



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“METAGENÓMICA DE MICROBIOTA DIGESTIVA EN
Litopenaeus vannamei: RESERVORIO POTENCIAL DE
PATÓGENOS RELEVANTES EN SALUD PÚBLICA”.**

TESIS

QUE PRESENTA

QFB. JESÚS DANIEL LÓPEZ LOERA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR(ES)

DRA. MARÍA ELENA BAÉZ FLORES.

DRA. MARTINA HILDA GRACIA VALENZUELA.

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A **ENERO** DE **2025**.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



U N I V E R S I D A D A U T Ó N O M A D E S I N A L O A

Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia, por el constante apoyo y comprensión que me brindaron en cada una de las etapas de este proyecto. Esto no hubiera sido posible sin mis padres que, desde un inicio, aceptaron mi decisión de realizar un posgrado, se interesaron en la investigación que realicé, además de ofrecerme su ayuda y consejo al toparme con los obstáculos que aparecieron en el camino; igualmente, mis hermanos, quienes comprendieron que mis responsabilidades del posgrado no siempre me permitían acompañarles en algunas convivencias. Por último, y no menos importante, dedico este trabajo a mi abuela, quien ahora descansa en paz; en su momento, me acompañó en la ceremonia de graduación de la Licenciatura y, hoy en día, su recuerdo me acompaña.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación es el resultado de múltiples y diversos esfuerzos, no exclusivos de mi persona, y estos me han permitido llegar a este punto en el que concluyo este posgrado.

Principalmente, agradezco a Dios por permitirme vivir, y por guiarme a este camino lleno de aprendizajes y experiencias, que ahora forman una parte importante de mi vida; también, por brindarme salud (para mí y mis familiares), paciencia, tolerancia, el entendimiento y muchas otras cualidades que se requieren para conllevar, y concluir, esta etapa académica y proyecto de investigación.

De igual manera, estoy profundamente agradecido con mi familia, por apoyarme y tolerarme, por motivarme a continuar y, también, por recordarme cuán importante es que no me rinda. Desde el primer día que me decidí a iniciar esta maestría, ellos han mostrado una gran comprensión en cuanto a tiempos y responsabilidades, relacionadas a este largo, y a su vez corto, trayecto.

Doy gracias a las instituciones que hicieron posible este posgrado: La Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) y la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), porque me han permitido estudiar tanto la licenciatura como esta maestría, siendo un aprendizaje continuo y de calidad; igualmente, le agradezco a CONAHCyT, porque sin el apoyo económico no hubiera podido costearme esta oportunidad, la cual considero que no tiene precio; y no menos importante, le agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de Mazatlán, por recibirme y permitirme usar sus instalaciones y reactivos para realizar la extracción de ADN, además, porque allí mismo se realizó la secuenciación de ADN, por medio del MiSeq de Illumina con el que cuentan.

Agradezco al círculo académico de la FCQB, a los doctores que formaron parte de las clases que se impartieron a lo largo de este posgrado, desde la recomendación para poder ser parte de la maestría, el posterior curso propedéutico, los consiguientes 4 semestres, además de las correspondientes presentaciones, tanto del protocolo, como la de avances de tesis. El camino no ha sido fácil y, por suerte, tampoco ha sido imposible. En muchos momentos dudé el poder aprobar algunas materias, pero con la

guía de los profesores, y la ayuda de mis compañeros maestrantes, pude salir adelante en esta etapa llena de tareas, proyectos, exposiciones y exámenes.

Le doy gracias a mis asesoras de tesis: La Dra. María Elena Báez Flores, y a la Dra. Martina Hilda Gracia Valenzuela, por confiar en mí para este proyecto de investigación, e instruirme a pesar de que carecía de experiencia para muchas de las actividades que se me fueron encomendadas, ofreciéndome paciencia y comprensión en sus instrucciones y guías, además de una constante, y amigable, supervisión, para que no me atrase con el proyecto.

Muchas gracias al personal que ha apoyado en el proceso de este proyecto, y que aún no menciono. Por ejemplo, agradezco al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, por permitirme la estancia en el CIAD de Mazatlán, tanto para la extracción y secuenciación del material genético, así como para estar presente en sus clases. También, agradezco a la M. en C. Julissa Enciso Ibarra, por su guía y capacitación durante mi tiempo en el CIAD, además de su apoyo en la secuenciación del material genético. Muchas gracias al Dr. Erick Josué Navarro Barrón, por su apoyo y guía en el análisis bioinformático, enseñándome a utilizar los softwares empleados durante esta parte de la metodología. Por último, y no menos importante, agradezco a la Dra. Elizabeth Galindo Linares por su apoyo y sugerencias en la interpretación de resultados.

Igualmente, agradezco al Biólogo Andrés García García, encargado de la granja camaronera, que nos acompañó en la recolección de ejemplares de camarón durante los muestreos, apoyando de dicha manera esta investigación.

También le agradezco a la Unidad de Investigaciones en Salud Pública (UISP) por recibirme e incluirme a sus actividades, tanto académicas como sociales. El personal, los doctores investigadores y los estudiantes que le conformaron en el periodo que me correspondió, fueron muy amables y cooperativos cuando necesité apoyo. Un especial agradecimiento a los jóvenes del verano científico, los cuales me acompañaron en la recolección y disección de las muestras, siendo una gran ayuda en estos pasos del proyecto, considerando la cantidad de tiempo y cuidados requeridos para ello.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	13
II. ABSTRACT	14
III. INTRODUCCIÓN	15
IV. ANTECEDENTES.....	17
4.1. <i>Litopenaeus vannamei</i>	17
4.1.1. Generalidades	17
4.1.2. El consumo del camarón	17
4.1.2.1. Valor nutricional.....	17
4.1.2.2. El camarón y la gastronomía	17
4.1.3. Enfermedades transmitidas por el camarón.....	18
4.1.4. Principales grupos bacterianos en la microbiota del camarón.....	19
4.1.4.1. Microbiota intestinal de <i>L. vannamei</i>	19
4.1.5. Perspectiva epidemiológica	19
4.1.5.1. Características de <i>Vibrio</i> spp.	19
4.1.5.2. Vibriosis, una enfermedad transmitida por alimentos (ETA)	20
4.2. Metodologías para el estudio de los microorganismos de importancia en Salud Pública	20
4.2.1. Pruebas moleculares	20
4.2.2. Secuenciación masiva	21
4.3. Antecedentes	22
V. JUSTIFICACIÓN	24
VI. HIPÓTESIS.....	25
VII. OBJETIVOS.....	26
7.1. Objetivo general	26
7.2. Objetivos específicos.....	26
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	27

8.1. Colección de las muestras de camarón	27
8.2. Extracción de intestino y hepatopáncreas de camarón	29
8.3. Extracción de ADN a partir de intestino y hepatopáncreas de camarón.....	31
8.4. Determinación de la pureza, concentración e integridad del ADN	32
8.5. Preparación de la muestra para secuenciación	32
8.5.1. Tagmentación genómica de la muestra y limpieza post tagmentación:	32
8.5.2. Amplificación del ADN tagmentado	33
8.5.3. Limpieza de las bibliotecas	33
8.5.4. Bibliotecas de pools	34
8.6. Secuenciación masiva	35
8.7. Análisis bioinformático	35
8.7.1. Análisis general de las secuencias:	35
8.7.2. Clasificación taxonómica	35
8.7.3. Diversidad taxonómica.....	36
IX. RESULTADOS.....	37
9.1. Secuenciación.....	37
9.2. Clasificación taxonómica.....	37
9.3. Diversidad taxonómica en la microbiota del camarón.....	37
9.3.1. Diversidad taxonómica según el Filo.....	37
9.3.2. Diversidad taxonómica según la Clase	41
9.3.3. Diversidad taxonómica según la Familia	45
9.3.4. Diversidad taxonómica según el Género	49
9.3.5. Diversidad taxonómica según la Especie.....	53
9.4. Análisis multivariados.....	57
9.4.1. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Phylum.....	57
9.4.2. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Clase	60
9.4.3. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Familia	63
9.4.4. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Género.....	66
9.4.5. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Especie	69
9.4.2. Análisis Permutacional de Varianza (PERMANOVA)	74
9.4.3. Análisis de Similitud (ANOSIM).....	76
9.4.4. Análisis de Similitud Porcentual (SIMPER)	78

X. DISCUSIÓN	80
10.1. <i>Ascomycota</i> como la clase más abundante	80
10.2. Análisis de α -Diversidad.....	80
10.2.1. Índices de Dominancia y Shannon en Phylum	80
10.2.2. Índices de Dominancia y Shannon en Clase	82
10.2.3. Índices de Dominancia y Shannon en Familia	83
10.2.4. Índices de Dominancia y Shannon en Género	84
10.2.5. Índices de Dominancia y Shannon en Especie	85
XI. CONCLUSIONES	87
11.1 Conclusión general	87
11.2 Conclusiones específicas	87
XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	88
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	89
XIV. ANEXOS	94
14.1. Productos Académicos	94
XV. SIGLAS Y ABREVIATURAS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Resumen de muestreos y preparación de tubos Falcon con pools	28
2	Extracción de Hepatopáncreas e Intestinos de camarón	30
3	Clasificación taxonómica (Phylum)	38
4	Clasificación taxonómica (Phylum) en Hepatopáncreas	39
5	Clasificación taxonómica (Phylum) en Intestinos	40
6	Clasificación taxonómica (Clase)	42
7	Clasificación taxonómica (Clase) en Hepatopáncreas	43
8	Clasificación taxonómica (Clase) en Intestinos	44
9	Clasificación taxonómica (Familia)	46
10	Clasificación taxonómica (Familia) en Hepatopáncreas	47
11	Clasificación taxonómica (Familia) en Intestinos	48
12	Clasificación taxonómica (Género)	50
13	Clasificación taxonómica (Género) en Hepatopáncreas	51
14	Clasificación taxonómica (Género) en Intestinos	52
15	Clasificación taxonómica (Especie)	54
16	Clasificación taxonómica (Especie) en Hepatopáncreas	55
17	Clasificación taxonómica (Especie) en Intestinos	56
18	Gráfico de dispersión (Phylum)	59
19	Gráfico de dispersión (Clase)	62
20	Gráfico de dispersión (Familia)	65
21	Gráfico de dispersión (Género)	68
22	Gráfico de dispersión (Especie)	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Phylum	58
2	Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Clase	61
3	Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Familia	64
4	Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Género	67
5	Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Especie	70
6	Componentes Principales de los diferentes niveles taxonómicos	73
7	Resultados del análisis PERMANOVA en los diferentes niveles taxonómicos	75
8	Resultados de ANOSIM en diferentes niveles taxonómicos	77
9	Resultados de SIMPER	79

I. RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son un gran reto para todos los sistemas de salud del mundo. El camarón es uno de los productos más consumidos en el mundo, y en su microbiota puede albergar microorganismos causantes de ETAs. Cada año, en EE. UU., 48 millones de personas sufren de estas enfermedades, originando 15,600 millones de dólares en pérdidas económicas. A pesar de la importancia de las ETAs en salud pública, son escasos los estudios en microbiota de camarón, consumidos y producidos en Sinaloa. En este proyecto se investigó la diversidad taxonómica y composición de microbiota digestiva en camarón blanco de Sinaloa mediante metagenómica tipo *shotgun* para generar información sobre posibles microorganismos de importancia en salud pública.

Se estudió el intestino y hepatopáncreas de camarones de una granja de Navolato, Sinaloa. La extracción del ADN se realizó por el método de CTAB. La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina MiniSeq utilizando el kit *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* y lecturas *paired-end* y un formato de 2x1. Respecto al análisis bioinformático, se usó el programa Kraken2 para la clasificación taxonómica de las lecturas. Se analizó la diversidad taxonómica con enfoque en los índices de Shannon y de dominancia de Simpson por medio de PAST (v.4.03). Asimismo, se realizaron análisis de PCA, PERMANOVA, ANOSIM y SIMPER.

La diversidad en la microbiota digestiva de camarón varió de moderada a alta en cada nivel taxonómico estudiado (Phylum, Clase, Familia, Género y Especie), sin presencia de taxones dominantes. Los taxones con mayor abundancia en cada nivel taxonómico fueron *Fungi*, *Pseudomonadota* y *Bacillota* (Phylum); *Ascomycota*, *Gammaproteobacteria* y *Aconoidasida* (Clase); *Saccharomycetales*, *Plasmodiidae* y *Bartonellaceae* (Familia); *Plasmodium*, *Saccharomycetaceae* y *Bartonella* (Género); *Bartonella krasnovii*, *Saccharomyces* spp. y *Dictyostelium discoideum* (Especie). Se encontraron microorganismos de importancia en salud pública, como *Vibrio parahaemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida* spp., entre otros que pudieran representar un riesgo para la salud de personas inmunocomprometidas.

(Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*; metagenómica por *shotgun*; *Vibrio* spp.).

II. ABSTRACT

Foodborne diseases (FBDs) constitute a significant challenge for all health systems worldwide. Shrimp is one of the most consumed aquatic products in the world, and its microbiota can harbor potential microorganisms that cause FBDs. In the United States, 48 million individuals suffer from these diseases each year, causing 15.6 billion dollars in economic losses. Despite the importance of FBDs in public health, studies on the microbiota of shrimp produced for consumption in Sinaloa are scarce. This study investigated the taxonomic diversity and composition of the digestive microbiota in white shrimp from Sinaloa using shotgun metagenomics to generate information on possible microorganisms of public health relevance.

The intestine and hepatopancreas of shrimps from a Navolato, Sinaloa farm were studied. DNA extraction was performed using the CTAB method. DNA sequencing was performed on Illumina MiniSeq platform using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit with a 2x150 bp paired-end strategy. The Kraken2 program performed taxonomic classification, whereas taxonomic diversity was analyzed using PAST (v.4.03) through Shannon and Simpson's dominance indices. Moreover, PCA, PERMANOVA, ANOSIM, and SIMPER analyses were also performed.

The diversity in the digestive microbiota of shrimp varied from moderate to high at each taxonomic level studied (Phylum, Class, Family, Genus, and Species), with no dominant taxa presence. The most abundant taxa at each taxonomic level were *Fungi*, *Pseudomonadota*, and *Bacillota* (Phylum); *Ascomycota*, *Gammaproteobacteria*, and *Aconoidasida* (Class); *Saccharomycetales*, *Plasmodiidae*, and *Bartonellaceae* (Family); *Plasmodium*, *Saccharomycetaceae*, and *Bartonella* (Genus); *Bartonella krasnovii*, *Saccharomyces* spp., and *Dictyostelium discoideum* (Species). Microorganisms of public health relevance were found, such as *Vibrio parahaemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Candida* spp., among others, which could represent a health risk for immunocompromised individuals.

(Keywords: *Litopenaeus vannamei*; shotgun metagenomics; *Vibrio* spp.).

III. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas son la causa del 90% de los problemas de salud, afectando a 600 millones de personas en todo el mundo, y siendo responsables del 32% de las muertes globales, es decir, alrededor de 14 millones de personas (Aguilar, 2022). Además, generan pérdidas de 33 millones de años de vida saludable y, en el caso de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), una inversión anual de más de 15 mil millones de dólares para su tratamiento (Aguilar, 2022).

Las ETAs son un gran reto para los sistemas de salud de todo el mundo. Por ejemplo, en EE. UU. alrededor de 48 millones de personas sufren de ETAs cada año debido al consumo de alimentos contaminados con patógenos microbianos o sus toxinas, derivándose en 128 mil hospitalizaciones, 3 mil muertes y 15,600 millones de dólares en pérdidas económicas (Ali et al., 2020). Los patógenos bacterianos son la causa principal de un gran número de enfermedades alimentarias, así como también de la mayor cantidad de hospitalizaciones (63.9%) y defunciones (63.7%) (Ali et al., 2020).

A nivel mundial, el camarón tiene una alta demanda y su comercio provee el escenario ideal para la diseminación internacional de patógenos resistentes a antimicrobianos (Bintsis, 2017; Durán & Marshall, 2005). La microbiota del camarón puede albergar bacterias de relevancia clínica que, mediante el consumo de este crustáceo, logran alcanzar al ser humano y causar infecciones de difícil tratamiento, destacando *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, miembros del género *Salmonella* e inclusive grupos patogénicos de *Escherichia coli* (Bintsis, 2017; Afreen & Ucak, 2021; Barbosa et al., 2016). Particularmente, *V. parahaemolyticus* causa un cuadro gastrointestinal que cursa con diarrea, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos, mientras que, en pacientes inmunocomprometidos este cuadro puede complicarse a septicemia, reportándose tasas de mortalidad hasta del 44% (Martín del Burgo, 2021). Respecto a su transmisión, esta se encuentra asociada principalmente al consumo de mariscos crudos y agua no tratada (Gilmour et al. 2011).

Actualmente, el ADN de todos los microorganismos presentes en una comunidad microbiana, incluso aquellos no cultivables bajo condiciones de laboratorio, se puede extraer y secuenciar directamente sin amplificación previa (Kunin et al., 2008; Wooley et al., 2010). La recuperación y secuenciación completa del material genético extraído de los microorganismos provenientes de cualquier muestra ambiental o entorno se denomina metagenoma, mientras que el análisis de éste se conoce como metagenómica (Raza & Shahid, 2020). Es mediante la técnica de metagenómica tipo *shotgun* que se logra caracterizar de manera más amplia y en un solo experimento la diversidad y estructura de la comunidad microbiana en estudio, así como el papel funcional de cada miembro que le compone, ya que no sólo considera agentes procariontes, sino que también la interacción global con virus, hongos y parásitos (Kunin et al., 2008; Wooley et al., 2010).

Estudios metagenómicos internacionales sobre la microbiota de *Litopenaeus vannamei* reportaron como filos bacterianos dominantes a *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericutes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* en intestino del crustáceo (Cheng et al., 2021). En hepatopáncreas se ha reportado que su comunidad estructural está dominada por los clados: *Vibrionaceae*, *Entomoplasmatales* y *Rhizobiaceae* mientras que, en el intestino dominan *Vibrionaceae*, *Entomoplasmatales*, *Rhizobiaceae* y *Mycoplasmataceae* (Shan et al., 2024). En otro estudio, los géneros más abundantes fueron *Candidatus Xiphinematobacter*, *Propionigenium*, *Synechococcus*, *Shewanella* y *Cetobacterium* (Zeng et al., 2017). En Sinaloa, en nuestro conocimiento, sólo existe un estudio metagenómico de camarón en el que secuenciaron las regiones V3 y V4 del gen 16S del ARN ribosomal, encontrando a *Proteobacteria* como el filo más abundante, mientras que, *Cyanobacteria* fue más abundante en intestino (García-López et al., 2020). En Sinaloa no se ha hecho un estudio empleando metagenómica por *shotgun* para conocer la microbiota digestiva del camarón en las condiciones de cultivo. El objetivo de este proyecto fue conocer la composición y diversidad taxonómica del microbioma intestinal y de hepatopáncreas de *L. vannamei* cultivado en una granja sinaloense, así como investigar la presencia de microorganismos patógenos de importancia en salud pública en el microbioma digestivo del camarón.

IV. ANTECEDENTES

4.1. *Litopenaeus vannamei*

4.1.1. Generalidades

Litopenaeus vannamei es nativo del océano Pacífico, ocupa una extensión territorial que abarca desde las costas de Sonora, México, hasta Tumbes, Perú; habiéndose introducido en las costas del Golfo de México gracias a la actividad acuícola (DOF, 2021). *L. vannamei* fue la especie marina con mayor producción en el año 2020, con un total de 5.8 millones de toneladas en peso vivo, representando el 51.7% del total entre los crustáceos, y suponiendo ganancias de 24,700 millones de USD (FAO, 2022).

4.1.2. El consumo del camarón

4.1.2.1. Valor nutricional

La producción a nivel mundial de *L. vannamei* tiene que ver con la elevada demanda que existe de este producto (López et al., 2022). Además, ya sea fresca o procesada, esta especie de camarón destaca debido a su valor nutricional, pues al igual que todos los crustáceos, posee un alto contenido de proteínas y es una fuente significativa de vitaminas, como la vitamina B12 y la vitamina E; una ración media de camarón aporta casi la mitad del requerimiento diario de colesterol (López et al., 2022). Por otro lado, la harina que se produce a base en este crustáceo tiene una alta actividad antioxidante, por ello su importancia para la promoción de la salud nutricional de los consumidores (López et al., 2022).

