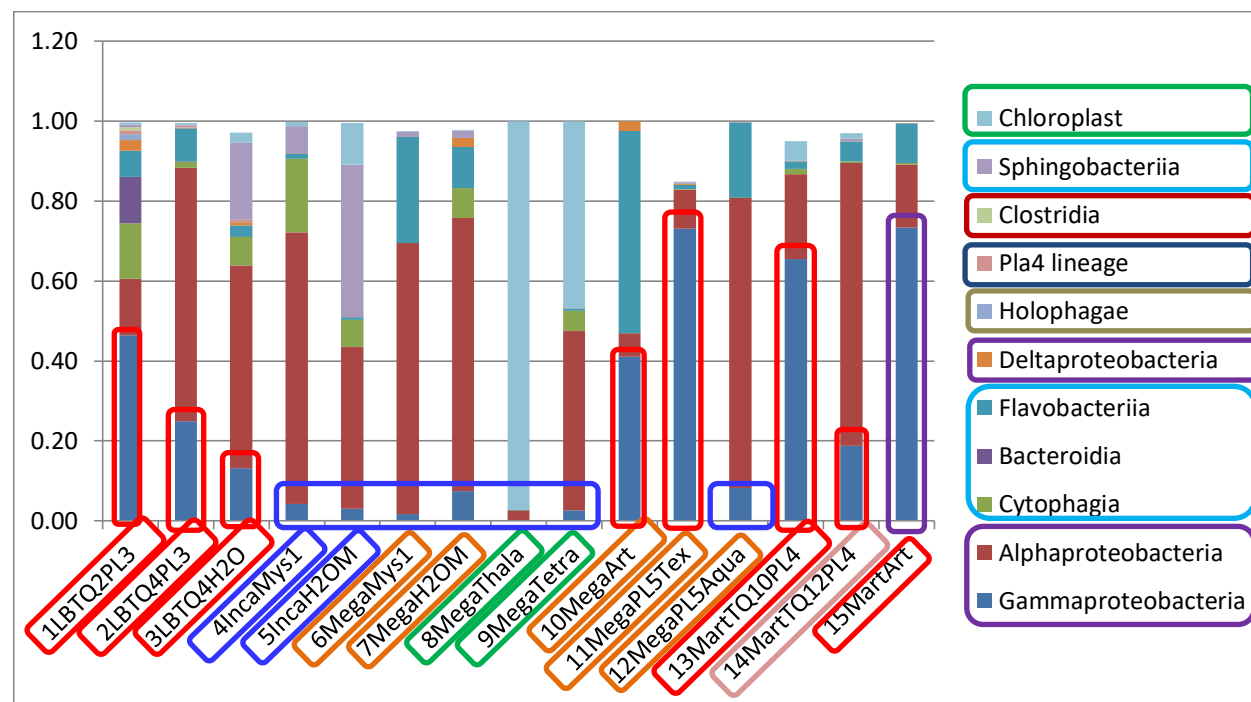
con diferentes niveles de abundancia

(estado saludable o transitorio de saludable a menos saludable).

Miembro de Caulobacterales y Rhizobiales

→ Rol en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre.

Orden distribution





Resultados: Análisis microbiómicos en varios laboratorios, en situaciones con mortalidades.



Gamma-Proteobacterias:

Cellvibrionales (Cellvibrionaceae “Simiduia”)

Vibrionales

- *V parahaemolyticus*, - *V vulnificus*,

- *Vibrio spp.* - *Uncult vibrios*

fueron **abundantes en larvas con mortalidades altas**,
así como en **Artemia**.

Alfa-proteobacterias

→ **abundancia variable**

(**Rickettsiales, Sphingomonadales “Killioniaceae”**)

solo con mortalidad severa.

Delta-Proteobacterias:

Bdellovibrionales (Bdellovibrionaceae),

Bradymonadales, (bact. No cultiv.)

→ **en larvas enfermas**, **microalgas**, **agua** y **Artemia**.

Artemia

→ **Vector de vibrios en todo el ciclo de cultivo**

→ **Fuente de inoculación**

→ **El vibrio se acumula**

umbral → **síntesis de toxinas.**

En tanques con blanqueamiento de larvas

Se detectaron los genes de toxinas PirAB.

Vibrios = Bact. tipo r (con rápido crecimiento)

Su Acumulación en presencia nutrientes

(**materia orgánica**) → **DISBIOSIS**

al reducir las cargas de bacterias k

(**bact. buenas “comensales y probióticos”**).



Análisis microbiómicos en varios laboratorios, en situaciones normales y con mortalidades.



Proteobacterias

Otras familias de Gamma-proteobacterias:

- Halieiaceae,
- Granulosicoccaceae,
- Oceanospirillaceae,

se distribuyeron entre todas las muestras con diferentes niveles de abundancia

Su papel debe ser estudiado, con más trabajos de monitoreo.

Abundancia de Firmicutes

Clostridia con alta abundancia en **Artemia**

Clostridia familia XII y **Fusibacter**,

→ tanques problemas.

Planctomycetes en Laboratorio con mortalidades y asociado con **Verrucomicrobia** (**Roseibacillus**).

Abundancia de Bacteroidetes

Orden **Citofagia** (mayor abundancia = **mysis, agua**)

Algoriphagus, Cyclobacterium, Flexithrix, Marinoscillum
→ en Algas

Flavobacteria (mayor abundancia en **Artemia**, el **agua** y las larvas inoculadas con esta artemia,

Esfingobacterias (transición Eubiosis / Disbiosis)