4.1.2.2. El camarón y la gastronomía

Diversas comunidades costeras, como la del noroeste del Pacífico Mexicano, acostumbran el consumo de mariscos ya sea en presentación fría (crudos o curtidos) o caliente (cocidos o empanizados), por lo que el consumo de estos productos forma parte de la gastronomía tradicional regional y cuyos platillos son reconocidos nacional e internacionalmente (Grano-Maldonado y Mendieta-Vega, 2019).

Cada año millones de turistas provenientes de países desarrollados tienen como destino turístico las regiones tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo, donde disfrutan de los platillos a base de mariscos (Leyva-López et al., 2020). Entre estos, destacan todos aquellos que incluyen el camarón como ingrediente principal, como el ceviche, el aguachile, el coctel de camarón, los mariscocos y los camarones empanizados (Leyva-López et al., 2020; Flores, 2021).

Por otra parte, el camarón crudo o cocido, también se utiliza en diversas presentaciones tipo sushi, platillo que se ha popularizado en años recientes en diversos países (Morillo, 2021). Sin embargo, dada la elevada preferencia que la población en general tiene por el consumo de mariscos y camarón, representa un riesgo para la salud humana ya que la microbiota que estos crustáceos albergan puede causar síndromes gastrointestinales (Chen et al., 2023).

4.1.3. Enfermedades transmitidas por el camarón

De acuerdo con la OMS, las enfermedades infecciosas son la causa del 90% de los problemas de salud, afectando a 600 millones de personas en todo el mundo, y siendo responsables del 32% de las muertes globales, es decir, alrededor de 14 millones de personas (Aguilar, 2022). Además, generan pérdidas de 33 millones de años de vida saludable y, en el tratamiento de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), una inversión de 15,000 millones de dólares anualmente (Aguilar, 2022).

Las enfermedades alimentarias son un gran reto para los sistemas de salud de todo el mundo. Por ejemplo, en EE. UU. alrededor de 48 millones de personas sufren de ETAs cada año debido al consumo de alimentos contaminados con patógenos microbianos o con toxinas microbianas, derivándose en 128 mil hospitalizaciones, 3 mil muertes y 15,600 millones de dólares en pérdidas económicas (Ali et al., 2020). Los patógenos bacterianos son la causa principal de un gran número de enfermedades alimentarias, así como también de la mayor cantidad de hospitalizaciones (63.9%) y defunciones (63.7%) (Ali et al., 2020).

Debido al consumo del camarón, diversos patógenos causan enfermedades en el ser humano, y entre estos destacan *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* (Bintsis, 2017), así como las infecciones por *Salmonella* (Afreen & Ucak, 2021).

4.1.4. Principales grupos bacterianos en la microbiota del camarón

4.1.4.1. Microbiota intestinal de L. vannamei

El 80% de los estudios sobre microbiota de *L. vannamei* se han realizado en intestino; la estructura más estudiada de este crustáceo (Garibay et al., 2020). El intestino del camarón posee una gran diversidad bacteriana, lo que también puede tener implicaciones en su desarrollo. En general, las familias bacterianas más predominantes en el tracto intestinal de los miembros pertenecientes a la familia *Penaeidae* son *Mollicutes*, *Rhodobacteraceae* y *Vibrionaceae* (Garibay et al., 2020).

4.1.5. Perspectiva epidemiológica

4.1.5.1. Características de Vibrio spp.

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos ligeramente curvos, Gram negativos, exclusivas de entornos marinos y de tolerancia de salinidad variable (Nag et al., 2020). Estas bacterias tienen preferencia por climas cálidos, como las regiones en donde son endémicas. (Nag et al., 2020). Independientemente de que sean patógenas o no, estas bacterias poseen dos cromosomas circulares. De estos, el primero presenta un mayor nivel de conservación de genes, con un tamaño aproximado de 3 Mb, codificando la mayoría de las proteínas esenciales (Nag et al., 2020). Por otra parte, el segundo cromosoma posee una mayor variabilidad génica y codifica, principalmente, proteínas accesorias de funcionalidad diversa (Nag et al., 2020).

En las últimas décadas, *V. parahaemolyticus* ha evolucionado desde un patógeno esporádico, hasta convertirse en un patógeno endémico. Entre los factores que han contribuido a este fenómeno están la globalización, la introducción de especies marinas para su producción y consumo, los cuales son reservorios principales de esta bacteria, así como el aumento de la temperatura y el nivel del mar en diferentes regiones del mundo debido al cambio climático. Todo esto ha

favorecido la diseminación y la emergencia de *V. parahaemolyticus* en nuevos entornos, tanto marinos como costeros (Martín del Burgo, 2021).

4.1.5.2. Vibriosis, una enfermedad transmitida por alimentos (ETA)

Los estudios con enfoque en el turismo han determinado que entre los millones de viajeros con destino a zonas tropicales, como América Latina y África, aproximadamente la mitad de estos desarrollan algún síndrome diarreico debido a las condiciones en la que alimentos y bebidas son servidos y consumidos (Leyva-López et al., 2020). En México, los datos epidemiológicos de pacientes con cuadros clínicos provocados por el consumo de alimentos son escasos. Sin embargo, los reportes en los países de origen de los turistas indican que los casos de infección han ido aumentando, al mismo tiempo que la popularidad de los mencionados destinos turísticos y el consumo de sus platillos por los turistas (Leyva-López et al., 2020).

La vibriosis humana se debe en gran medida a malas prácticas en la manipulación de alimentos, la utilización de agua de mar para la cocción propia del alimento, así como al consumo de moluscos, crustáceos y pescados crudos o con cocción insuficiente (Martín del Burgo, 2021). *V. parahaemolyticus* tiene una dosis infectiva de 2×10^5 - 3×10^7 células bacterianas, y ocasiona un cuadro gastrointestinal limitado de baja tasa de mortalidad (5%), donde se manifiesta con diarrea, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos, principalmente. En caso de no requerir hospitalización, su tratamiento consiste en rehidratación. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, este cuadro puede complicarse a septicemia, reportándose tasas de mortalidad cercanas al 44% (Martín del Burgo, 2021).

4.2. Metodologías para el estudio de los microorganismos de importancia en Salud Pública

4.2.1. Pruebas moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular capaz de amplificar fragmentos de ADN siguiendo una serie de ciclos y patrones de temperatura para la desnaturalización, la hibridación y la extensión de la secuencia de ADN de interés (Rodríguez et al., 2023).

Si bien, la PCR es sensible y específica, y sólo requiere una baja concentración de ADN para la posible detección del material genético de nuestro microorganismo de interés (Rodríguez et al., 2023); tiene como desventaja que sólo permite estudiar un número limitado de secuencias génicas por corrida (Cortés-López et al., 2020). Además, se ha destacado que en muestras alimentarias, clínicas y ambientales existen compuestos que son inherentemente acarreadas durante el proceso de obtención de muestra o durante la extracción de ácidos nucleicos que pueden inhibir la reacción de PCR, y conducir a una subestimación en la carga bacteriana y en falsos negativos (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014).

4.2.2. Secuenciación masiva

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) están diseñadas para secuenciar una gran cantidad de segmentos de ADN paralelamente. Inicialmente, se emplearon para detectar variantes de un único nucleótido, pero han seguido desarrollándose e implementándose para prevenir, diagnosticar, tratar y vigilar un amplio espectro de enfermedades crónicas, genéticas, e infecciosas (Rubio et al., 2019). Los estudios de secuenciación masiva ofrecen secuencias de alta calidad con una longitud que varía de 500 a 1000 pb, suficiente para un análisis de marcadores filogenéticos (Cortés-López et al., 2020).

La metagenómica consiste en el estudio de todos los genomas presentes en una comunidad microbiana, y se utiliza para estudiar los microorganismos que conforman el microbioma de seres vivos de interés (Hurtado, 2022) de acuerdo con el enfoque de la investigación. Los estudios metagenómicos son posibles gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva y al avance de las plataformas bioinformáticas (Hurtado, 2022).

Para una mayor resolución a nivel taxonómico, existe la opción de *Whole Genome Shotgun Sequencing* (WGSS), permitiendo la secuenciación de la totalidad del ADN en una muestra compleja; no sólo permite la identificación de procariotas, sino también de eucariotas, sin necesidad de un paso previo de amplificación; la información taxonómica obtenida por el método *shotgun* proporciona información hasta el nivel de especies (Cortés-López et al., 2020). En cuanto a desventajas,

estos análisis son costosos y su análisis computacional es intensivo (Rezasoltani, 2020).

4.3. Antecedentes

La investigación realizada por Cheng et al. (2021) en China determinó que los grupos bacterianos dominantes en los intestinos del camarón blanco pertenecen a los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericutes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Entre las muestras de una región a otra, estos autores reportaron variaciones en la microbiota intestinal de *L. vannamei*, pero en general determinaron que ésta posee gran relevancia en el metabolismo y procesamiento de información genética, tanto del organismo como de su entorno (Cheng et al., 2021).

En otro estudio, He et al. (2020) encontraron una estrecha correlación entre la microbiota intestinal y la microbiota ambiental, tanto en función como en estructura. El filo predominante resultó *Proteobacteria* contribuyendo significativamente a la comunicación dentro de la microbiota (He et al. 2020).

En un estudio de Corea del sur se identificó el microbioma y resistoma en muestras ambientales de granjas camaroneras y aguas costeras. Se encontraron 22 genes de resistencia contra varios compuestos, incluyendo antimicrobianos, metales y biocidas (Seong et al., 2021). Entre los genomas ensamblados a partir de los metagenomas recuperados (MAGs), los filos más abundantes fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidota* y *Actinobacteriota* (Seong et al., 2021).

En un estudio realizado por Shan et al. (2024) se analizaron los datos de secuenciación del microbioma de más de 378 camarones y reportaron que la comunidad estructural de hepatopáncreas estaba dominada por tres taxones: *Vibrionaceae*, *Entomoplasmales* y *Rhizobiaceae*. Por otra parte, el intestino demostró mayor diversidad, y dominaban *Vibrionaceae*, *Entomoplasmales*, *Rhizobiaceae* y *Mycoplasmataceae* (Shan et al., 2024).

En Sinaloa, muestras de camarón analizadas por García-López et al. (2020) encontraron que el filo de abundancia general es *Proteobacteria*. *Cyanobacteria* resultó el filo predominante en intestino, mientras que *Firmicutes* y *Actinobacteria* eran los más prevalentes en muestras de hepatopáncreas. Asimismo, hubo una

abundancia significativa del género *Vibrio* en intestino, así como de *Acinetobacter* y *Pseudomonas* en hepatopáncreas (García-López et al., 2020).

La estructura y diversidad de la microbiota del camarón que la población sinaloense consume es desconocida. Dada la importancia que tiene este producto en la transmisión de ETAs en nuestro país y a nivel internacional, se requieren estudios metagenómicos que nos permitan generar información sobre la microbiota intestinal y del hepatopáncreas de *L. vannamei*, así como describir el papel que desempeña la microbiota digestiva como reservorio potencial de agentes infecciosos de relevancia en salud pública, adicionales a los miembros pertenecientes al género *Vibrio*.

V. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco (*L. vannamei*) se consume ampliamente alrededor del mundo. Sin embargo, dependiendo de su manipulación y preparación, el consumo de este crustáceo puede representar un riesgo hacia la salud humana al transmitir enfermedades alimentarias infecciosas, convirtiéndolo en un tema de salud pública. Entre las principales preocupaciones de dicha problemática, destaca la presencia de *V. parahaemolyticus*, agente causal de síndromes diarreicos leves hasta infecciones severas que ponen en riesgo la vida del ser humano. Por otra parte, en camarones, esta bacteria causa mortalidad en masa y se ha evidenciado el surgimiento de multirresistencia a antibióticos en *V. parahaemolyticus* debido al uso inadecuado de estos fármacos tanto en sectores productivos como en el ámbito de la salud humana. El surgimiento de la multirresistencia a antibióticos dificulta el tratamiento efectivo de los cuadros clínicos atribuidos a *V. parahaemolyticus*.

A pesar de la importancia de las ETAs en salud pública, los estudios metagenómicos en camarón, para conocer la naturaleza de la microbiota que albergan los camarones producidos y consumidos en Sinaloa, son escasos. Estudios de secuenciación por *shotgun* permitirán conocer la presencia de microorganismos causantes de ETAs en el ser humano, además de posibilitar la identificación de bacterias resistentes a antibióticos, y la estimación de la abundancia de patógenos, permitiendo evaluar posibles riesgos para los consumidores, especialmente para individuos inmunocomprometidos.

VI. HIPÓTESIS

La clase *Gammaproteobacteria* es la más abundante en la microbiota del intestino y hepatopáncreas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), cultivado en una granja acuícola Sinaloense.

VII. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Conocer la diversidad taxonómica de la microbiota intestinal y de hepatopáncreas de camarones blancos (*Litopenaeus vannamei*) cultivados en una granja acuícola en el Noroeste de México.

7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Estudiar la diversidad taxonómica de la microbiota intestinal de los camarones blancos bajo estudio.

7.2.2. Estudiar la diversidad taxonómica de la microbiota del hepatopáncreas de los camarones blancos bajo estudio.

7.2.3. Investigar la presencia de agentes patógenos en la microbiota intestinal y del hepatopáncreas de los camarones blancos bajo estudio.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Colección de las muestras de camarón

Se realizaron tres muestreos de camarón (*Litopenaeus vannamei*) durante los meses de agosto, septiembre y diciembre del 2023, en una granja acuícola ubicada en el municipio de Navolato, Sinaloa (coordenadas: 24.646482, -107.901310). Se realizaron tres muestreos: en los primeros dos, se recolectaron cinco ejemplares de camarón por cada sitio de muestreo (seis sitios de muestreo), obteniendo 30 camarones por muestreo. En el tercero, se recolectaron cinco camarones por sitio de muestreo (dos sitios), obteniendo un total de 10 camarones en este muestreo. En total, se recolectaron 70 ejemplares juveniles (30 del primer muestreo, 30 del segundo, y 10 del tercero).

Para la recolección, se usaron frascos de plástico previamente esterilizados, y a los que, en condiciones asépticas, se les agregaron 300 mL de etanol al 96%, con el objetivo de preservar el material hasta su procesamiento (Figura 1). Tras la colección, las muestras fueron transportadas, dentro de una hielera que contenía bolsas de gel refrigerante congelado, hacia la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms” de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su posterior procesamiento, de acuerdo con la metodología descrita por Cisneros & Feijoó (2020).

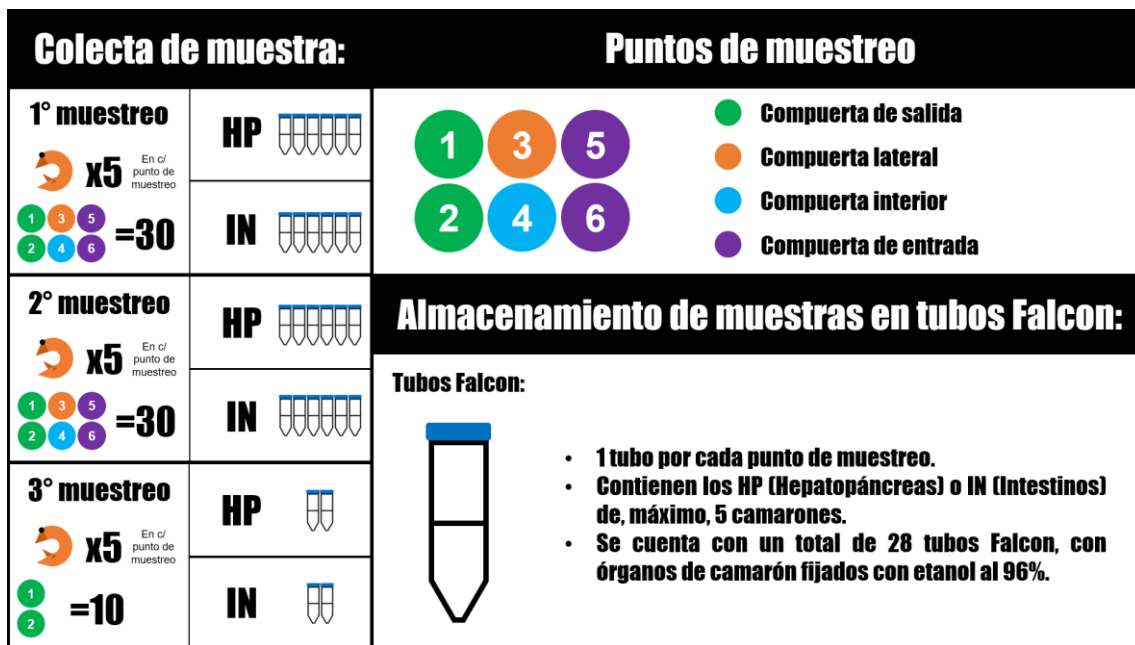


Figura 1. Resumen de muestreos y preparación de tubos Falcon con pools. Se prepararon 2 tubos Falcon por sitio de muestreo (uno para cinco hepatopáncreas, y el otro para cinco intestinos).

8.2. Extracción de intestino y hepatopáncreas de camarón

Después de cada muestreo, se extrajeron inmediatamente el intestino y hepatopáncreas de los camarones de forma aséptica, empleando pinzas y palillos de bambú estériles (Cheng et al., 2021) (Figura 2). Los órganos una vez extraídos, se almacenaron individualmente en tubos Eppendorf, los cuales contenían 1 mL de Etanol (96%). Posteriormente, para cada muestreo (1, 2 y 3) se prepararon pools en tubos Falcon (con 5 mL de etanol al 96%), por sitio de muestreo (1-6, en el primer y segundo muestreo; 1 y 2, en el tercer muestreo) y tipo de órgano (hepatopáncreas e intestino), de acuerdo con la figura 1.

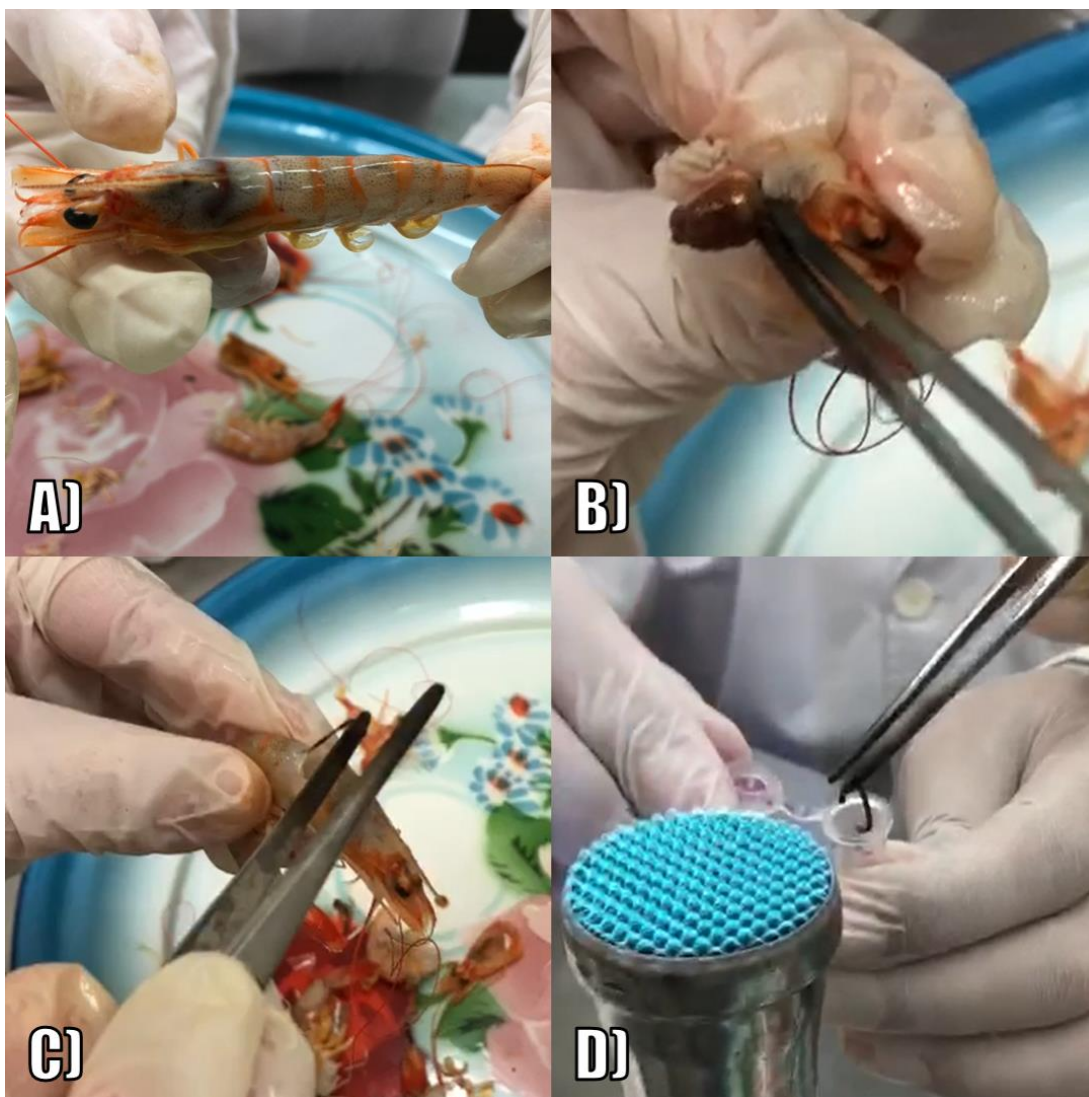


Figura 2. Extracción de hepatopáncreas e intestinos de camarón. A) Camarón completo, extraído del frasco de etanol (96%) en el cual se transportó desde la granja, hasta el laboratorio; **B)** Extracción de hepatopáncreas, ubicado dentro del cefalotórax; **C)** Extracción del intestino, expuesto tras separar el cefalotórax del abdomen; **D)** Almacenamiento del intestino en el tubo Eppendorf que contenía etanol (96%), cerca del mechero para evitar contaminación.

8.3. Extracción de ADN a partir de intestino y hepatopáncreas de camarón

Para la extracción del ADN del intestino y hepatopáncreas de camarón se siguió el método CTAB (Angthong et al., 2020) realizado en el laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán, Sinaloa. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) A partir de los pools, se pesó 1 g de estos, y se colocó en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL.
- 2) Se agregaron 480 μ L de EDTA 0.5 M y 120 μ L de lisozima, y se incubó a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se centrifugó por 2 min a 15,000 RPM, una vez realizado lo anterior, se desechó el sobrenadante.
- 3) Se agregaron 350 μ L de buffer CTAB a cada tubo, después se agregaron 20 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y se agitaron brevemente.
- 4) Se colocaron tubos en termoblock a 55 °C, hasta que el tejido estuviera lo suficientemente digerido.
- 5) Se agregaron 300 μ L de LiCl 5M, 5 μ L de RNasa y se agitaron los tubos por 1 min; posteriormente, se añadieron 600 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y, nuevamente, se agitaron brevemente.
- 6) Se agitó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugó a 13,000 RPM durante 15 min a temperatura ambiente.
- 7) Se extrajeron 500 μ L de la fase acuosa (parte superior) del centrifugado y, después, se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
- 8) Se añadieron 50 μ L de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 1 mL de etanol 100%, frío; después, se agitó brevemente y se colocó a -20 °C por 1 hora, aproximadamente.
- 9) Después, se centrifugaron durante 20 min a 13,000 RPM a 4 °C, y se retiró el sobrenadante cuidadosamente, para evitar la pérdida del ADN sedimentado.
- 10) Se agregaron 750 μ L de etanol al 70%, y se agitó por 15 min a temperatura ambiente; posteriormente, se centrifugó a máxima

velocidad (14,000 RPM) durante 5 min a temperatura ambiente, y se retiró el sobrenadante por decantación.

- 11) Se dejó secar pellet de ADN en campana de flujo laminar y, una vez seco, se añadió 20 µL de agua de 18 Ω estéril para la resuspensión del pellet. Después de ello, se guardó a 8 °C y se dejó reposar por toda la noche.

8.4. Determinación de la pureza, concentración e integridad del ADN

La concentración y pureza del material genético se determinó por medio del espectrofotómetro DeNovix DS-11 (Hossain et al., 2021). La integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando el marcador de peso molecular “Thermo GeneRuler™ 100 bp DNA”. Posteriormente, se observó en un transiluminador de luz UV (García López et al., 2020).

8.5. Preparación de la muestra para secuenciación

8.5.1. Tagmentación genómica de la muestra y limpieza post tagmentación

La tagmentación es una reacción que ocurre por medio de transposomas, los cuales combinan el marcaje y fragmentación del ADN en una reacción única y rápida (Illumina, 2021).

El procedimiento realizado fue el siguiente: Se añadieron 5 µL de la muestra a los pocillos en una placa de PCR. Después se les agregaron 25 µL de agua libre de nucleasas (NFW). Posteriormente, para la preparación de la “*Tagmentation Master Mix*” (TMM), se aplicó vórtex al BLT (*Bead Linked Transposomes*) hasta resuspenderlo, y se mezclaron 11 µL de BLT con 11 µL del “*Tagment Buffer 1*” (TB1) para obtener la TMM, la cual se resuspendió por vórtex, y se añadió a los pocillos con muestra. Finalmente, se resuspendieron las muestras por pipeteo y se colocaron en el termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler) con el programa de tagmentación (TAG) (Illumina 2021).

Posteriormente, se añadieron 10 µL de TSB a la placa de PCR de las muestras para detener la tagmentación. Se pipeteó lentamente cada pocillo para resuspender las perlas; enseguida, se trasladaron las muestras al termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler) programado y se corrió el programa PTC (“*Post Tagmentation*”).

Cleanup"). Después, se colocó la placa sobre soportes magnéticos hasta que el líquido quedó transparente y, se removió y descartó el sobrenadante con pipeta multicanal, y luego se realizó el lavado doble (Illumina, 2021).

Tras el lavado, se removió la placa del soporte magnético y se pipeteó lentamente, se agregaron 100 μ L de TWB ("*Tagment Wash Buffer*") directamente sobre las perlas, las cuales se resuspendieron por pipeteo. Finalmente, se selló la placa y se colocó sobre el soporte magnético hasta que el líquido quedó nuevamente transparente ("*Nextera XT DNA Library Preparation Kit*", 2021).

8.5.2. Amplificación del ADN tagmentado

El ADN tagmentado fue amplificado usando un programa de PCR con ciclo limitado, el cual liga los adaptadores correspondientes al índice 1 (i7) y 2 (i5), además de las secuencias requeridas para generar los grupos de secuenciación (Illumina, 2021).

Para ello, se mezclaron 616 μ L de EPM ("*Enhanced PCR Mix*") y 616 μ L de NFW para la preparación de la "*PCR Master Mix*" (PMM), a la cual se le aplicó vórtex y se centrifugó a 280 *g* por 10 segundos. Después, se colocó la placa sobre el soporte magnético y se utilizó una pipeta multicanal para remover y descartar el sobrenadante del líquido. Posteriormente, se retiró la placa del soporte mencionado, y se añadieron 40 μ L de PMM directamente sobre las perlas, luego se pipetearon hasta que estas esferas se resuspendieran por completo. Tras esto, se selló la placa de muestras y se centrifugó a 280 *g* por 3 segundos, y se añadieron los adaptadores índice correspondientes a cada muestra (Illumina, 2021).

Finalmente, las muestras se mezclaron por pipeteo y se selló la placa con sello adhesivo "*microseal B*" para centrifugar a 280 *g* por 30 segundos, y posteriormente se colocaron en termociclador (*SimpliAmp Thermal Cycler*) preprogramado para correr el programa PTC (Illumina, 2021).

8.5.3. Limpieza de las bibliotecas

Esta etapa consistió en usar perlas de doble cara para purificar las bibliotecas amplificadas. Para ello se centrifugó a 280 *g* por 1 minuto, y se recogió el contenido

del fondo del pozo, además, se colocó la placa de PCR encima del soporte magnético hasta que se aclaró la solución. Posteriormente, se transfirió 45 μ L del sobrenadante de los pocillos a los pocillos de una nueva placa MIDI (*“Microbial Identification”*) (Illumina, 2021).

Se agregó el ADN estándar y se realizaron los siguientes pasos: se añadieron 40 μ L de NFW a cada pocillo con sobrenadante, se les agregó IPB (*“Illumina Purification Beads”*) a cada pocillo con sobrenadante, y se mezcló por pipeteo (10 veces) antes de sellar la placa e incubarla a temperatura ambiente por 5 minutos. Después, se colocó sobre el soporte magnético hasta que estuviera limpio el líquido y luego se agregaron 15 μ L de IPB a cada pocillo de una nueva placa MIDI, a la cual se le añadieron 125 μ L de sobrenadante, desde la primera placa, al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI (Illumina, 2021).

La nueva placa MIDI fue sellada a temperatura ambiente por 5 minutos, y luego se colocó sobre el soporte magnético hasta que el líquido estuviera transparente; después, sin alterar las perlas, se retiró y desechó el sobrenadante; entonces, se lavó la placa MIDI por duplicado, tras colocarla en el soporte magnético se le agregó 200 μ L de etanol fresco al 80% sin mezclar, y se incubó por 30 segundos, evitando alterar las perlas al remover y desechar el sobrenadante; posteriormente, con una pipeta de 20 μ L se desechó el sobrenadante y se dejó secar al aire la placa, por 5 minutos sobre el soporte magnético, y una vez removido de dicho soporte, se le añadieron 32 μ L de RSB (*“Resuspension Buffer”*) a las perlas, y se resuspendieron mediante pipeteo. Finalmente, se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 2 min, se colocó la placa sobre el soporte magnético hasta que se limpiara el líquido, y se transfirieron 30 μ L de sobrenadante a una nueva placa de PCR de 96 pocillos (Illumina, 2021).

8.5.4. Bibliotecas de pools

Para lograr la densidad óptima de clúster, de acuerdo con el kit de Illumina (*“Nextera XT DNA Library Preparation Kit”*), se agruparon los volúmenes de librerías iguales y se cuantificó el grupo antes de secuenciar. Se realizó de la siguiente forma: se combinaron 5 μ L de cada genoteca en un tubo de microcentrifuga de 1.7 mL y

se centrifugaron después de mezclarles por vórtex. Después, se cuantificó la librería del pool por medio del método de tinción fluorescente de dsDNA, utilizando el fluorómetro Qubit 2.0.

8.6. Secuenciación masiva

Este proceso se llevó a cabo en el equipo MiniSeq de la plataforma Illumina, utilizando el kit “*Nextera XT DNA Library Preparation Kit*”, con un tipo de lectura *paired-end* y un formato de 2x150 pb.

8.7. Análisis bioinformático

8.7.1. Análisis general de las secuencias

La limpieza y ensamble de las secuencias se realizó dentro de la máquina virtual (*Oracle VM VirtualBox v7.0.*) (Oracle, 2023), con la cual se corrió *MGLinux18*, con *Ubuntu (64-bit)* como sistema operativo. Las secuencias se convirtieron al formato *fastqc.html* mediante el software FastQC (v0.12.1) (Andrés, 2023), obteniendo un archivo por muestra. Posteriormente, se utilizó el software MultiQC (v1.17) (Ewels, 2023) para hacer un análisis de calidad de los resultados de la secuenciación obteniéndose un resumen general de las métricas del proceso de secuenciación, tales como: estadísticas básicas, calidad de secuencia por base, calidad de secuencia por subregiones, calidad de secuencia, contenido de secuencia de GC, contenido de N por base, distribución de longitudes de secuencia, secuencias sobrerrepresentadas y contenido de adaptadores.

8.7.2. Clasificación taxonómica

Para clasificar taxonómicamente las secuencias presentes en los metagenomas, se compararon éstas contra genomas conocidos. Para ello se utilizó el programa Kraken2 (Wood et al., 2022); un sistema que determina la similitud de las secuencias con la base de datos que éste posee, de acuerdo con la frecuencia de *kmeros* de las secuencias. Se emplearon las secuencias obtenidas previamente, habiéndolas transformado a formato “*.fasta*” tras su limpieza y, posteriormente, se obtuvieron los OTUs (“*Operational Taxonomic Units*”) en un archivo de texto (.txt),

para finalmente organizarlos en una tabla de *Excel*, facilitando la manipulación de los datos.

8.7.3. Diversidad taxonómica

Para el estudio de diversidad taxonómica, se utilizaron 2 software ampliamente utilizados para análisis estadísticos: PAST ("*PA*leontological *ST*atistics") (v.4.03) el cual se emplea para análisis estadísticos univariados y multivariados, ajuste de curvas, series temporales, representaciones gráficas y análisis filogenético simple, lo cual lo vuelve un programa bastante útil para estudios paleontológicos y ecológicos (Hammer et al., 2001); y STAMP ("*Statistical Analysis of Metagenomic Profiles*") (v2.0.6), un software que permite un fácil análisis estadístico de datos, especialmente los organizados en secuencias temporales, además de proveer gráficas y la posibilidad de comprobar hipótesis por medio de la evaluación de la significancia de patrones en los datos (Parks & Beiko, 2010).

En PAST se realizaron análisis multivariados, como:

- PCA ("*Principal Component Analysis*"), para simplificar la base de datos, eligiendo un menor número de predictores y pronosticar una variable objetivo.
- PERMANOVA ("*PER*mutational *M*ultivariate *AN*alysis *Of* *VA*riance"), un análisis de varianza multivariado permutacional, para determinar la significancia estadística de los grupos mediante el análisis de conglomerados.
- ANOSIM ("*AN*alysis *Of* *SIM*ilarities") para determinar la significancia estadística de los grupos mediante el análisis de conglomerados.
- SIMPER ("*SIM*ilarity *PER*centages") para el desglose de la contribución de cada variable de interés a la similitud (o disimilitud) observada entre las muestras.

En STAMP, también se ingresó la tabla de metadatos con las 10 clases principales (según la proporción representada en el total de este nivel taxonómico), y de esta forma se generaron diagramas de caja (*box plot*).

IX. RESULTADOS

9.1. Secuenciación

Tras la secuenciación, se obtuvieron 56 archivos pareados en formato *fastq.gz* de los pools de las muestras, debido a que son dos secuencias de la misma molécula (de forma bidireccional, es decir, 5' a 3', y viceversa). Estos fueron descargados desde la plataforma de *Base Space Sequence Hub* de Illumina, ya que fueron cargados por medio de la aplicación de *FASTQ Generation* (v1.0.0) (Illumina, 2016). Tras limpiar las secuencias, de acuerdo con lo descrito en la metodología, se realizó el análisis bioinformático.

9.2. Clasificación taxonómica

Posterior al análisis con Kraken2, y después de acomodar esta información en Excel, se obtuvo una tabla con los OTUs de las muestras. Entre el total de muestras, se obtuvo lo siguiente: 64 phylum, 134 clases, 623 familias, 2207 géneros, y 8924 especies.

9.3. Diversidad taxonómica en la microbiota del camarón

Tras analizar la tabla de OTUs, se comparó la abundancia de los microorganismos presentes a diferentes niveles taxonómicos, seleccionando a los más abundantes, aquellos que ocuparan el mayor porcentaje, es decir, al menos un 60% del total, de acuerdo con lo reportado en la literatura; los niveles taxonómicos estudiados fueron: Filo (90.98%), Clase (75.54%), Familia (61.63%), Género (62.11%), y Especie (61.66%).

9.3.1. Diversidad taxonómica según el Filo

En la tabla de OTUs se disponía de más de 60 filos, de los cuales se seleccionaron los 10 más abundantes (*Fungi*, *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Apicomplexa*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteriota*, *Euglenozoa*, *Actinomycetota*, *Eveosea* y *Orthornavirae*), que ocuparon más del 90% del total de las OTUs disponibles (Figura 3). Con estos mismos OTUs se graficó la abundancia, tanto en hepatopáncreas (Figura 4) como en intestino (Figura 5).

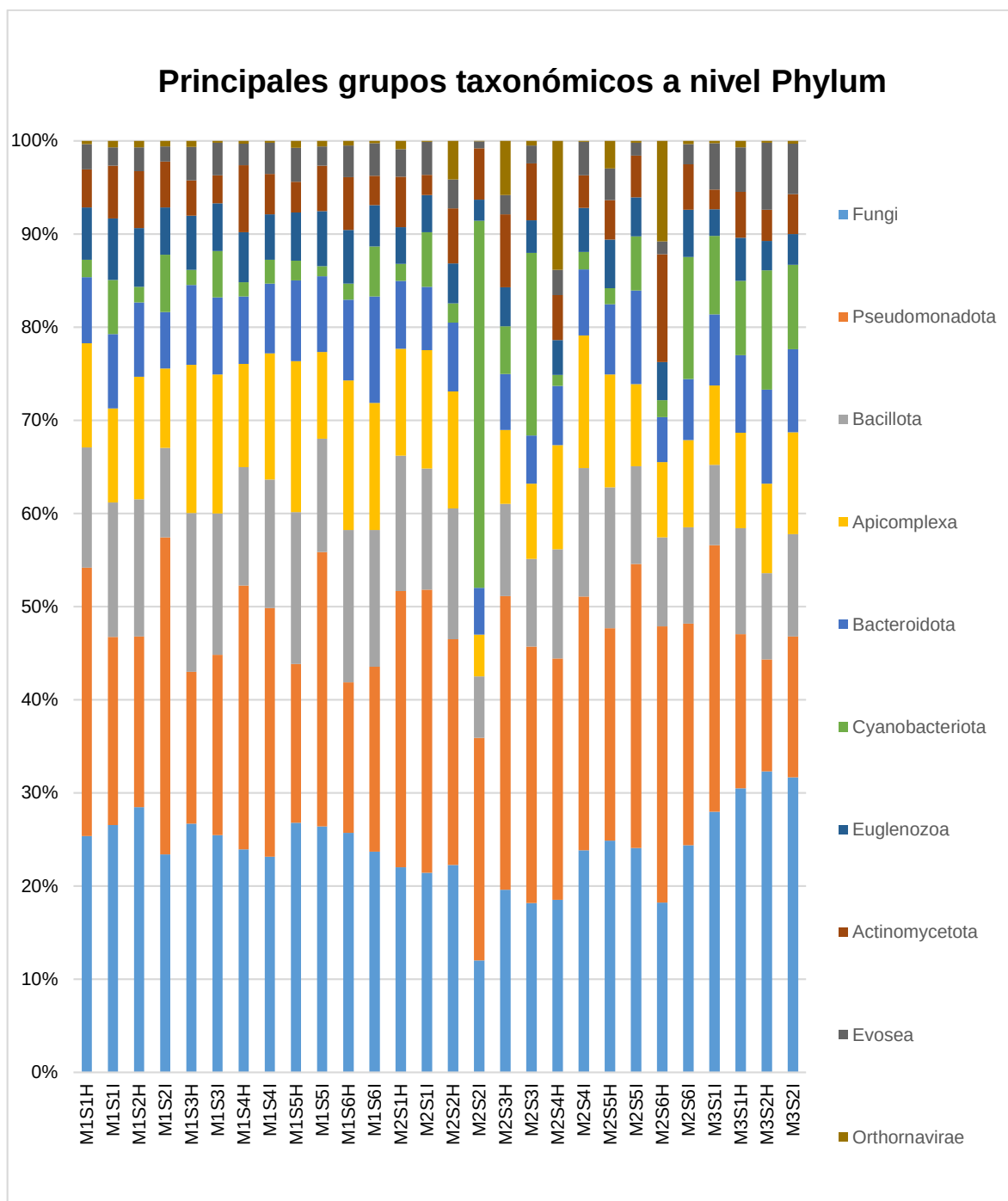


Figura 3. Clasificación Taxonómica (Phylum). Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Phylum en los órganos bajo estudio (intestino y hepatopáncreas).