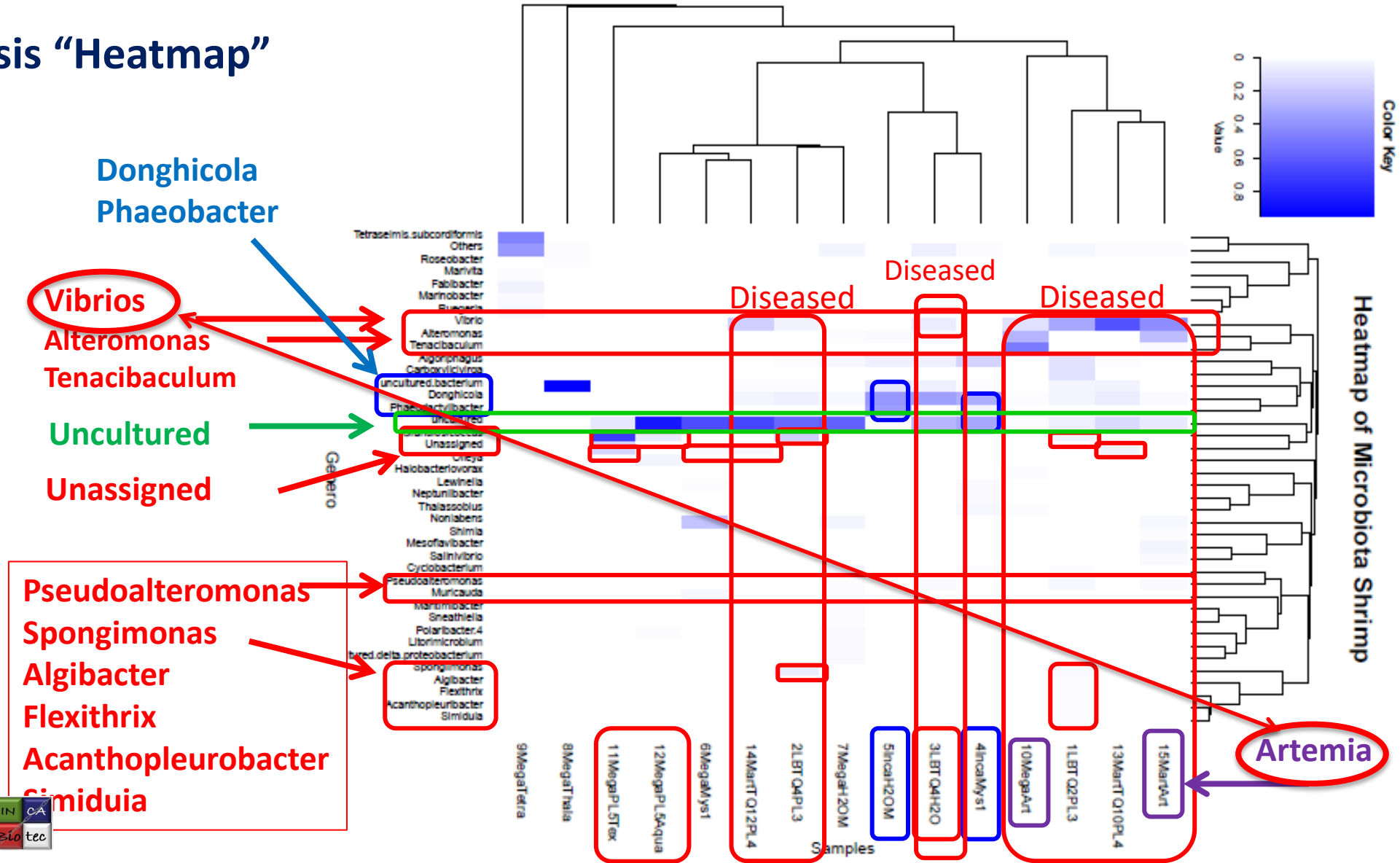
Bacteroidia (Marinilabiaceae “**carboxylicivirga**”)
→ cultivos enfermos.

Con baja abundancia (0.1%):

- **Acidobacteria** (Holophagae and Acanthopleuribacteraceae.)
- **Actinobacteria** (Micrococcales/Microbacteriaceae/Candidatus)
- **Chlorobi** (Chlorobiales)
- **Gracilibacteria**
- **Spirochaetae** (Brevinemataceae)

Análisis metagenómico de bacterias en Laboratorios. (Agua y larvas)

Analysis "Heatmap"





“Microbiómicas como herramientas para una mejor comprensión del balance microbiano y el desarrollo de protocolos de cultivo del camarón bio-seguros.”

- Análisis de la microbiota de ambientes de cultivo y animales en condición de salud y enfermedad, mediante secuenciación y metagenómica.
- Evaluación de la aplicación de microorganismos probióticos específicos.

Análisis metagenómico de la microbiota de *L. vannamei* inoculados con bacterias probióticas

Bioensayos realizados con probióticos

portadores de genes:

- **Lactonase** (anti- quorum-sensing)
- **Bacilysin** (antibacteriano y antifúngico)
- **Subtilin** (lantibiótico = péptido antimicrobiano)
- **Surfactin** (surfactante con actividades antibacteriana, antiviral, antifúngico, antimycoplasma y antihemolítico).



Estación Experimental de Incabiotec SAC



CEBAP:

Centro
Experimental de
Biotecnología en
Acuicultura de
Puerto **P**izarro
Tumbes, Perú-



Ensayo en tanques de producción Perú

1era inoculación de probiótico CA2:

Tanque de eclosión y baldes de nauplius



Inoculaciones siguientes:

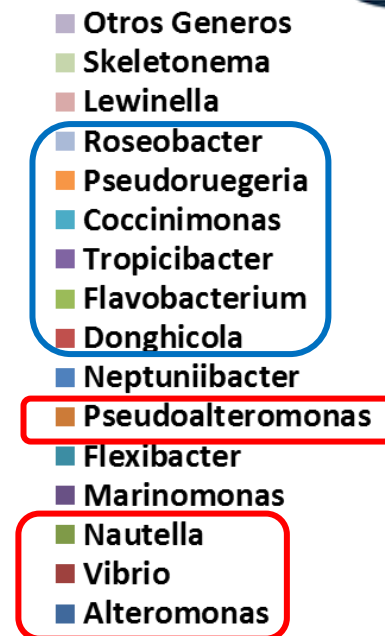
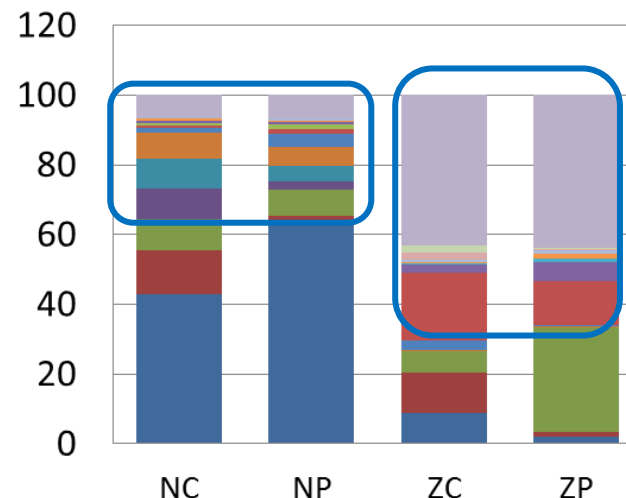
- Zoea 3 a Mysis 1
- Mysis 3 a Pl1
- Dos días antes de la cosecha



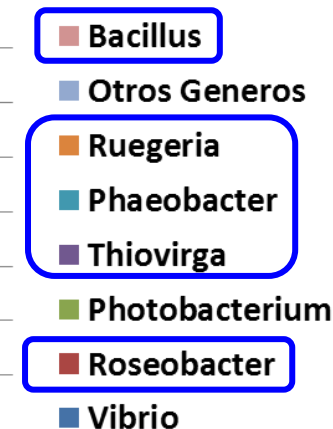
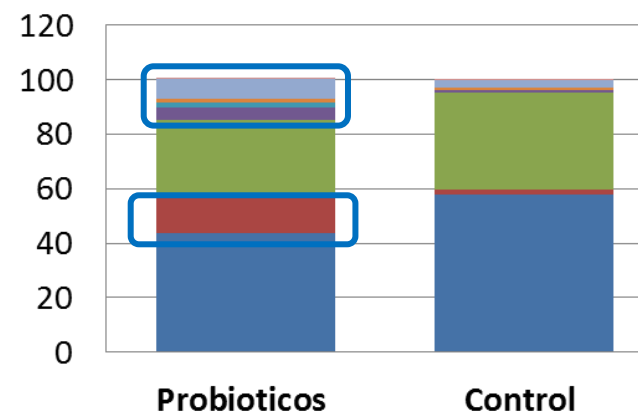
Tanque	Población Inicial	Población Final	Supervivencia
Probióticos	4200000	336000	80%
Control	4200000	252000	60%

Thiovirga sp. = chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium in biofilm

Géneros predominantes en larvas Nauplios y Zoa



Géneros predominantes en PL12





Nueva generación de probióticos



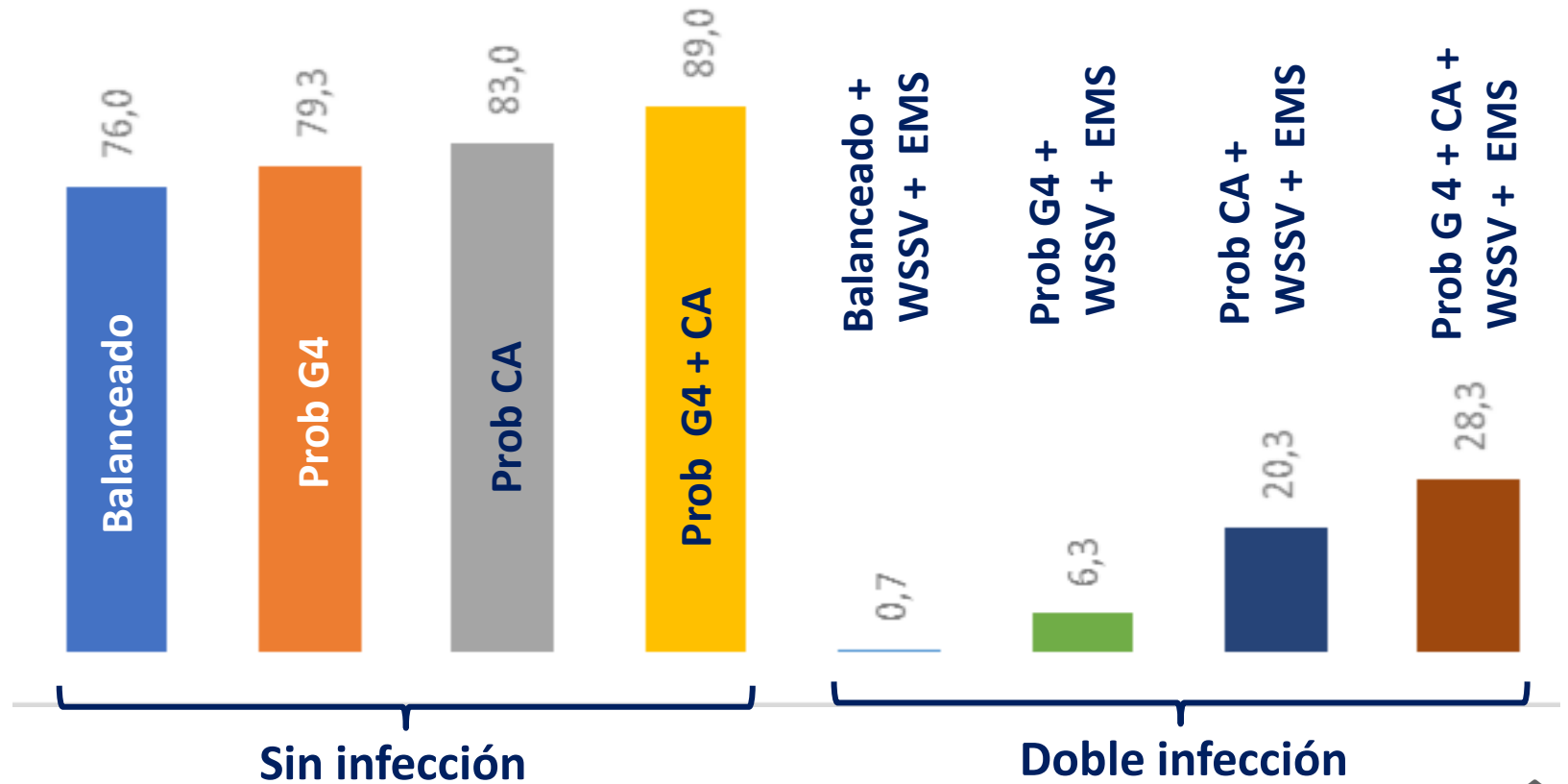
Estudio en la co-infección de WSSV con *V. parahaemolyticus*

→ Factor de riesgo para AHPND en *L. vannamei*.