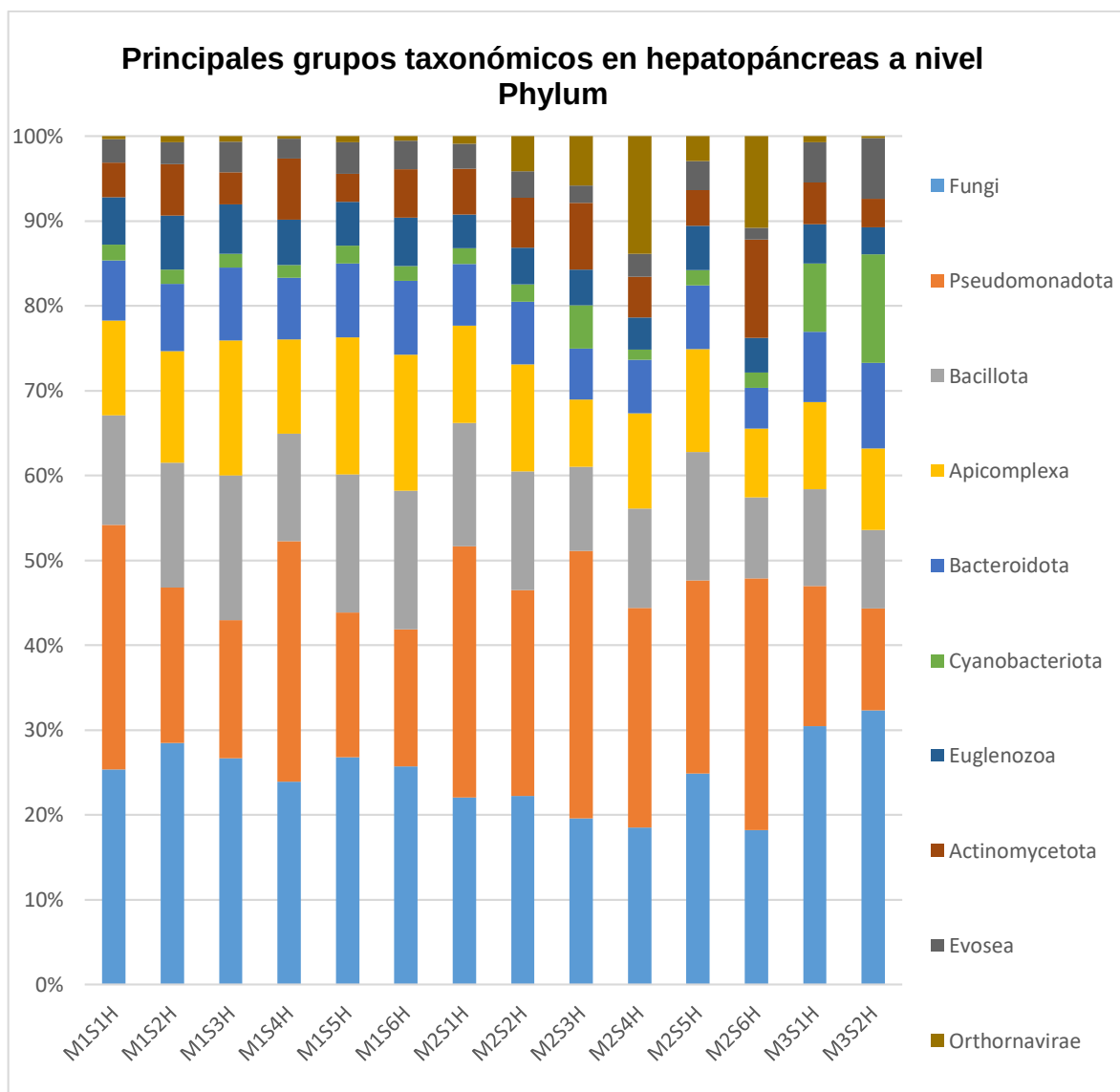


Figura 4. Clasificación Taxonómica (Phylum) en hepatopáncreas. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Phylum en las muestras de hepatopáncreas analizadas.

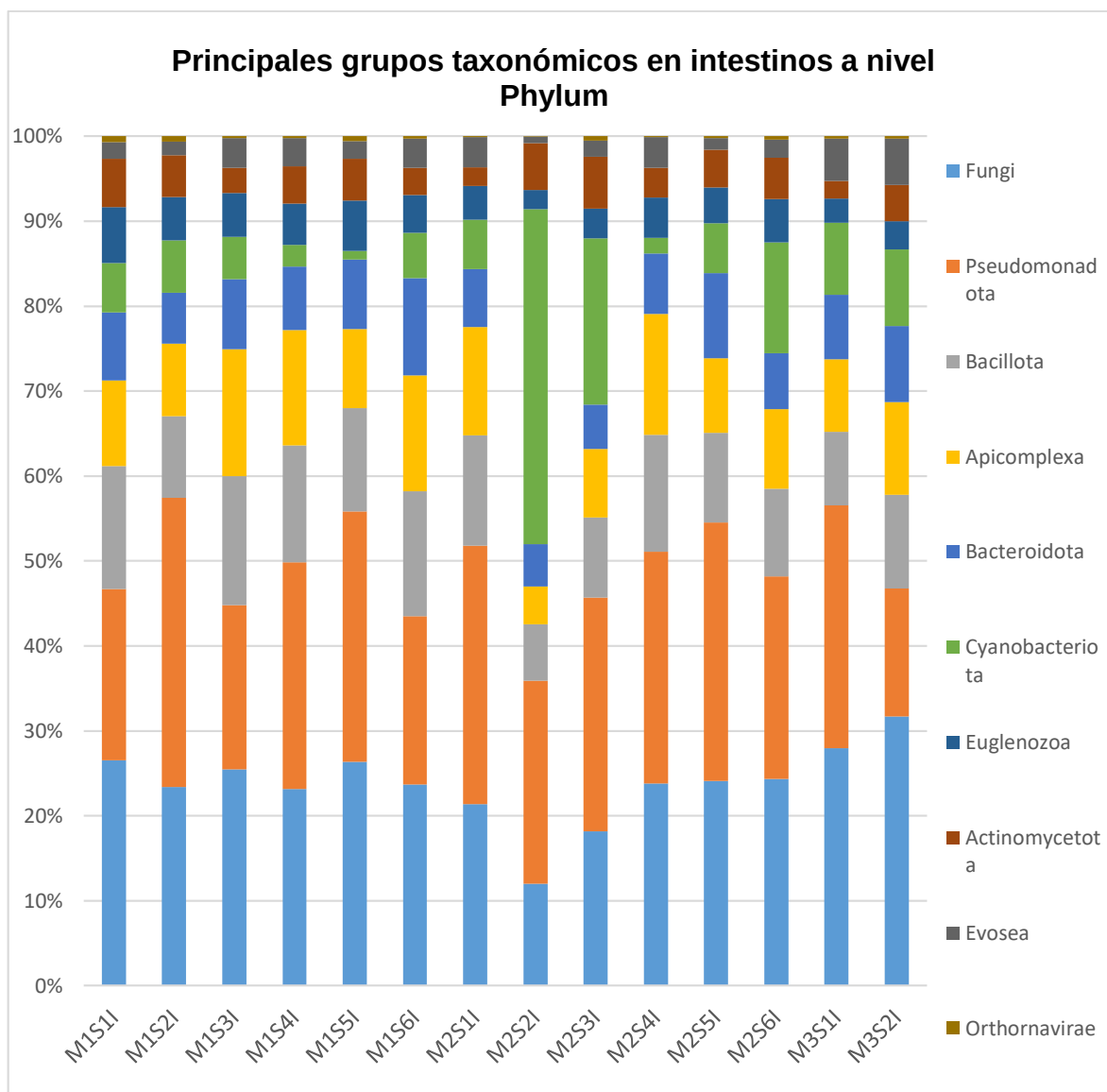


Figura 5. Clasificación Taxonómica (Phylum) en intestinos. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Phylum en las muestras de intestinos analizadas.

9.3.2. Diversidad taxonómica según la Clase

Se seleccionaron las 10 Clases más abundantes entre las OTUs obtenidas, las cuales abarcaban más del 70% del total; éstas fueron *Ascomycota*, *Gammaproteobacteria*, *Aconoidasida*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Cyanophyceae*, *Clostridia*, *Kinetoplastea*, *Actinomycetes* y *Flavobacteriia* (Figura 6). Con estos mismos OTUs se graficó la abundancia, tanto en hepatopáncreas (Figura 7), como en intestino (Figura 8).

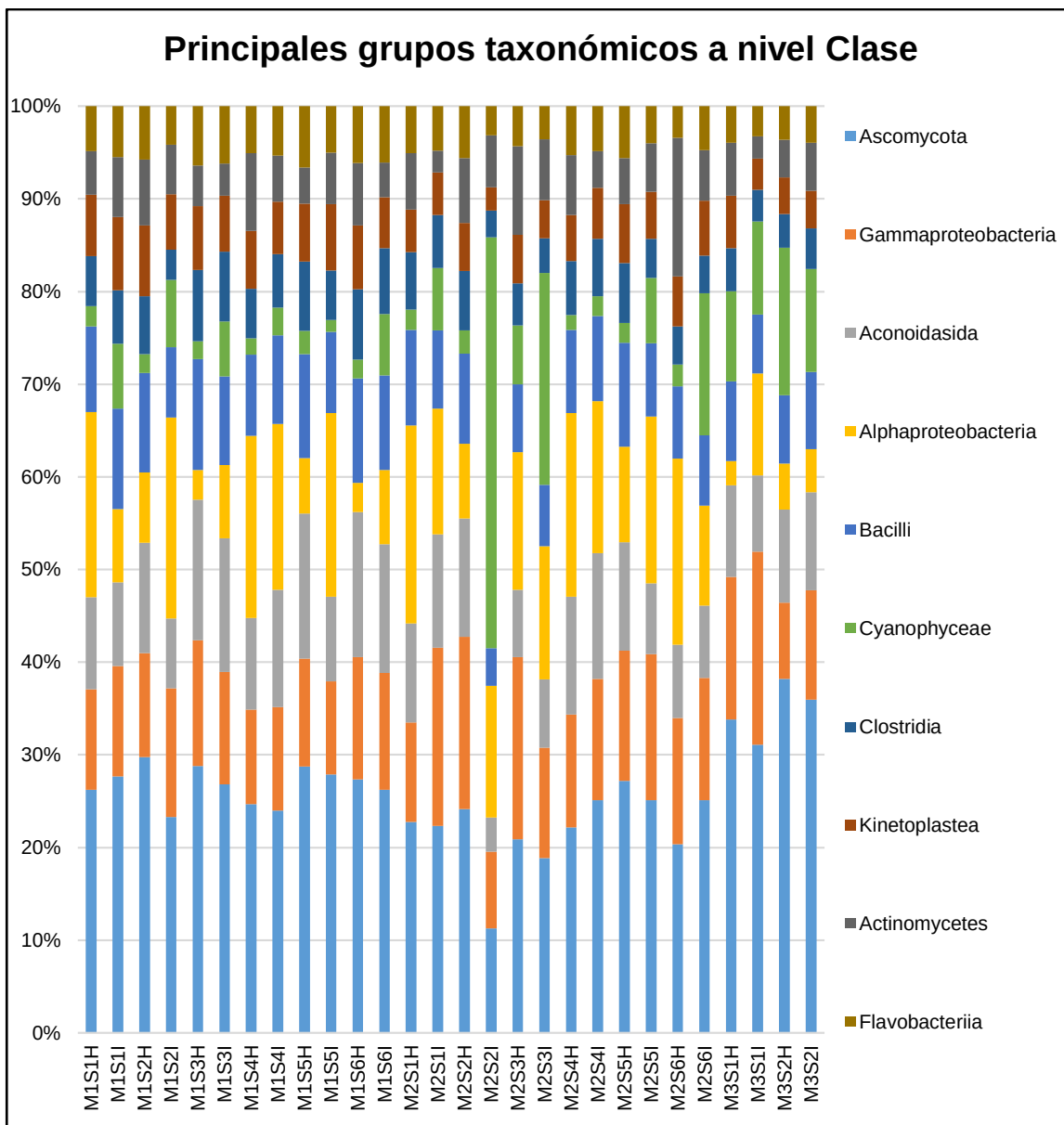


Figura 6. Clasificación Taxonómica (Clase). Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Clase en intestino y hepatopáncreas.

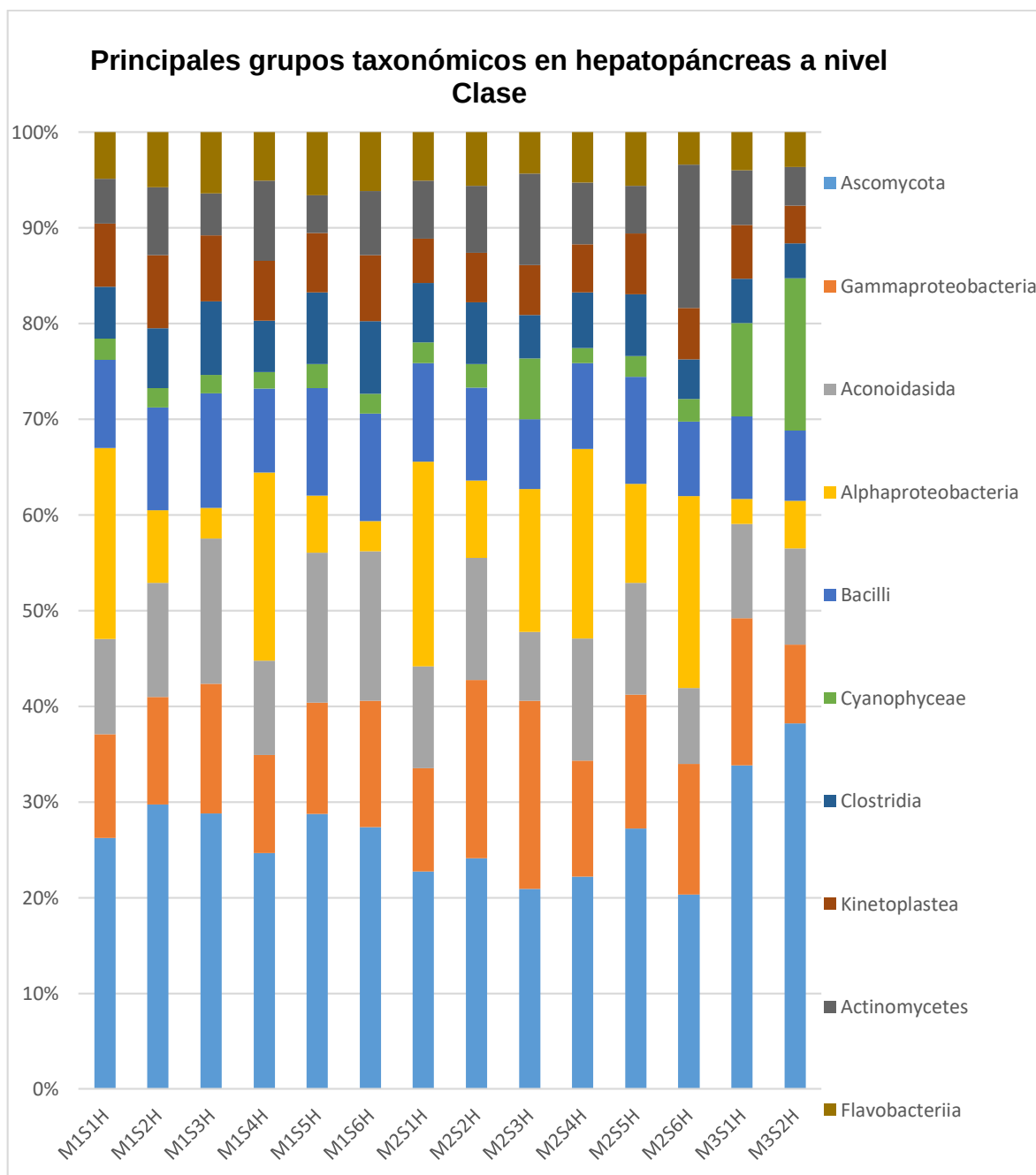


Figura 7. Clasificación Taxonómica (Clase) en hepatopáncreas. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Clase en las muestras de hepatopáncreas analizadas.

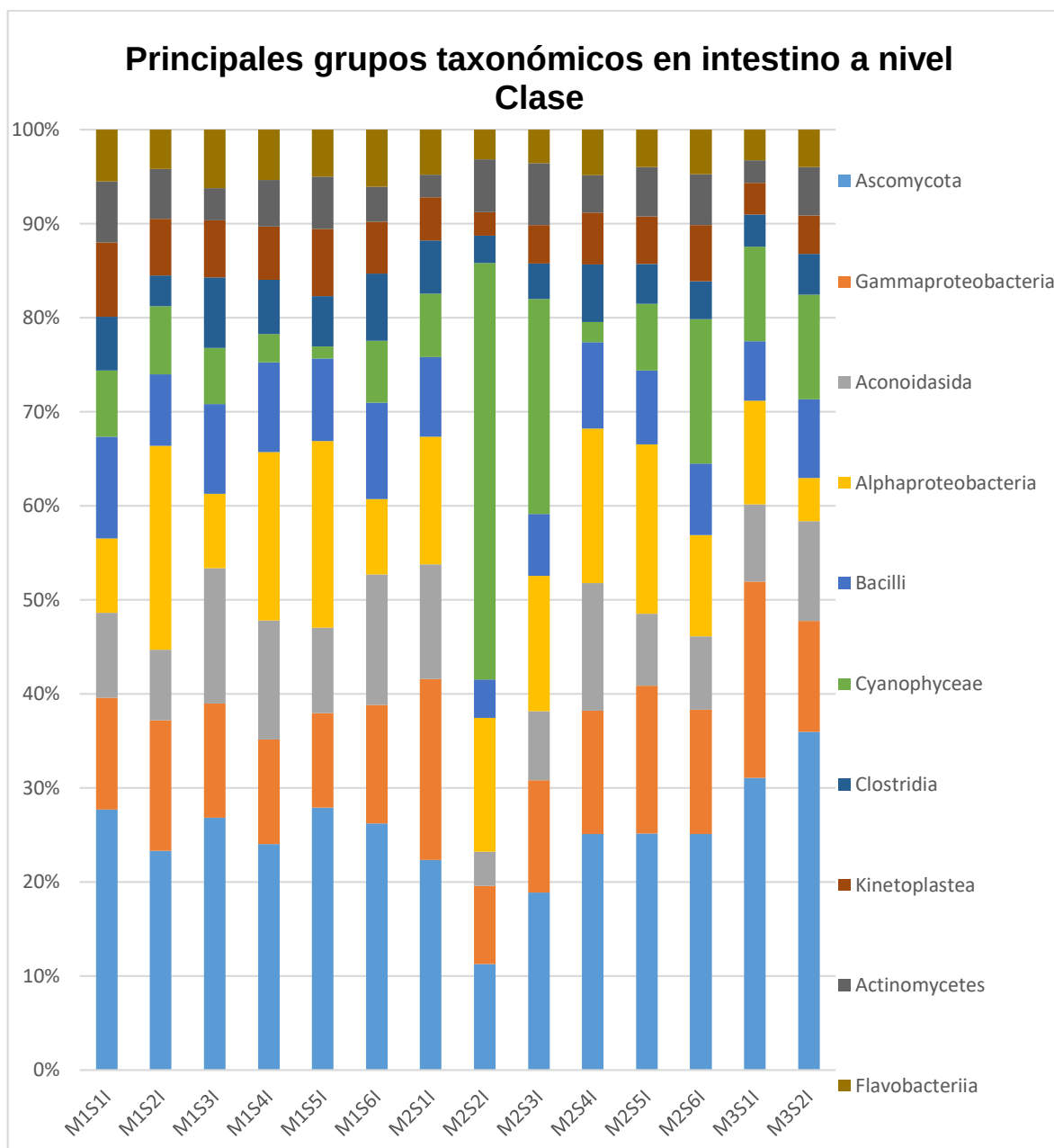


Figura 8. Clasificación Taxonómica (Clase) en intestinos. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Clase en las muestras de intestinos analizadas.

9.3.3. Diversidad taxonómica según la Familia

A nivel de Familia, se seleccionaron las principales 20 OTUs, y entre éstas destacaron *Saccharomycetales*, *Plasmodiidae*, *Bartonellaceae*, *Trypanosomatidae*, *Dictyosteliaceae*, *Vibrionaceae*, *Hypocreales*, *Flavobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillaceae*, etc (Figura 9). Con estos mismos OTUs se graficó la abundancia en hepatopáncreas (Figura 10) e intestino (Figura 11).

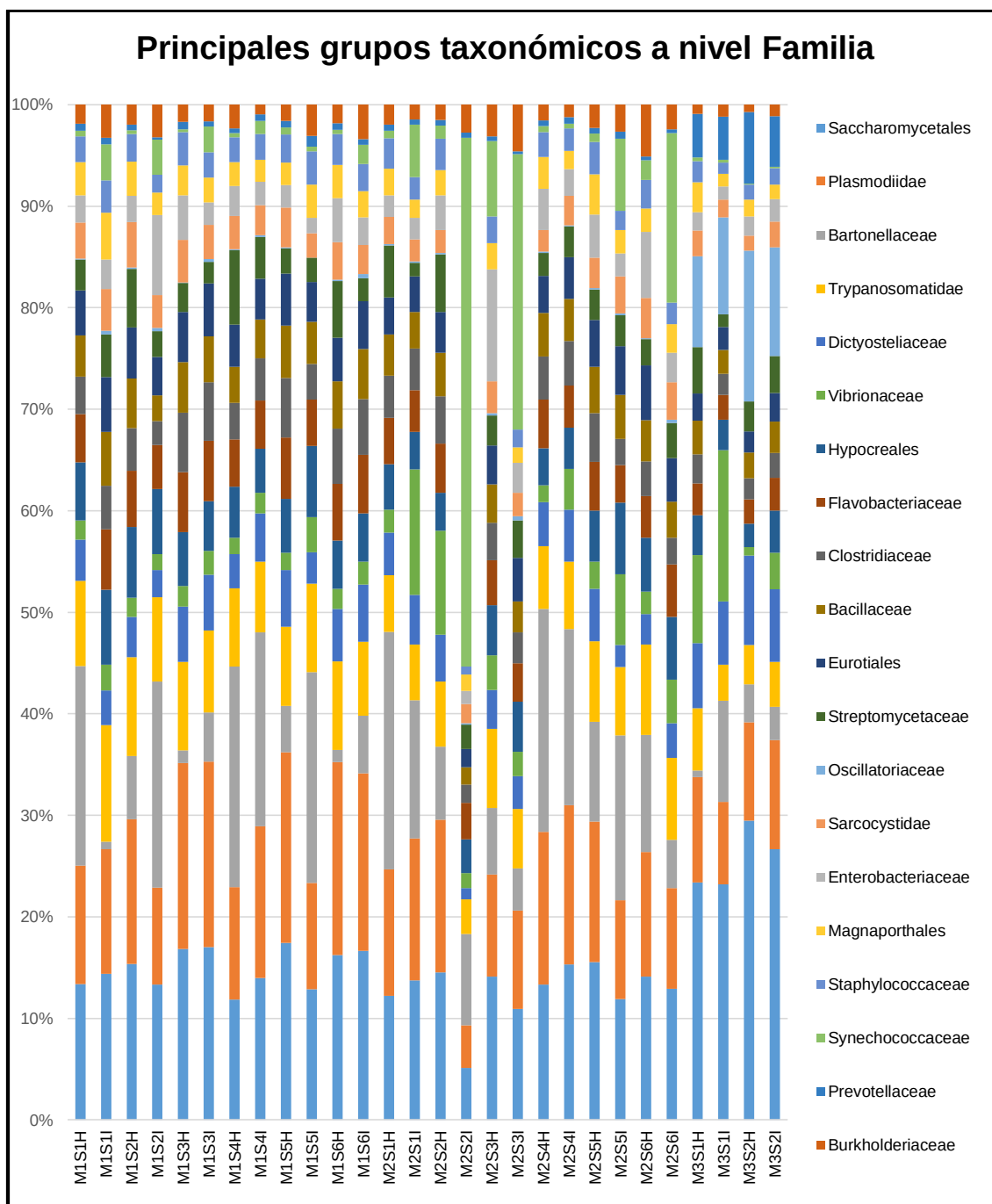


Figura 9. Clasificación Taxonómica (Familia). Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Familia en intestino y hepatopáncreas.

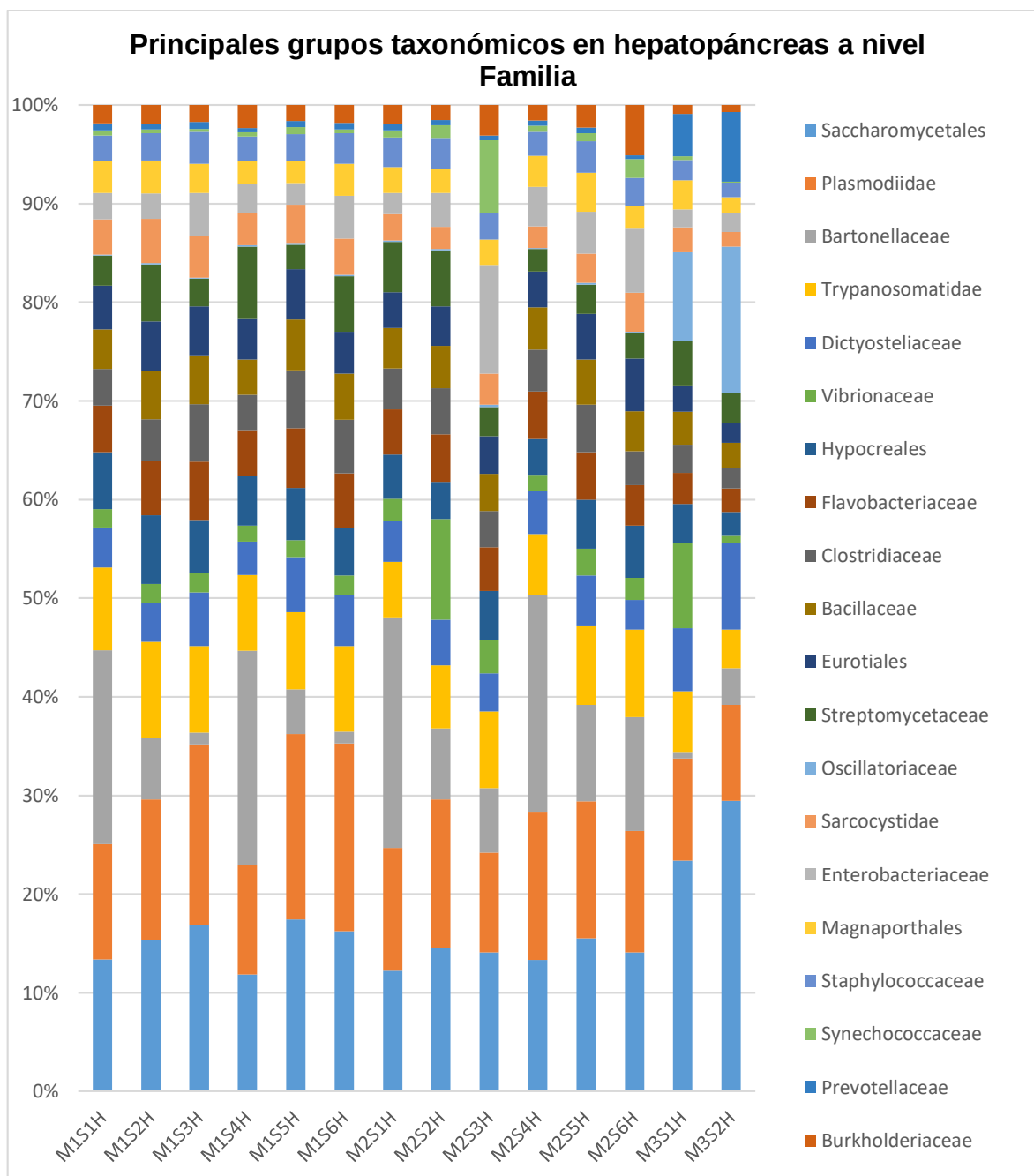


Figura 10. Clasificación Taxonómica (Familia) en hepatopáncreas. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Familia en las muestras de hepatopáncreas analizadas.

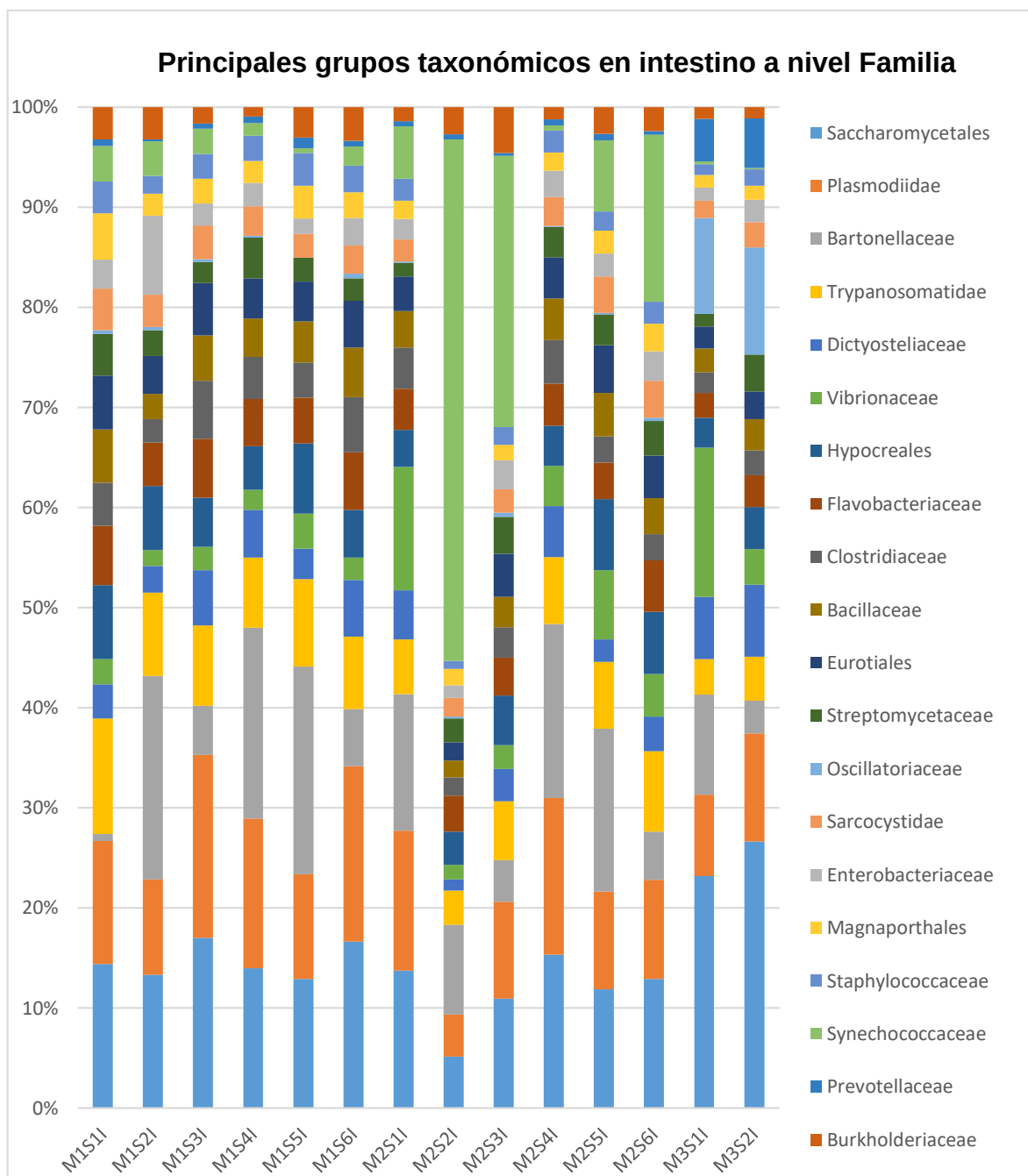


Figura 11. Clasificación Taxonómica (Familia) en intestinos. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Familia en las muestras de intestinos analizadas.

9.3.4. Diversidad taxonómica según el Género

Al evaluar a nivel de Género, los 40 géneros más abundantes fueron *Plasmodium*, *Saccharomycetaceae*, *Bartonella*, *Dictyostelium*, *Leishmania*, *Debaryomycetaceae*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Moorena*, etc (Figura 12). Con estos mismos OTUs se graficó la abundancia, tanto en hepatopáncreas (Figura 13), como en intestino (Figura 14).

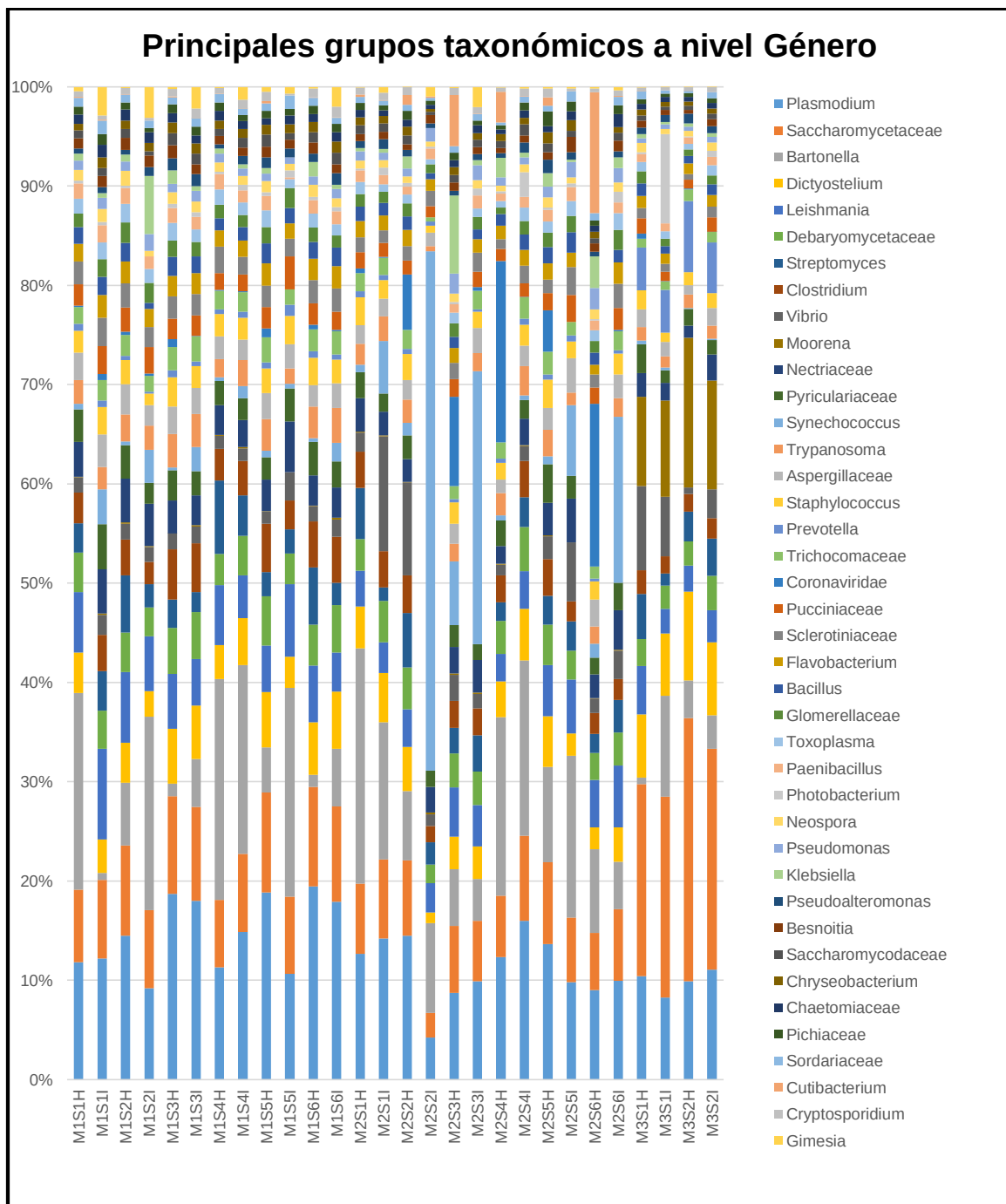


Figura 12. Clasificación Taxonómica (Género). Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Género en intestino y hepatopáncreas.

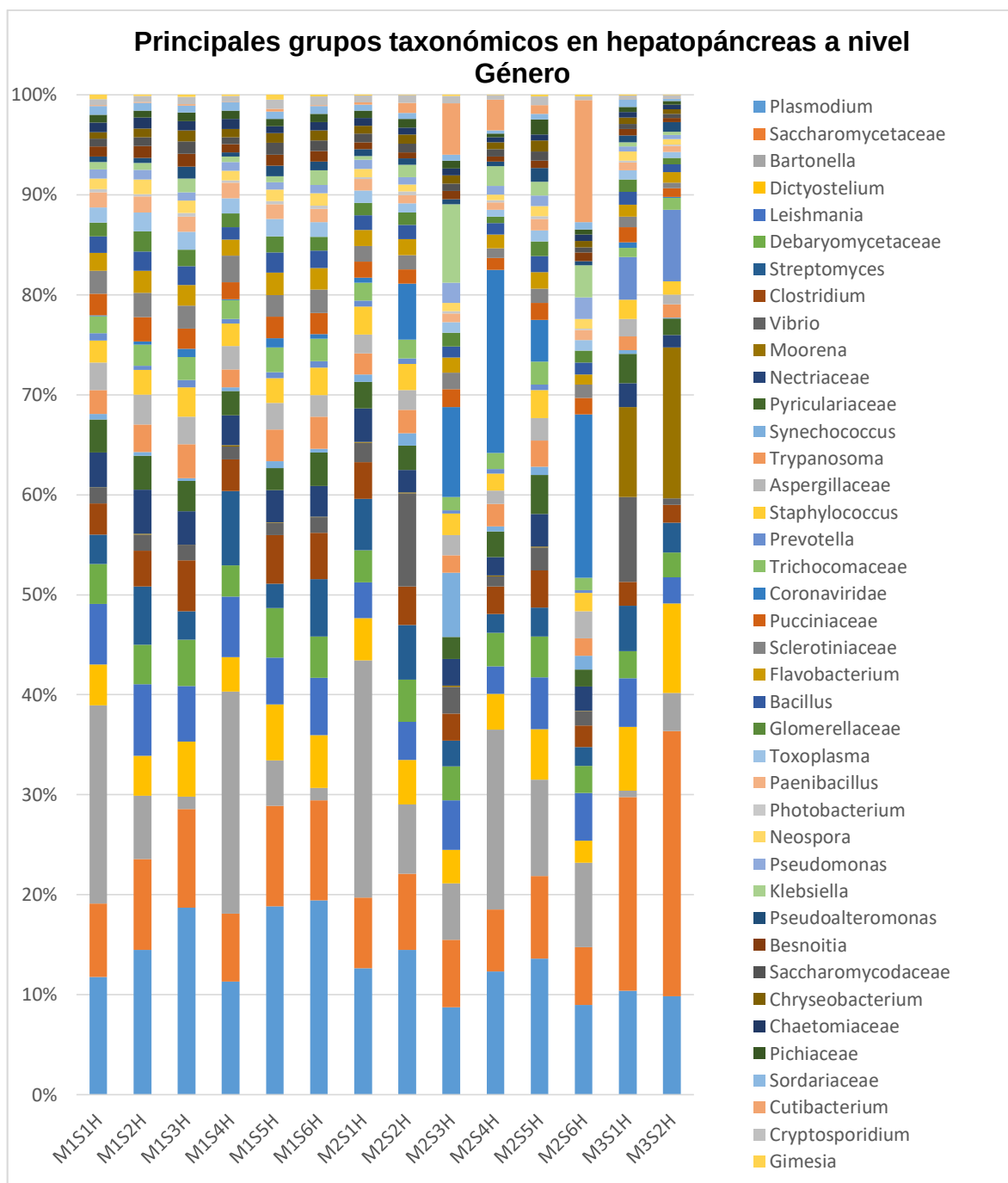


Figura 13. Clasificación Taxonómica (Género) en hepatopáncreas. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Género en las muestras de hepatopáncreas analizadas.