Bacterias con características

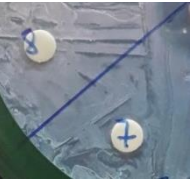
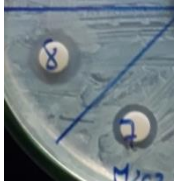
- antimicrobianas,
 - antivirales y
 - bioremediadoras ,
- mostraron su sinergia en relación con la supervivencia en casos de doble infección (bacteria “portadora de PirAB” y virus “WSSV”).

% Supervivencia

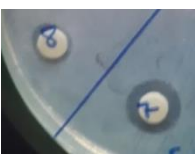


Evaluación de actividades inhibitorias de Ac. Org. contra cepas patógenas y probióticas.

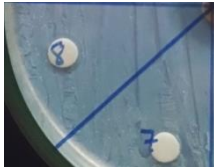
Vibrio harveyii



Vibrio parahaemolyticus



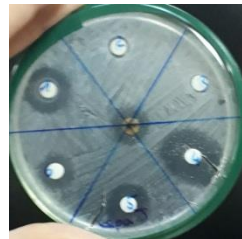
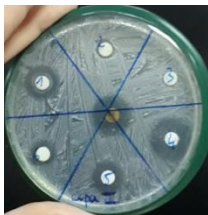
Vibrio sinaloensis



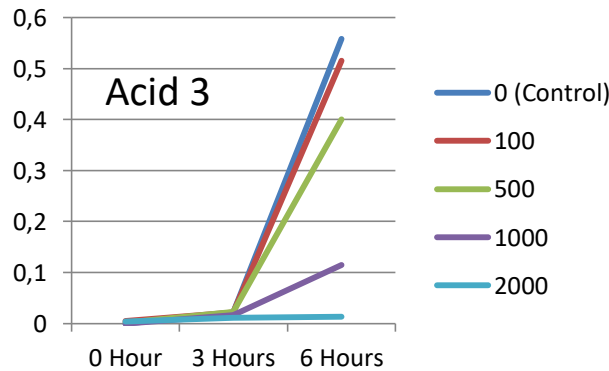
Pseudomonas aeruginosa



Bacillus spp.

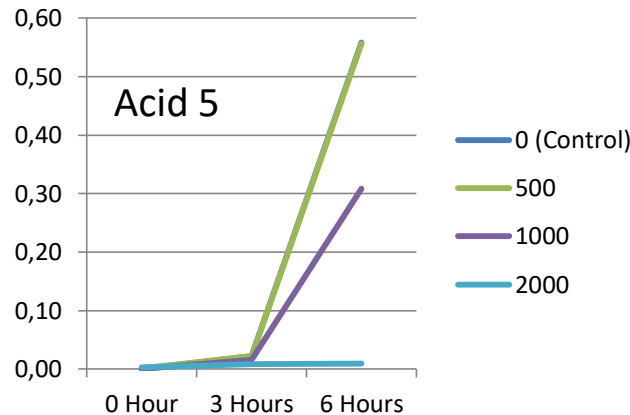


Bacillus spp.

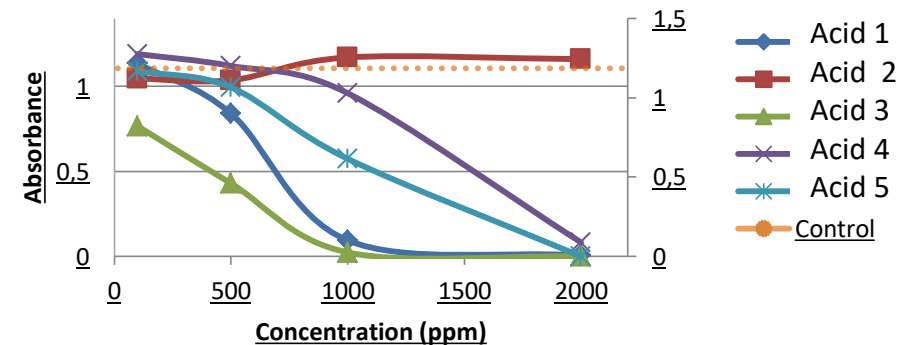


Situaciones a investigar mejor:

- Acción diferencial según las cepas
- Concentraciones sub-óptimas
- Selección de cepas resistentes
- No hay estudio sobre la microbiota global (comensales, biorremediadores, etc.)



Organic acid solutions inoculated with Vibrio parahaemolyticus at 6 hours





Estudios Microbiómicos para una mejor comprensión del balance microbiano y el desarrollo de protocolos de cultivo del camarón bio-seguros.



PROTOSCOLOS DEBEN CONSIDERAR:

Aplicación de Probióticos (Prevención y Biocontrol en alimento, agua y Biorremediación del agua y suelo)

- Cepas biorremediadoras en maduración de agua antes de iniciar el cultivo
- Inoculación temprana (Nauplios) y Agua de tanques donde se va a sembrar los nauplios, PLs
- Frecuencia
- Dosis (ufc/ml de agua o ufc/g de alimento o suelo)
- Con Activación previa o Sin Activación (solo hidratación)

Aplicación de Ácidos Orgánicos

- Tipo / Alimento y,ó Agua / Dosis / Frecuencia

Uso de

- Dietas mejoradas y/o Bioseguras
- Antimicrobianos
- Extractos naturales
- Aceites esenciales

Análisis Multi-MetaÓmicos
de cepas dependiente de cultivo y
no dependientes de cultivo

El balance microbiano debe ser relacionado además con:

- **Parámetros fisicoquímicos del agua,**
- **Estadío de desarrollo,**
- **Época,**
- **Sistema de cultivo, Etc.**



“Herramientas biotecnológicas para el control y prevención de enfermedades en especies acuáticas”

Uso de productos bio-seguros para una mejor prevención de las enfermedades en el camarón *Litopenaeus vannamei*.

- ✓ Reducir riesgos por contaminación de dietas vivas como son Artemia y Microalgas.
- ✓ Reducir riesgos por contaminación de dietas frescas.
- ✓ Dietas microencapsuladas Certificadas Orgánicas Bioseguras.

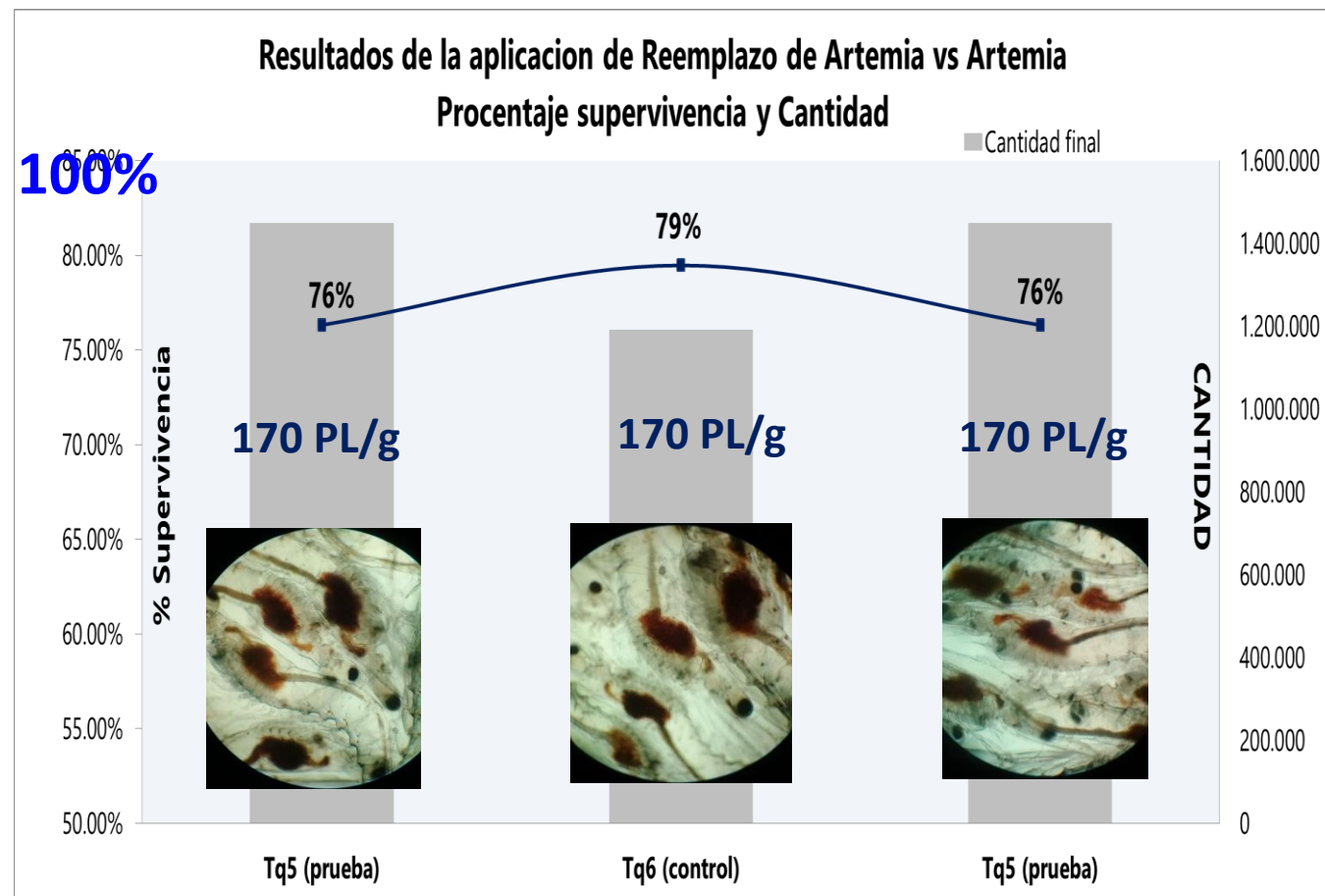
Uso de productos Bio-Seguros

A) Ensayo con reemplazo de Artemia Perfil nutricional que permite reemplazo al 100%

Laboratorio Ecuador, Sept- Oct 2018

DEVELOPMENT OF THE TEST:

- 2 test tanks of 20 MT (TQ5 5 of module 1 & 2).
 - 1 control tank 20MYT (TQ6 of module 1)
 - 1.9 million NV en TQ prueba / 1.5 million NV Control
 - Seed of Nauplii on September 30th 2018,
 - **AR Test started** on October 4th 2018, **in mysis 1**.
- (100% artemia replacement daily at 10 am and 10 pm).



Sistema de alimentación Bio-Seguro en Maduración:

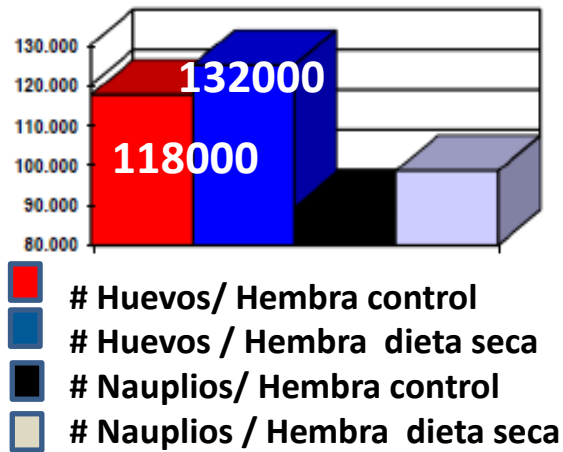
Ensayo Maduración Honduras, 2004.

Control = Balanc.+ Poliqueto/Moluscos + Artemia + Calamar
Prueba = Reemplazo de dieta fresca por 2% de dieta seca + Calamar en 11%.

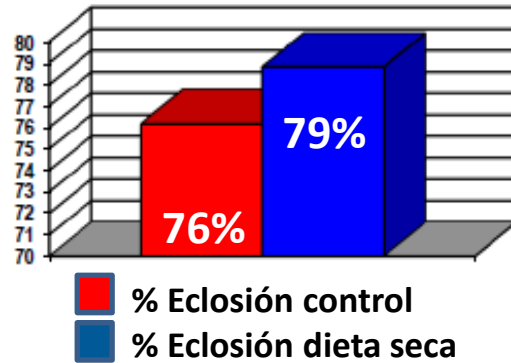
Ensayo Ecuador, 2016.