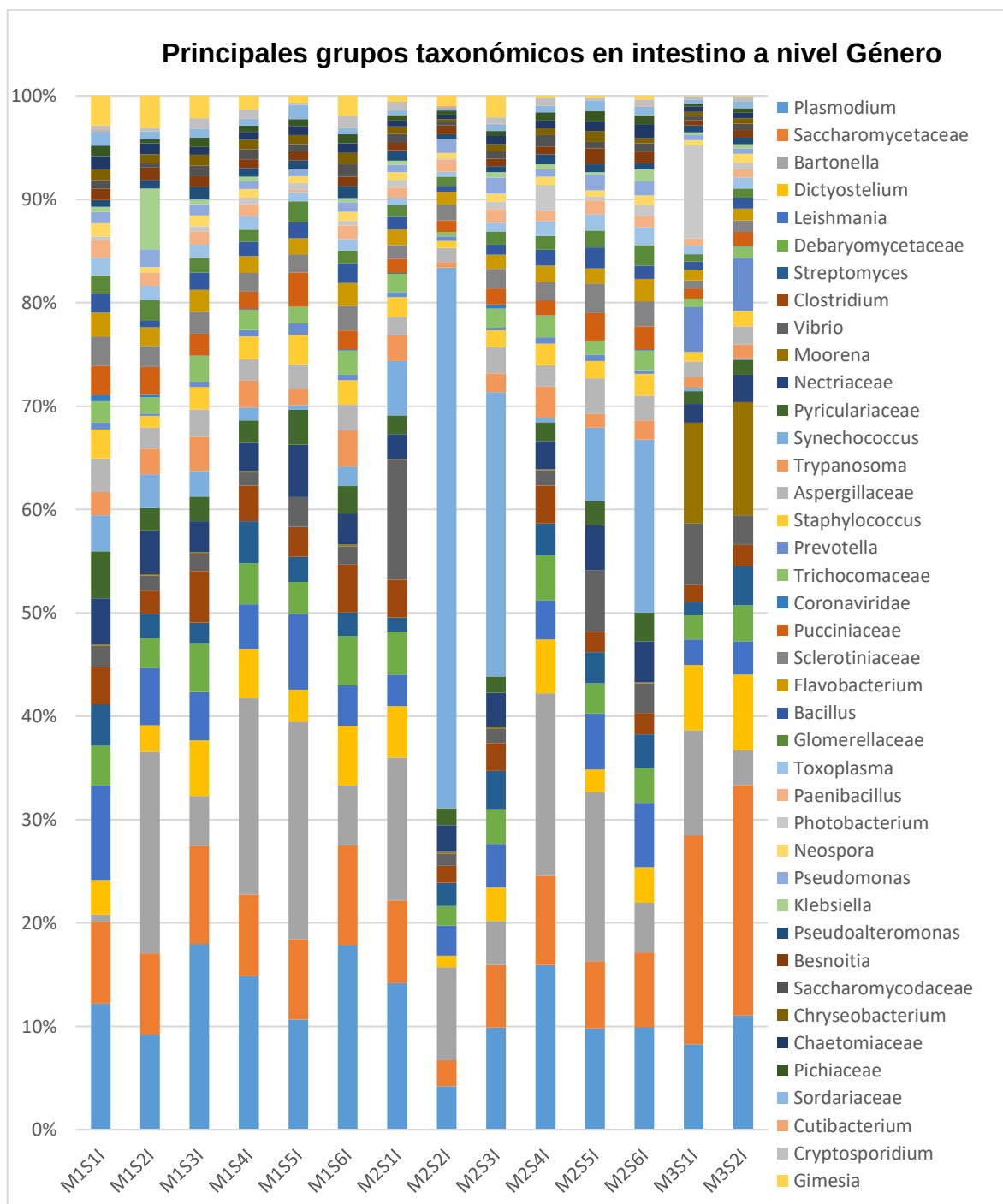


Figura 14. Clasificación Taxonómica (Género) en intestinos. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Género en las muestras de intestinos analizadas.

9.3.5. Diversidad taxonómica según la Especie

Finalmente, al analizar las 120 especies más abundantes, las que sobresalieron fueron: *Bartonella krasnovii*, *Saccharomyces* spp., *Dictyostelium discoideum*, *Moorena producens*, *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Pyricularia*, *Plasmodium malariae*, *Trypanosoma brucei*, *Aspergillus* spp., etc (Figuras 15). Con estos mismos OTUs se graficó la abundancia, tanto en hepatopáncreas (Figura 16), como en intestino (Figura 17).

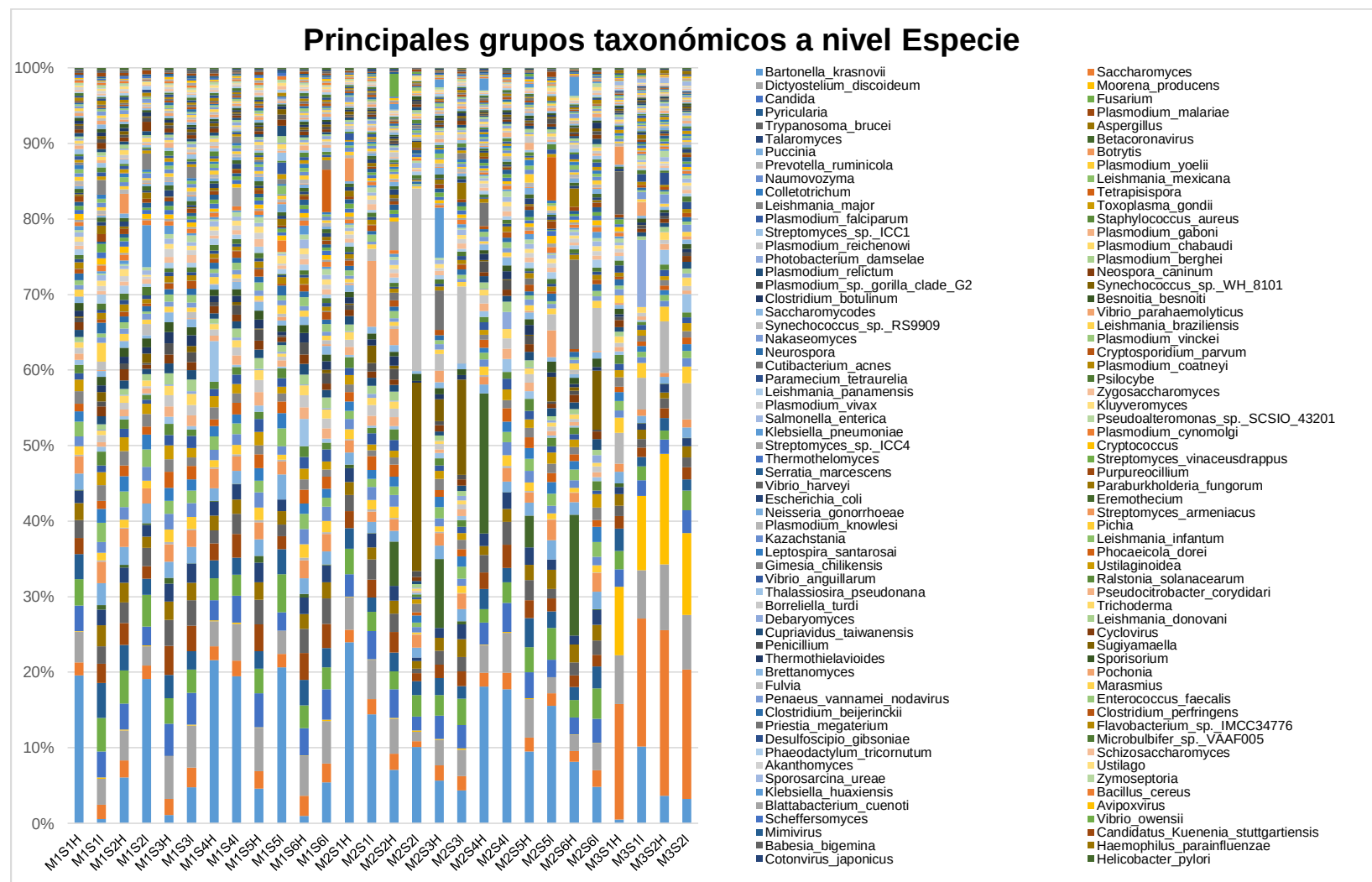


Figura 15. Clasificación Taxonómica (Especie). Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Especie en intestino y hepatopáncreas.

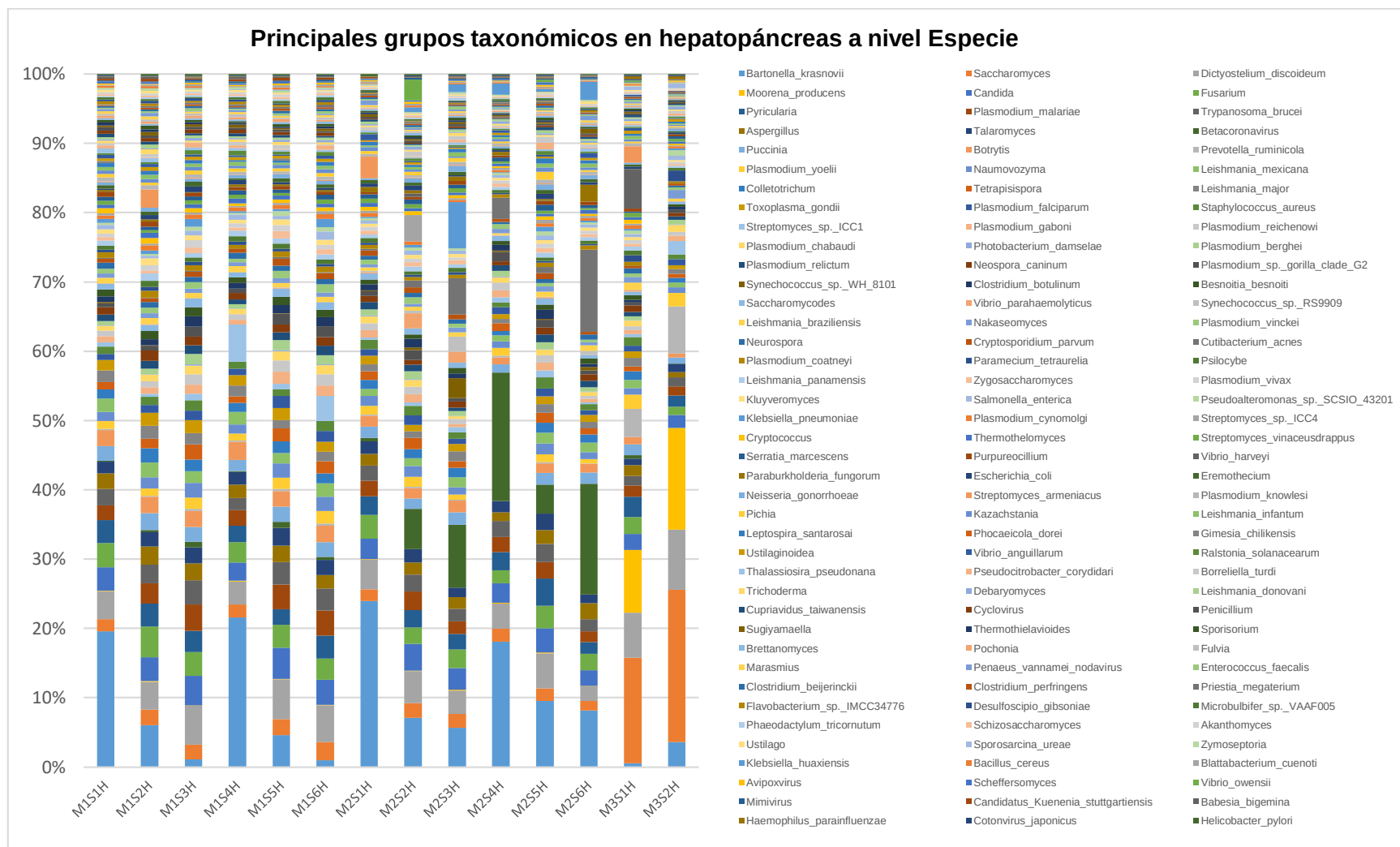


Figura 16. Clasificación Taxonómica (Especie) en hepatopáncreas. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Especie en las muestras de hepatopáncreas analizadas.

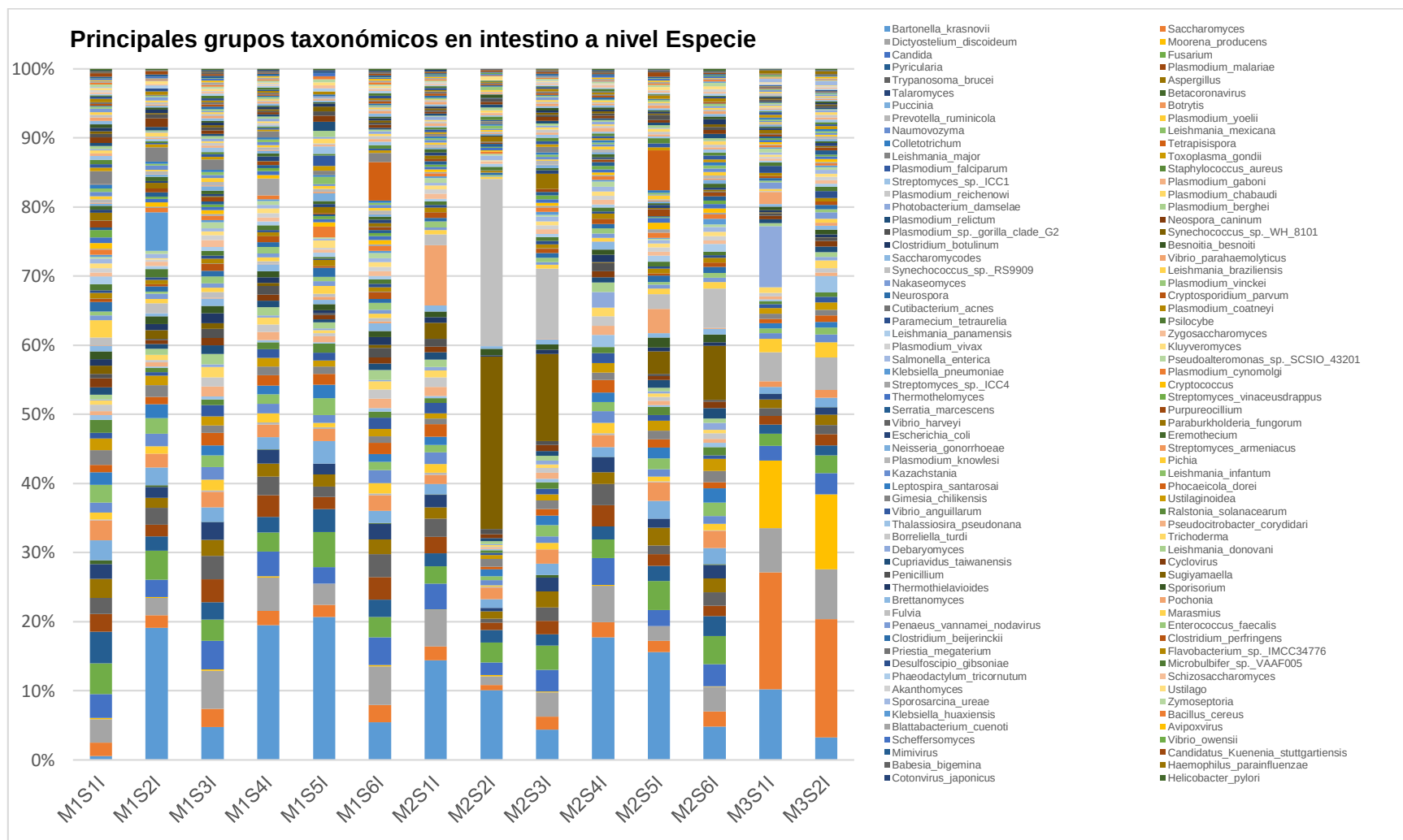


Figura 17. Clasificación Taxonómica (Especie) en intestinos. Aporte de las OTUs más abundantes a nivel de Especie en las muestras de intestinos analizadas.

9.4. Análisis multivariados

9.4.1. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Phylum

En PAST (Hammer et al., 2001), se analizaron las OTUs más abundantes de este grupo taxonómico (un total de 10) en las 28 muestras. Para ello, se empleó el análisis multivariado conocido como CABFAC, el cual dividió cada Phylum en cuatro factores, y entre estos se consideraron significativos aquellos que presentaron valores de 0.7 – 0.9, y se descartaron a aquellos que obtuvieron valores ≤ 0.6 (tres muestras). Posteriormente, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) a las muestras con valores significativos del paso anterior (25 muestras), y del apartado de “*Loadings*” de este análisis, fueron seleccionadas aquellos OTUs que presentaron valores significativos (0.7 – 0.9).

Los OTUs significativos fueron cinco: *Fungi*, *Pseudomonadota*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota* y *Evosea*. Al emplear los datos de estos OTUs en las 28 muestras, se realizó otro PCA (*loadings*), por el cual se determinaron los Componentes Principales (PC, por sus siglas en inglés), y se graficaron por *scatterplot* aquellos componentes cuya suma abarcaran el 90% del total (*Fungi* y *Pseudomonadota*) (Cuadro 1; Figura 18).

Cuadro 1. Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Phylum.

PC	Eigenvalue	% variance
<i>Fungi</i>	6.84E+06	87.559
<i>Pseudomonadota</i>	853899	10.933
<i>Actinomycetota</i>	68272.6	0.87415
<i>Bacteroidota</i>	36533.9	0.46777
<i>Evosea</i>	12961.6	0.16596

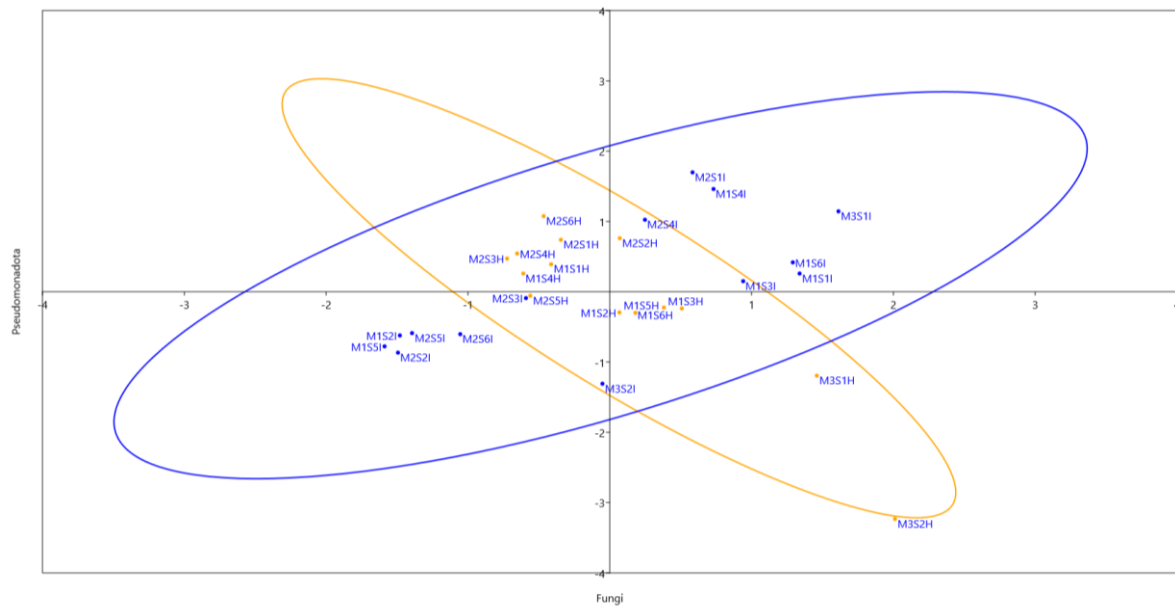


Figura 18. Gráfico de Dispersión (Phylum). La mayoría de los datos se mantienen dentro de ambas elipses, lo cual nos indica que no hay mucha disparidad entre estos.

9.4.2. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Clase

Al igual que en el caso anterior, se analizaron las OTUs más abundantes de este grupo taxonómico (un total de 10) en las 28 muestras. Para ello, se empleó el análisis multivariado conocido como CABFAC, el cual dividió cada Clase en cuatro factores, y entre estos se consideraron significativos aquellos que presentaron valores de 0.7 – 0.9, y se descartaron a aquellos que obtuvieron valores ≤ 0.6 (tres muestras). Posteriormente, se realizó un Análisis de Componentes Principales a las muestras con valores significativos del paso anterior (25 muestras), y del apartado de “*Loadings*” de este análisis, fueron seleccionadas aquellos OTUs que presentaron valores significativos (0.7 – 0.9).