Reemplazo de dieta fresca por 1% de dieta seca + Calamar en 11%.

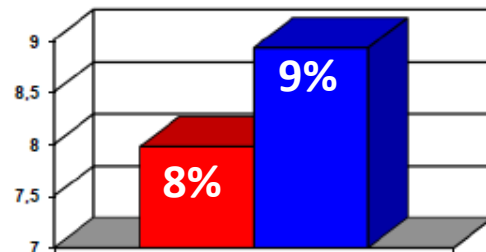
Producción de Huevo & Nauplios



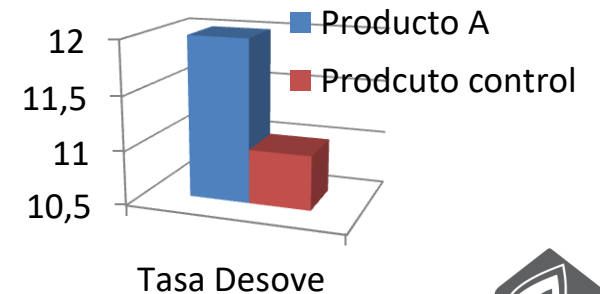
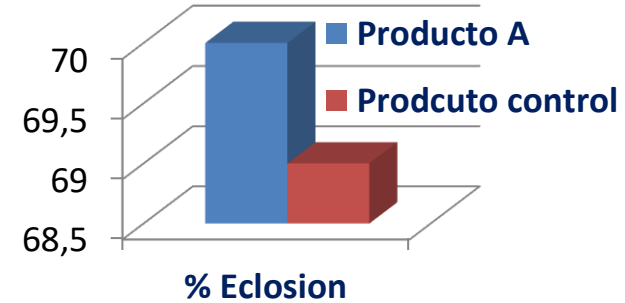
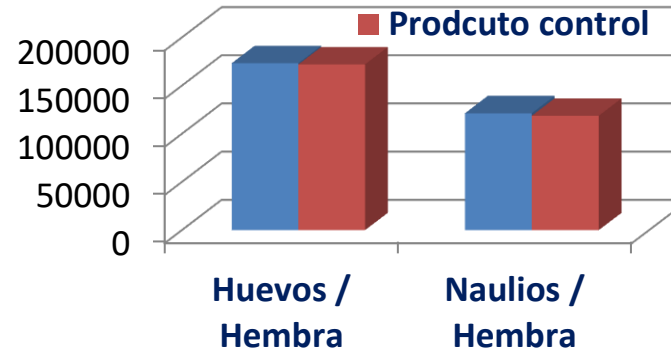
Tasa de Eclosion



Tasa de Desove



Producto A



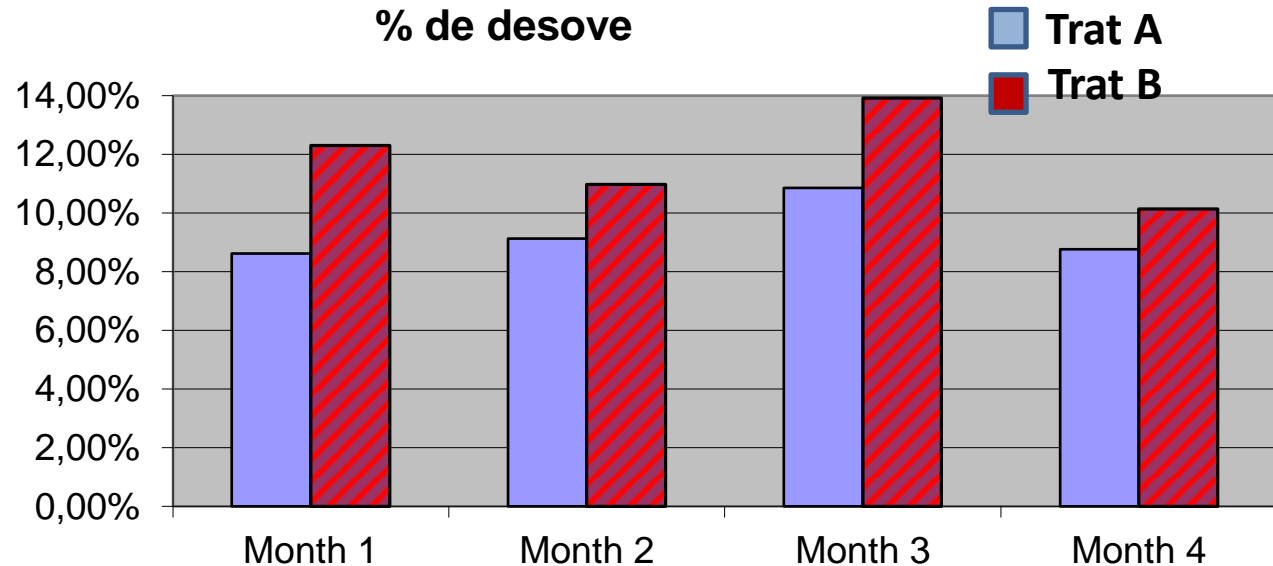
Sistema de alimentación Bio-Seguro en Maduración:

Ensayo Honduras.