Los OTUs significativos fueron cuatro: *Ascomycota*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Flavobacteriia*. Al emplear los datos de estos OTUs en las 28 muestras, se realizó otro PCA (*loadings*), por el cual se determinaron los Componentes Principales, y se graficaron por *scatterplot* aquellos componentes cuya suma abarcaran el 90% del total (*Ascomycota* y *Alphaproteobacteria*) (Cuadro 2; Figura 19).

Cuadro 2. Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Clase.

PC	Eigenvalue	% variance
<i>Ascomycota</i>	4.81E+06	87.311
<i>Alphaproteobacteria</i>	474253	8.6162
<i>Gammaproteobacteria</i>	194207	3.5283
<i>Flavobacteria</i>	29950.2	0.54413

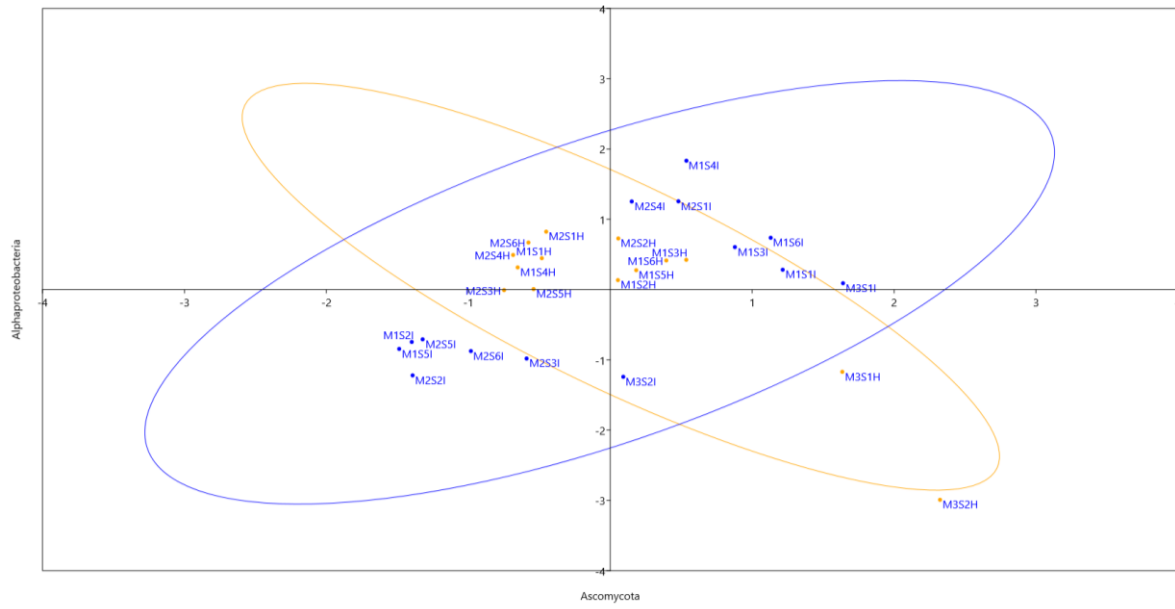


Figura 19. Gráfico de Dispersión (Clase). La mayoría de los datos se mantienen dentro de ambas elipses, lo cual nos indica que no hay mucha disparidad entre estos.

9.4.3. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Familia

Al igual que en los grupos taxonómicos anteriores, se analizaron las OTUs más abundantes de este grupo taxonómico (un total de 20) en las 28 muestras conseguidas. Para ello, se empleó el análisis multivariado conocido como CABFAC, el cual dividió cada Familia en cuatro factores, y entre estos se consideraron significativos aquellos que presentaron valores de 0.7 – 0.9, y se descartaron a aquellos que obtuvieron valores ≤ 0.6 (cuatro muestras). Posteriormente, se realizó un Análisis de Componentes Principales a las muestras con valores significativos del paso anterior (24 muestras), y del apartado de “*Loadings*” de este análisis, fueron seleccionadas aquellos OTUs que presentaron valores significativos (0.7 – 0.9).

Los OTUs significativos fueron ocho: *Saccharomycetaceae*, *Bartonellaceae*, *Dictyosteliaceae*, *Vibrionaceae*, *Streptomycetaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Synechococcaceae* y *Prevotellaceae*. Al emplear los datos de estos OTUs en las 28 muestras, se realizó otro PCA (*loadings*), por el cual se determinaron los Componentes Principales, y se graficaron por *scatterplot* aquellos componentes cuya suma abarcaran el 90% del total (*Saccharomycetales* y *Bartonellaceae*) (Cuadro 3; Figura 20).

Cuadro 3. Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Familia.

PC	Eigenvalue	% variance
<i>Saccharomycetaceae</i>	2.50E+06	75.558
<i>Bartonellaceae</i>	451705	13.661
<i>Vibrionaceae</i>	218053	6.5948
<i>Synechococcaceae</i>	85132.5	2.5747
<i>Streptomycetaceae</i>	33034.9	0.99911

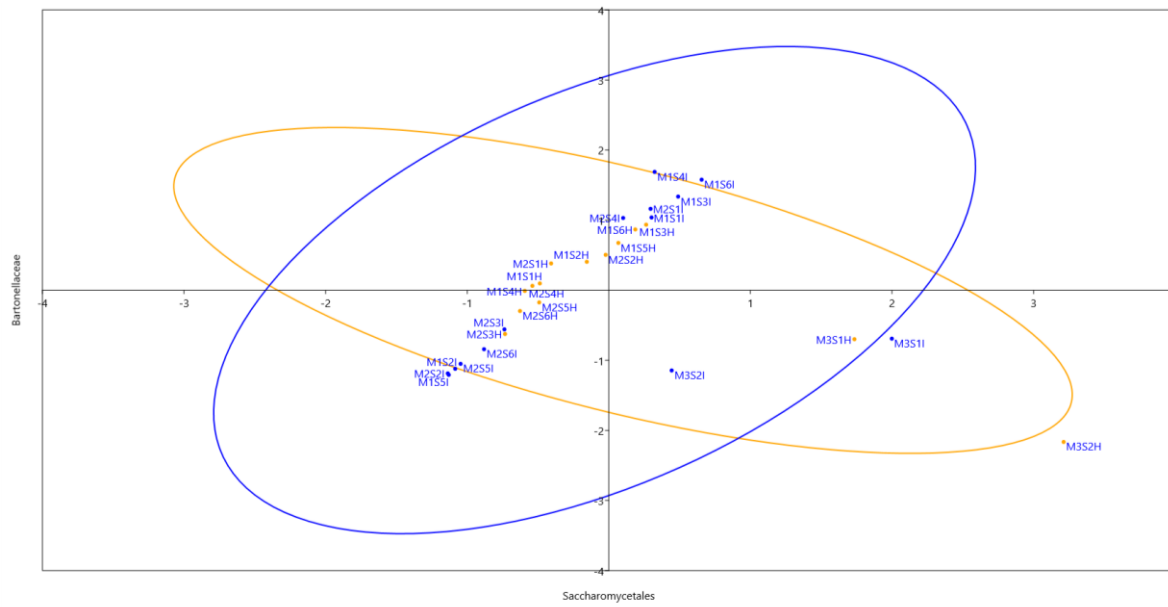


Figura 20. Gráfico de Dispersión (Familia). La mayoría de los datos se mantienen dentro de ambas elipses, lo cual nos indica que no hay mucha disparidad entre estos.

9.4.4. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Género

Se analizaron las OTUs más abundantes de este grupo taxonómico (un total de 40) en las 28 muestras conseguidas. Para ello, se empleó el análisis multivariado conocido como CABFAC, el cual dividió cada Género en cuatro factores, y entre estos se consideraron significativos aquellos que presentaron valores de 0.7 – 0.9, y se descartaron a aquellos que obtuvieron valores ≤ 0.6 (seis muestras). Posteriormente, se realizó un Análisis de Componentes Principales a las muestras con valores significativos del paso anterior (22 muestras), y del apartado de “*Loadings*” de este análisis, fueron seleccionadas aquellos OTUs que presentaron valores significativos (0.7 – 0.9).

Los OTUs significativos fueron seis: *Saccharomyces*, *Bartonella*, *Synechococcus*, *Betacoronavirus*, *Klebsiella* y *Gimesia*. Al emplear los datos de estos OTUs en las 28 muestras, se realizó otro PCA (*loadings*), por el cual se determinaron los Componentes Principales, y se graficaron por *scatterplot* aquellos componentes cuya suma abarcaran el 90% del total (*Saccharomyces*, *Bartonella* y *Betacoronavirus*) (Cuadro 4; Figura 21).

Cuadro 4. Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Género.

PC	Eigenvalue	% variance
<i>Saccharomyces</i>	1.64E+06	72.71
<i>Bartonella</i>	415147	18.442
<i>Betacoronavirus</i>	111378	4.9478
<i>Synechococcus</i>	76236.7	3.3867
<i>Gimesia</i>	7945.47	0.35297
<i>Klebsiella</i>	3602.29	0.16003

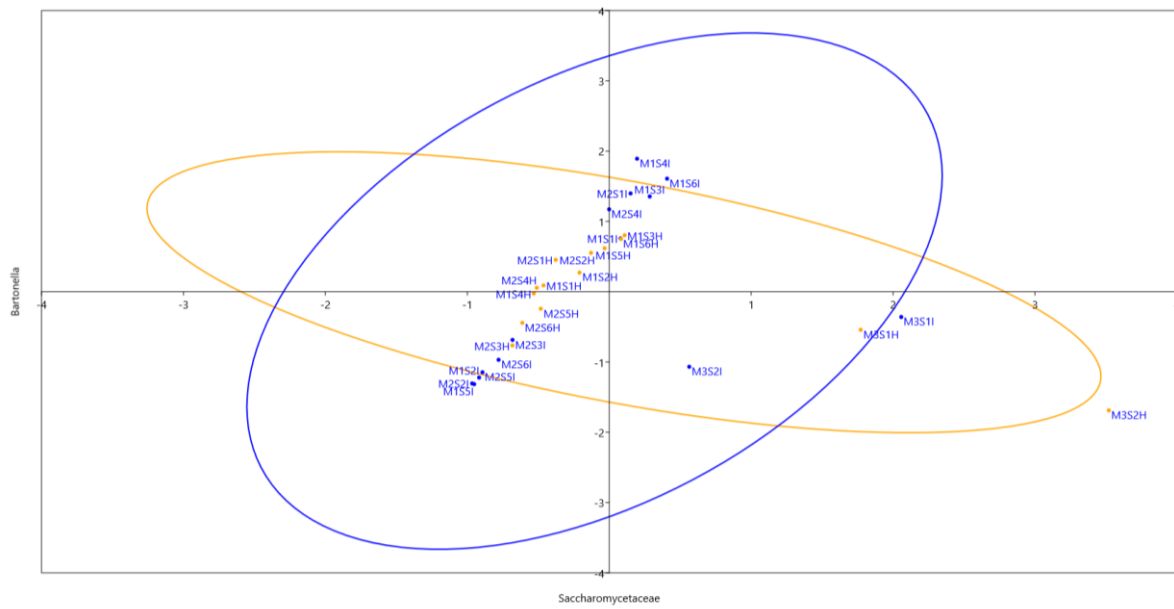


Figura 21. Gráfico de Dispersión (Género). La mayoría de los datos se mantienen dentro de ambas elipses, lo cual nos indica que no hay mucha disparidad entre estos.

9.4.5. Análisis de Componentes Principales (PCA) a nivel de Especie

Se analizaron las OTUs más abundantes de este grupo taxonómico (un total de 120) en las 28 muestras conseguidas. Para ello, se empleó el análisis multivariado conocido como CABFAC, el cual dividió cada Especie en cuatro factores, y entre estos se consideraron significativos aquellos que presentaron valores de 0.7 – 0.9, y se descartaron a aquellos que obtuvieron valores ≤ 0.6 (tres muestras). Posteriormente, se realizó un Análisis de Componentes Principales a las muestras con valores significativos del paso anterior (25 muestras), y del apartado de “Loadings” de este análisis, fueron seleccionadas aquellos OTUs que presentaron valores significativos (0.7 – 0.9).

Los OTUs significativos fueron nueve: *Bartonella krasnovii*, *Saccharomyces* spp., *Betacoronavirus*, *Streptomyces* sp. ICC1, *Photobacterium damsela*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio harveyi*, *Streptomyces armeniacus* y *Phocaeicola dorei*. Al emplear los datos de estos OTUs en las 28 muestras, se realizó otro PCA (loadings), por el cual se determinaron los Componentes Principales, y se graficaron por *scatterplot* aquellos componentes cuya suma abarcaran el 90% del total (*Saccharomyces* spp., *Bartonella krasnovii*, *Betacoronavirus*, *Photobacterium damsela*) (Cuadro 5; Figura 22).

Cuadro 5. Resumen del análisis multivariado PCA a nivel Especie.

PC	Eigenvalue	% variance
<i>Saccharomyces</i> spp.	2.17E+06	68.13
<i>Bartonella_krasnovii</i>	459403	14.418
<i>Betacoronavirus</i>	209074	6.5615
<i>Photobacterium_damselae</i>	115459	3.6235
<i>Vibrio_harveyi</i>	66185.2	2.0771
<i>Phocaeicola_dorei</i>	39247.7	1.2317
<i>Streptomyces</i> _sp._ <i>ICC1</i>	38122.5	1.1964
<i>Klebsiella_pneumoniae</i>	23012.5	0.72221
<i>Streptomyces_armeniacus</i>	21132.1	0.6632

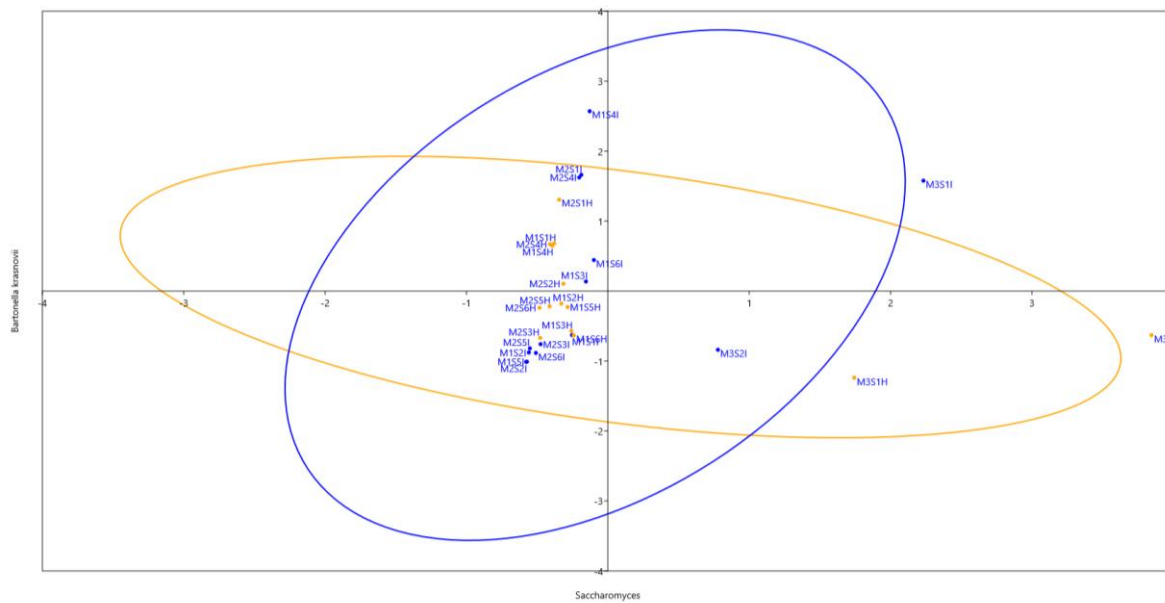


Figura 22. Gráfico de Dispersión (Especie). La mayoría de los datos se mantienen dentro de ambas elipses, lo cual nos indica que no hay mucha disparidad entre estos.

En el análisis de componentes principales para los distintos niveles taxonómicos se observaron diferencias estadísticas significativas para algunos taxones que se indican en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Componentes Principales de los diferentes niveles taxonómicos.

Nivel taxonómico	<i>p</i>	Componentes Principales
Phylum	<i>p</i> = 0.007	<i>Fungi</i> , <i>Pseudomonadota</i> , <i>Actinomycetota</i> , <i>Bacteroidota</i> y <i>Evosea</i>
Clase	<i>p</i> = 0.0272	<i>Ascomycota</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> y <i>Flavobacteriia</i> .
Familia	<i>p</i> = 0.0124	<i>Saccharomycetales</i> , <i>Bartonellaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> , <i>Synechococcaceae</i> , <i>Streptomycetaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Dictyosteliaceae</i> .
Género	<i>p</i> = 0.0075	<i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Bartonella</i> , <i>Coronaviridae</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Gimesia</i> y <i>Klebsiella</i> .
Especie	<i>p</i> = 0.0302	<i>Saccharomyces</i> spp., <i>Bartonella krasnovii</i> , <i>Betacoronavirus</i> , <i>Photobacterium damsela</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Phocaeicola dorei</i> , <i>Streptomyces</i> sp. ICC1, <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Streptomyces armeniacus</i> .

9.4.2. Análisis Permutacional de Varianza (PERMANOVA)

Se realizó el análisis PERMANOVA (Hammer et al., 2001) con los cinco niveles taxonómicos bajo estudio (Phylum, Clase, Familia, Género y Especie) (Cuadro 7). En promedio, con excepción de Phylum, se obtuvo un valor de F (distribución de Fischer) menor a tres en cada nivel taxonómico (Clase (2.957), Familia (2.682), Género (2.872), Especie (2.695)), indicándonos una gran variabilidad en las muestras estudiadas (Anderson, 2014). En lo que respecta a Phylum, se obtuvo un valor mayor a tres (3.578), siendo aún aceptable. El valor p se mantuvo significativo entre los demás niveles taxonómicos, es decir, menor a 0.05 (Phylum (0.0296), Clase (0.0469), Género (0.0413), Especie (0.0393), con excepción de Familia (0.0557); esto en base al estudio de los dos órganos de camarón (intestino y hepatopáncreas).

Cuadro 7. Resultados del análisis PERMANOVA en los diferentes niveles taxonómicos.

Nivel taxonómico	Permutation N	Total sum of squares	Within-group sum of squares	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Phylum	9999	3.283	2.886	3.578	0.0296
Clase	9999	3.318	2.98	2.957	0.0469
Familia	9999	3.871	3.509	2.682	0.0557
Género	9999	4.085	3.679	2.872	0.0413
Especie	9999	4.274	3.872	2.695	0.0393

9.4.3. Análisis de Similitud (ANOSIM)

El análisis ANOSIM encontró una diferencia estadística significativa entre los niveles taxónomicos (Phylum, Clase, Familia, Género y Especie), es decir, un valor de $p < 0.05$, además de un coeficiente de correlación promedio de $r = 0.1185$, la cual nos indica que no hay una relación lineal entre las variables (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de ANOSIM en diferentes niveles taxonómicos.

Nivel taxonómico	Permutation N	Mean rank within	Mean rank between	<i>R</i>	<i>p</i> (same)
Phylum	9999	174.8	203.1	0.1498	0.0069
Clase	9999	177.7	200.4	0.1202	0.0173
Familia	9999	178.6	199.6	0.1112	0.0211
Género	9999	178.6	199.6	0.1107	0.022
Especie	9999	179.6	198.7	0.1007	0.0266

9.4.4. Análisis de Similitud Porcentual (SIMPER)

Se realizó el análisis SIMPER, donde se determinaron los taxones con mayor contribución ($\geq 60\%$), tomando estos con un orden descendente de cada nivel taxonómico entre aquellas que ya representaban la mayoría del total de la carga ($\geq 60\%$).