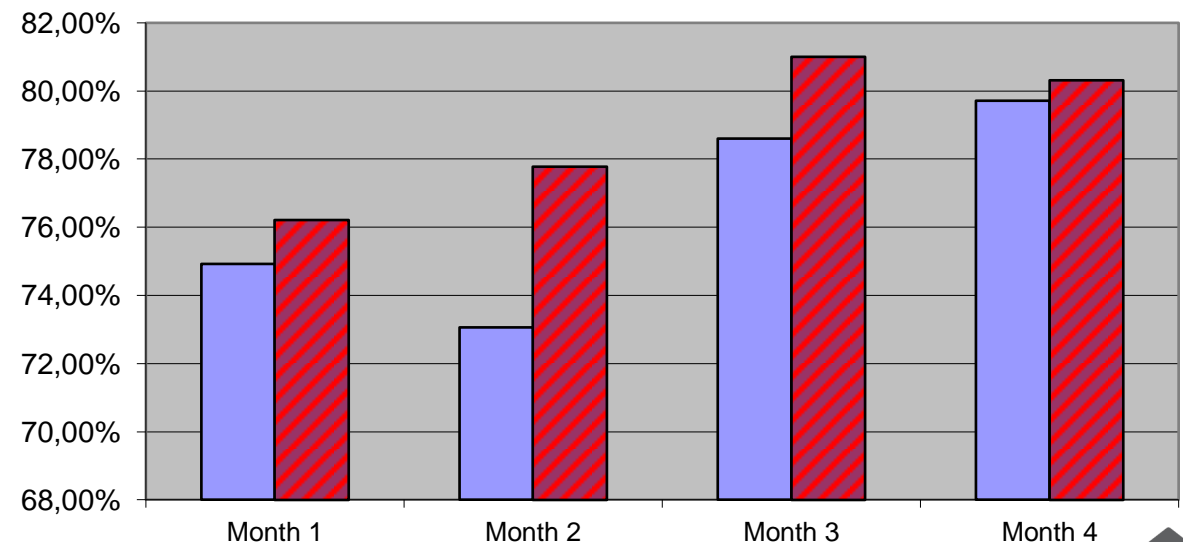
Tratamiento A = Dieta seca 2% + Poliqueto 2% + Biomasa Artemia 2% + Calamar 11%

Tratamiento B = Dieta seca 4% + Calamar 11%

MADURACION 2005-2006, Honduras
% de desove

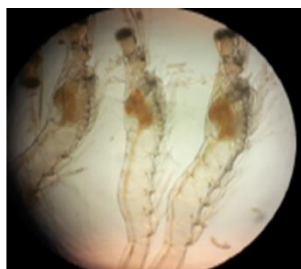


MADURACION 2005-2006, Honduras
% Eclosión

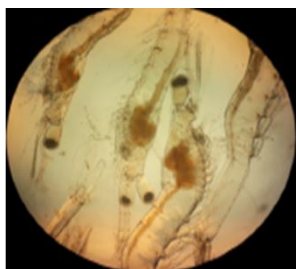


Objeto: Prueba de alimentación con **Microencapsulado** de alto nivel nutricional con **CERTIFICACION ORGANICA** (estadio desde Zoea1 hasta PL9).

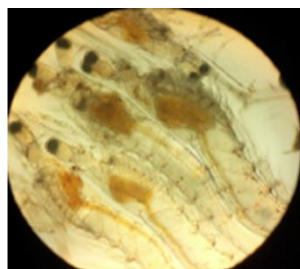
6 tanques de 2TM con 200000 N/Tq
 Dieta prueba: Micro0-50, 50-100, 100-200, 200-300um
 Dieta control : ≠ mezclas de productos (Z, M y PL)
 Microalgas y Artemia a aprtir de mysis 2



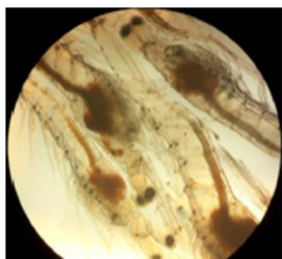
To PL 8, Test Tank 1



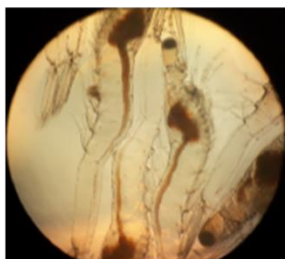
To PL 8, Test Tank 4



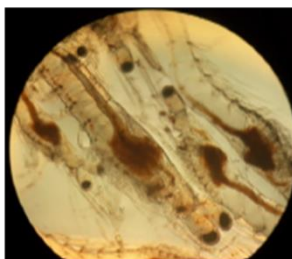
To PL 8, Test Tank 5



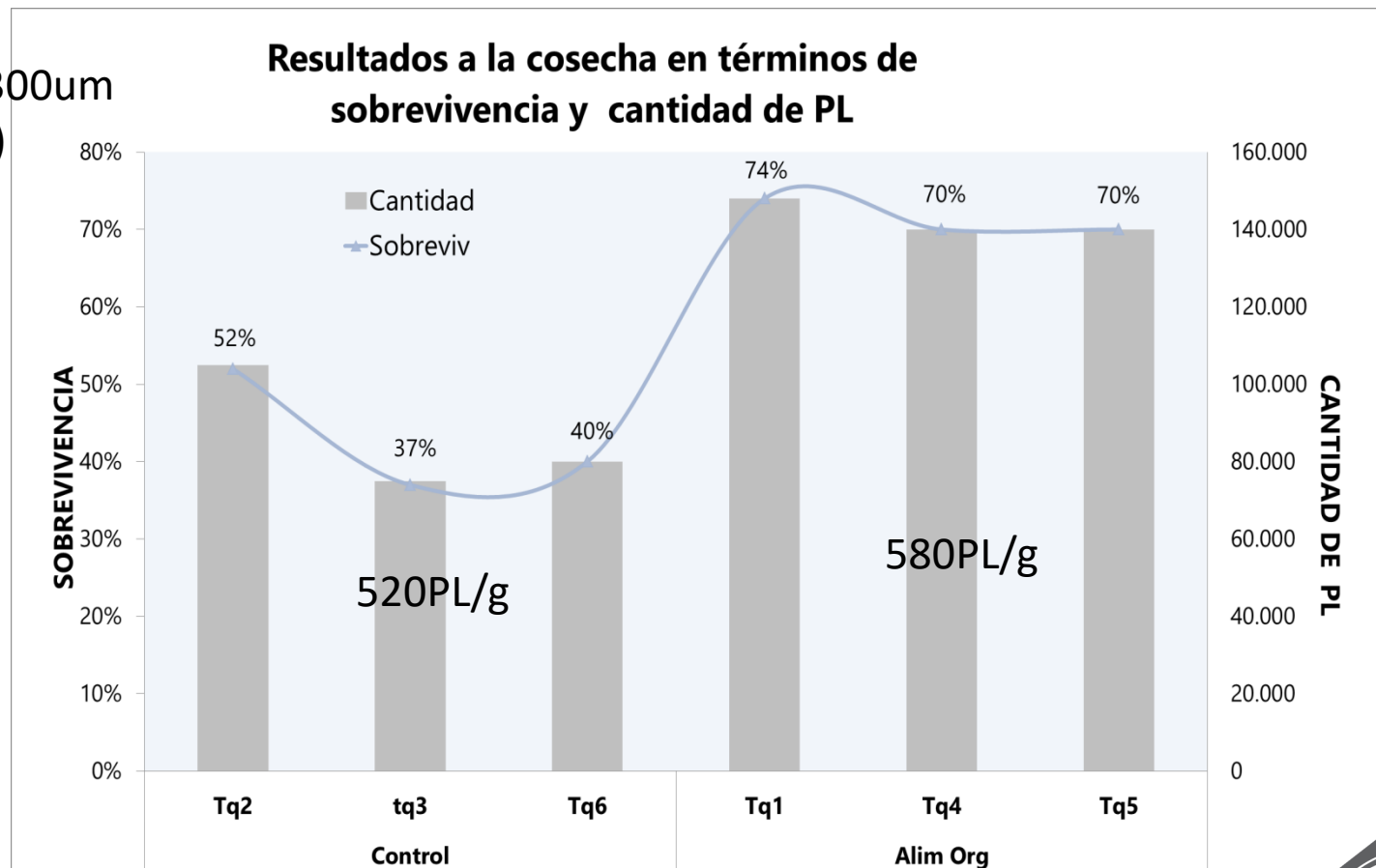
To PL 8, Cont Tank 2



To PL 8, Cont Tank 3



To PL 8, Cont Tank 6



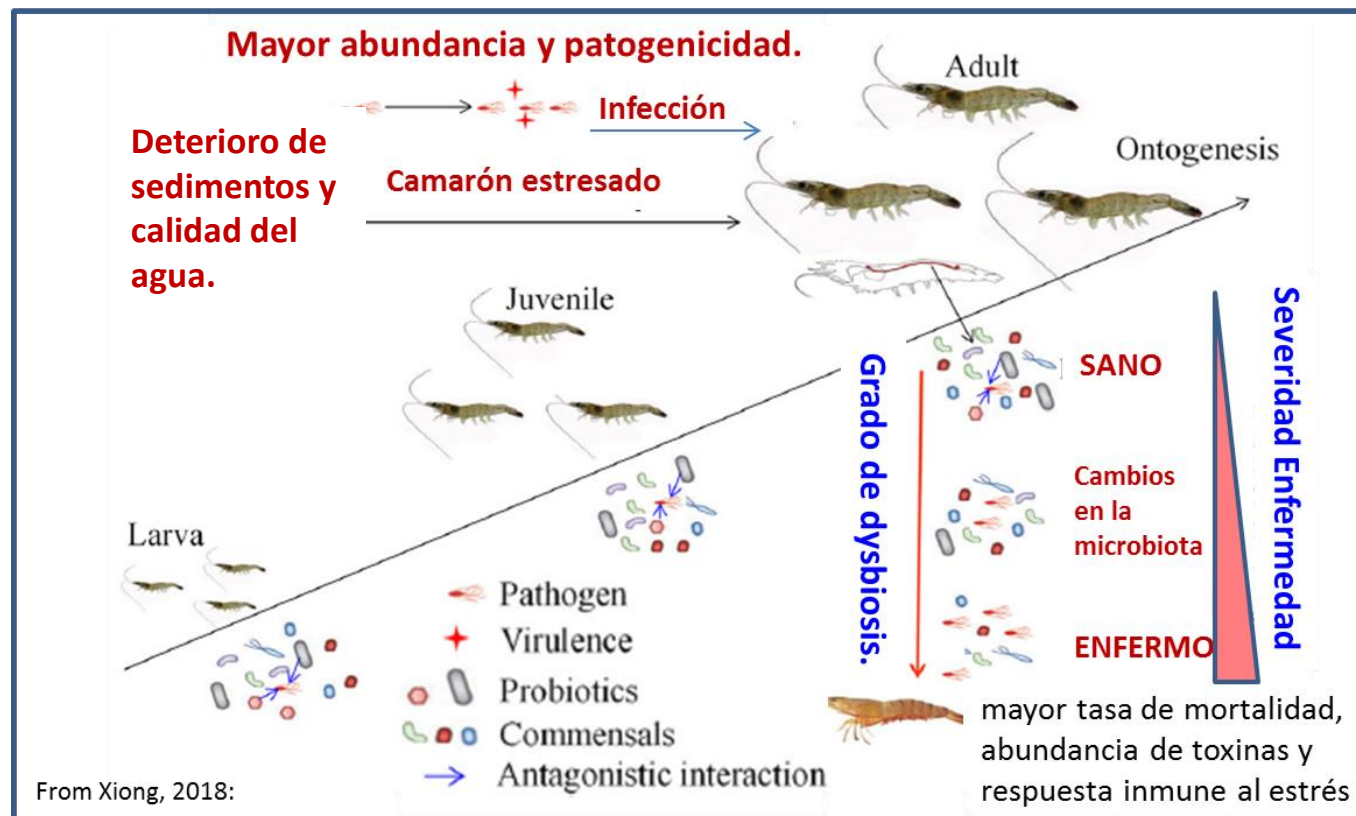
CONCLUSIÓN

Los estudios de metagenómica de la microbiota de *L. vannamei* abre la vía a una **mejor comprensión de las relaciones camarón-bacterias patógenas/probióticas** para la selección de consorcios de probióticos y el correcto uso de productos benéficos.

La comunidad bacteriana asociada con el camarón es altamente dinámica en diferentes estados de salud y etapas de crecimiento.

Prevención y Bioseguridad:

- **Diagnóstico = Certificación**
- **Uso de productos Bio-Seguros**





O FUTURO DA AQUICULTURA ESTÁ NA BIOTECNOLOGIA

A revolução “MicrobiÓmica”

The Science of Survival

OBRIGADO PELA ATENÇÃO

Emmerik Motte, PhD.

Director Investigación y Laboratorio I&D Microbiología

Conceptazul SA Ecuador / Epicore Ecuador Salinas

IncaBiotec SAC (Perú) / Epicore Bionetworks EEUU

motte.emmerik@gmail.com