En Phylum, los taxones principales, entre los más abundantes, fueron *Fungi* (24.44%), *Pseudomonadota* (20.06%), *Bacillota* (12.56%) y *Apicomplexa* (11.73%). En Clase, destacaron *Ascomycota* (26.8%), *Gammaproteobacteria* (12.79%), *Aconoidasida* (11.48%) y *Alphaproteobacteria* (10.38%). En Familia, los más abundantes fueron *Saccharomycetaceae* (17.15%), *Plasmodiidae* (12.52%), *Bartonellaceae* (10.05%), *Trypanosomatidae* (6.112%) y *Dictyosteliaceae* (5.21%), entre otros. En Género, los de mayor abundancia fueron *Plasmodium* (11.77%), *Saccharomyces* (11.71%), *Bartonella* (9.401%), *Dictyostelium* (4.93%), *Coronaviridae* (4.196%), entre otros. En Especie, los de mayor presencia fueron *Bartonella krasnovii* (9.166%), *Saccharomyces* spp. (6.974%), *Dictyostelium discoideum* (4.809%), *Betacoronavirus* (4.105%), *Moorena producens* (3.775%), entre otros. Esta información puede verse resumida en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados de SIMPER, empleando los taxones que representaron una contribución a la población $\geq 60\%$, en los diferentes niveles taxonómicos.

Nivel taxonómico	Taxon	Av. dissim	Contrib. %	Cumulative %	Mean Hepatopancreas	Mean Intestino
PHYLUM	Fungi	10.95	24.44	24.44	3.44E+03	2.98E+03
	Pseudomonadota	8.991	20.06	44.5	2.71E+03	2.89E+03
	Bacillota	5.631	12.56	57.07	1.74E+03	1.53E+03
	Apicomplexa	5.257	11.73	68.8	1.59E+03	1.41E+03
CLASE	Ascomycota	12.05	26.8	26.8	3.10E+03	2.68E+03
	Gammaaproteobacteria	5.749	12.79	39.59	1.39E+03	1.43E+03
	Aconoidasida	5.158	11.48	51.07	1.27E+03	1.13E+03
	Alphaproteobacteria	4.667	10.38	61.45	1.01E+03	1.15E+03
FAMILIA	Saccharomycetales	8.515	17.15	17.15	1.68E+03	1.38E+03
	Plasmodiidae	6.217	12.52	29.67	1.21E+03	1.07E+03
	Bartonellaceae	4.99	10.05	39.71	674	743
	Trypanosomatidae	3.035	6.112	45.83	625	540
	Dictyosteliaceae	2.587	5.21	51.04	499	412
	Vibrionaceae	2.494	5.022	56.06	301	471
	Synechococcaceae	2.209	4.448	60.51	68.9	331
GÉNERO	Plasmodium	6.095	11.77	11.77	1.21E+03	1.07E+03
	Saccharomycetaceae	6.066	11.71	23.48	1.17E+03	910
	Bartonella	4.869	9.401	32.88	674	743
	Dictyostelium	2.554	4.93	37.81	499	412
	Coronaviridae	2.174	4.196	42	281	12
	Synechococcus	2.144	4.139	46.14	67.7	329
	Moorena	2.023	3.906	50.05	349	204
	Leishmania	1.952	3.768	53.82	422	352
	Vibrio	1.807	3.489	57.31	270	289
	Streptomyces	1.662	3.208	60.51	358	213
ESPECIE	Bartonella_krasnovii	4.891	9.166	9.166	662	733
	Saccharomyces	3.721	6.974	16.14	667	458
	Dictyostelium_discoideum	2.566	4.809	20.95	499	412
	Betacoronavirus	2.191	4.105	25.05	279	10.7
	Moorena_producens	2.014	3.775	28.83	349	204
	Candida	1.395	2.614	31.44	279	267
	Pyricularia	1.143	2.142	33.59	240	181
	Plasmodium_malariae	1.134	2.125	35.71	215	194
	Fusarium	1.105	2.07	37.78	244	233
	Trypanosoma_brucei	1.083	2.03	39.81	203	188
	Prevotella_ruminicola	0.9618	1.803	41.61	172	97.6
	Synechococcus_sp._WH_8101	0.9426	1.767	43.38	18.6	131
	Cutibacterium_acnes	0.8669	1.625	45	106	2.29
	Talaromyces	0.7875	1.476	46.48	155	144
	Synechococcus_sp._RS9909	0.7843	1.47	47.95	14.9	110
	Aspergillus	0.7806	1.463	49.41	161	152
	Botrytis	0.7346	1.377	50.79	144	144
	Plasmodium_yoelii	0.712	1.334	52.13	138	115
	Puccinia	0.7039	1.319	53.44	152	138
	Streptomyces_sp._ICC1	0.6836	1.281	54.73	117	54.5
	Naumovozyma	0.6338	1.188	55.91	124	113
	Photobacterium_damselae	0.626	1.173	57.09	8.64	152
	Vibrio_parahaemolyticus	0.6204	1.163	58.25	27.1	106
	Tetrapisispora	0.5968	1.119	59.37	109	105
	Leishmania_mexicana	0.5854	1.097	60.47	126	110

X. DISCUSIÓN

10.1. Ascomycota como la clase más abundante

Ascomycota resultó ser la clase más abundante en el presente proyecto, con más de una cuarta parte del total (entre las principales 10), y superando por más del doble a la clase que ocupa la siguiente posición (*Gammaproteobacteria*). Esta clase de hongos son ubicuos y cosmopolitas, tanto los patógenos como los endófitos, en plantas y animales (Binur et al., 2021). Respecto a camarones, cuando hay una sobrerrepresentación de estos microorganismos, son causantes de diversas patologías, como la enfermedad de branquias negras (Iqbal et al., 2023) y el síndrome de heces blancas (Dai et al., 2019), así como un retraso en el crecimiento de los camarones infectados (Dai et al., 2017). A pesar de lo anterior, los ejemplares muestreados en el presente proyecto no tenían signos de estar enfermos.

En un estudio realizado en China, por Li et al., en 2019, se analizó la microbiota intestinal y la de hepatopáncreas, a partir de ejemplares enfermos y sanos. En ambos casos, *Ascomycota* resultó ser el filo más abundante, siendo mayor su presencia entre camarones sanos, en comparación a sus contrapartes con alguna patología.

10.2. Análisis de α -Diversidad

Por medio de PAST (v.4.03), se analizaron los índices de diversidad de los niveles taxonómicos bajo estudio, manteniéndose un enfoque en los índices “Dominancia” y “Shannon”, para determinar si hay taxones dominantes y saber cuánta diversidad hay en cada nivel taxonómico, respectivamente.

10.2.1. Índices de Dominancia y Shannon en Phylum

En las muestras de hepatopáncreas, los valores de dominancia fueron consistentemente bajos (con un promedio de 0.1419), indicando ausencia de dominancia en la comunidad microbiana de este órgano del camarón. Esto sugiere una distribución más equitativa entre los Phylums presentes, siendo típico en ecosistemas equilibrados y saludables. En términos de microbiota de camarón, esto

puede reflejar una comunidad estable en hepatopáncreas, posiblemente beneficiada por condiciones ambientales o prácticas de cultivo óptimas.

Los valores de Shannon mantuvieron un promedio moderadamente alto (2.334), indicándonos una diversidad microbiana significativa en estas comunidades, con una mezcla de diferentes especies. Pese a que estos valores no son extremadamente altos (por ejemplo, mayores a tres, valores típicos de ecosistemas muy diversos), los valores observados son representativos de una comunidad moderadamente compleja. Su estabilidad también sugiere que las condiciones de la muestra en diferentes muestreos son bastante homogéneas y no presentan grandes alteraciones.

En resumen, métricas de Dominancia baja y Shannon moderado nos indican comunidades microbianas con diversidad relativamente equilibrada, sin que estén dominados por un número pequeño de filos. Esto puede significar un ecosistema microbiano funcional y saludable en los camarones.

Por otra parte, en cuanto a las muestras intestinales, la microbiota mostró métricas de dominancia con un promedio similar al de hepatopáncreas (0.1491), manteniéndose en un rango bajo, lo que sugiere una comunidad microbiana equilibrada y con baja dominancia en general.

En cuanto al índice Shannon, el promedio fue ligeramente menor al de hepatopáncreas (2.3117). En general, estos valores se mantienen moderados, pese a la ligera disminución en la diversidad, en comparación con las muestras de hepatopáncreas, indicándonos una diversidad microbiana menor.

En general, los valores de dominancia en intestino fueron un poco más variables, y mayores que hepatopáncreas. Esto podría deberse a la presencia de microorganismos especializados, como aquellos involucrados en la digestión. Además, el intestino podría tener una interacción más directa con la dieta y el ambiente, pudiendo influir en la composición de microbiota, permitiendo un grado de dominancia por ciertas especies asociadas al alimento.

En cuanto al promedio de valores del índice Shannon, los resultados mostraron que ambos órganos de camarón tienen diversidad moderada, aunque en

intestinos fue un poco menor este valor, lo cual podría reflejar una comunidad más especializada en este órgano, debido a la funcionalidad digestiva, en contraste con la comunidad del hepatopáncreas, más equilibrada y diversa, con roles más generales en el metabolismo del organismo.

10.2.2. Índices de Dominancia y Shannon en Clase

En las muestras de hepatopáncreas, el promedio de dominancia fue consistentemente bajo (0.091), indicando ausencia de dominancia en la comunidad microbiana de este órgano, sugiriendo una distribución más equitativa entre las clases presentes, siendo lo común en ecosistemas equilibrados y saludables. En términos de microbiota de camarón, esto puede indicar una comunidad estable en hepatopáncreas, posiblemente beneficiada por condiciones ambientales o prácticas de cultivo óptimas.

Los valores de Shannon mantuvieron un promedio alto (2.879), indicándonos una diversidad microbiana significativa en estas comunidades, con una mezcla diversa de microorganismos. Pese a que estos valores no son mayores que tres, los valores observados nos indican una comunidad moderadamente compleja.

Al igual que en Phylum, los valores de Dominancia baja y Shannon moderado nos indican comunidades microbianas con diversidad relativamente equilibrada, sin que estén dominados por un pequeño grupo de clases, lo equivalente a un ecosistema microbiano funcional y saludable en los camarones.

Por otra parte, en cuanto a las muestras intestinales, la microbiota mostró métricas de dominancia con un promedio ligeramente mayor al de hepatopáncreas (0.095), manteniéndose en un rango bajo, lo que sugiere una comunidad microbiana equilibrada y con baja dominancia en general.

En cuanto al índice Shannon, el promedio fue ligeramente menor al de hepatopáncreas (2.873). En general, estos valores se mantienen moderados, pese a la ligera disminución en la diversidad, en comparación con las muestras de hepatopáncreas, indicándonos una diversidad microbiana menor.

En general, el promedio de dominancia en intestino fueron un poco mayor que hepatopáncreas. Esto fortalece la hipótesis de la presencia de microorganismos especializados en intestino, especialmente aquellos involucrados en la digestión, la dieta y el ambiente, con influencia en la composición de la microbiota.

En cuanto al promedio de valores del índice Shannon, los resultados mostraron que ambos órganos de camarón tienen diversidad moderada, aunque en intestinos fue un poco menor este valor, lo cual podría reflejar una comunidad más especializada en este órgano, debido a la funcionalidad digestiva, en contraste con la comunidad del hepatopáncreas, más equilibrada y diversa, con roles más generales en el metabolismo del organismo.

10.2.3. Índices de Dominancia y Shannon en Familia

En las muestras de hepatopáncreas, el promedio de dominancia fue consistentemente bajo (0.0491), indicando minúscula dominancia en la comunidad microbiana de este órgano, sugiriendo una distribución más equitativa entre las familias presentes, lo que es frecuente en ecosistemas equilibrados y saludables. En términos de microbiota de camarón, esto puede indicar una comunidad estable en hepatopáncreas, posiblemente beneficiada por condiciones ambientales o prácticas de cultivo óptimas.

Los valores de Shannon mantuvieron un promedio alto (3.675), indicándonos una diversidad microbiana amplia en estas comunidades, con una mezcla diversa de microorganismos. Este valor, al ser mayor que tres, nos indica una comunidad compleja.

A diferencia de los niveles taxonómicos previos, los valores de Dominancia baja y Shannon altos (con un valor por encima de tres), nos indican comunidades microbianas con mucha diversidad, pero sin familias dominantes, lo cual podría poner en duda que sea un ecosistema microbiano completamente funcional y saludable en los camarones. Se requiere más investigación para contrastar esta aseveración.

Por su parte, en las muestras intestinales, la microbiota mostró métricas de dominancia con un promedio ligeramente mayor al de hepatopáncreas (0.0551),

manteniéndose en un rango bajo, lo que sugiere equilibrio en la comunidad microbiana, además de baja dominancia en general.

En cuanto al índice Shannon, el promedio fue ligeramente menor al de hepatopáncreas (3.661), pero manteniéndose elevado, en comparación con niveles taxonómicos anteriores. A pesar de la alta diversidad en ambas muestras, éstas se mantuvieron con diferencias significativas.

En general, el promedio de dominancia en intestino fue ligeramente mayor que en hepatopáncreas. Esto fortalece la hipótesis de la presencia de microorganismos especializados en intestino, especialmente aquellos involucrados en la digestión, la dieta y el ambiente, con influencia en la composición de la microbiota.

En cuanto al promedio de valores del índice Shannon, los resultados mostraron que ambos órganos de camarón tienen amplia diversidad, aunque en intestinos fue un poco menor este valor, lo cual podría reflejar una comunidad más especializada en este órgano, debido a la funcionalidad digestiva, en contraste con la comunidad del hepatopáncreas, más equilibrada y diversa, con roles más generales en el metabolismo del organismo.

10.2.4. Índices de Dominancia y Shannon en Género

En las muestras de hepatopáncreas, el promedio de dominancia fue consistentemente bajo (0.05), indicando poca dominancia en la comunidad microbiana de este órgano, sugiriendo una distribución más equitativa entre los géneros presentes, lo que es frecuente en ecosistemas equilibrados y saludables. En términos de microbiota de camarón, esto puede indicar una comunidad estable en hepatopáncreas, posiblemente beneficiada por condiciones ambientales o prácticas de cultivo óptimas.

Los valores de Shannon mantuvieron un promedio alto (3.7235), indicándonos una diversidad microbiana amplia en estas comunidades, con una mezcla diversa de microorganismos. Este valor, al ser mayor que tres, nos indica una comunidad compleja.

Al igual que en Familia, los valores de Dominancia baja y Shannon altos (con un valor por encima de tres), nos sugieren comunidades microbianas con mucha diversidad, pero sin géneros dominantes.

Mientras tanto, en las muestras intestinales, la microbiota mostró métricas de dominancia con un promedio ligeramente mayor al de hepatopáncreas (0.0613), manteniéndose en un rango bajo, lo que sugiere equilibrio en la comunidad microbiana, además de baja dominancia en general.

En cuanto al índice Shannon, el promedio fue apenas menor al de hepatopáncreas (3.658), pero manteniéndose elevado, al igual que en las muestras con familia. A pesar de la alta diversidad en ambas muestras, éstas se mantuvieron con diferencias significativas.

En general, el promedio de dominancia en intestino fue un poco mayor que hepatopáncreas. Esto fortalece la hipótesis de la presencia de microorganismos especializados en intestino, especialmente aquellos involucrados en la digestión, la dieta y el ambiente, con influencia en la composición de la microbiota.

En cuanto al promedio de valores del índice Shannon, los resultados mostraron que ambos órganos de camarón tienen alta diversidad, aunque en intestinos fue un poco menor este valor, lo cual podría reflejar una comunidad más especializada en este órgano, debido a la funcionalidad digestiva, en contraste con la comunidad de hepatopáncreas, más equilibrada y diversa, con roles más generales en el metabolismo del organismo.

10.2.5. Índices de Dominancia y Shannon en Especie

En las muestras de hepatopáncreas, el promedio de dominancia fue consistentemente bajo (0.0425), indicando poca dominancia en la comunidad microbiana de este órgano, sugiriendo una distribución más equitativa entre las especies presentes, lo que es frecuente en ecosistemas equilibrados y saludables. En términos de microbiota de camarón, esto puede indicar una comunidad estable en hepatopáncreas, posiblemente beneficiada por condiciones ambientales o prácticas de cultivo óptimas.

Los valores de Shannon mantuvieron un promedio alto (3.9975), indicándonos una gran diversidad microbiana en estas comunidades, con una mezcla diversa de microorganismos. Este valor, al ser mayor que tres, nos indica una comunidad compleja.

Al igual que en Familia y Género, los valores de Dominancia baja y Shannon altos (con un valor por encima de tres), nos sugieren comunidades microbianas con mucha diversidad, pero sin especies dominantes. Por otra parte, en las muestras intestinales, la microbiota mostró métricas de dominancia con un promedio mayor al de hepatopáncreas (0.047), manteniéndose en un rango bajo, lo que sugiere equilibrio en la comunidad microbiana, además de baja dominancia en general.

En cuanto al índice Shannon, el promedio fue menor al de hepatopáncreas (3.927), pero manteniéndose elevado, al igual que en las muestras con familia. A pesar de la alta diversidad en ambas muestras, éstas se mantuvieron con diferencias significativas.

En general, el promedio de dominancia en intestino fue ligeramente mayor que en hepatopáncreas. Esto fortalece la hipótesis de la presencia de microorganismos especializados en intestino, especialmente aquellos involucrados en la digestión, la dieta y el ambiente, con influencia en la composición de la microbiota.

En cuanto al promedio de valores del índice Shannon, los resultados mostraron que ambos órganos de camarón tienen alta diversidad, aunque en intestinos fue un poco menor este valor, lo cual podría reflejar una comunidad más especializada en este órgano, debido a la funcionalidad digestiva, en contraste con la comunidad del hepatopáncreas, más equilibrada y diversa, con roles más generales en el metabolismo del organismo.

XI. CONCLUSIONES

11.1 Conclusión general

En los niveles taxonómicos de Phylum, Clase, Familia, Género y Especie, los hongos y las bacterias fueron los que estuvieron mejor representados en la microbiota intestinal y de hepatopáncreas, ocupando siempre los primeros 3 sitios de mayor abundancia relativa. La clase más abundante fue *Ascomycota* (contribución de 26%).

11.2 Conclusiones específicas

1. Los taxones más significativos a nivel Phylum, en hepatopáncreas e intestino, fueron *Fungi*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota* y *Eveosea* (PCA). Adicionalmente, *Bacillota* y *Apicomplexa* (SIMPER).
2. Los taxones más significativos a nivel de Especie fueron *Saccharomyces* spp., *Bartonella krasnovii*, *Betacoronavirus*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio harveyi*, *Phocaeicola dorei*, *Streptomyces* sp. ICC1, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptomyces armeniacus*. Asimismo, se identificaron secuencias correspondientes a especies de protozoarios: *P. malariae*, *T. brucei* (PCA). Además de los anteriores, *Moorena producens*, *Prevotella ruminicola*, *Cutibacterium acnes*, *Aspergiullus* spp., y *Leishmania mexicana*, entre otros (SIMPER).
3. La microbiota de intestino y hepatopáncreas de los camarones bajo estudio presenta una diversidad microbiana que varía de alta a moderada en cada uno de los niveles taxonómicos analizados, reflejando un equilibrio en la comunidad.
4. Se encontraron secuencias correspondientes a microorganismos con potencial patogénico y epidemiológico. Entre ellos, *Candida* spp., *K. pneumoniae*, *B. krasnovii*, *V. parahaemolyticus*, entre otros.

XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Con base a la presente investigación y el potencial que ésta posee, se destacan los siguientes estudios que podrían derivar de éste:

- Estudiar los movilomas, resistomas y virulomas de importancia para la salud pública, presentes en los metagenomas del camarón.
- Ampliar el estudio incluyendo granjas del norte y del sur del estado de Sinaloa.
- Realizar estudios metagenómicos a otros productos marinos asociados con eventos de importancia en salud pública en nuestro estado, para una mejor comprensión de los riesgos epidemiológicos actuales y futuros, contribuyendo a la implementación de estrategias efectivas para su prevención y control.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Actualización de la Carta Nacional Acuícola, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Ciudad de México, DOF, 15 de Abril del 2021, [citado el 17 de febrero del 2023]; disponible en versión PDF en internet: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/630145/DOF -
Diario Oficial de la Federaci n CNA.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/630145/DOF_-_Diario_Oficial_de_la_Federaci_n_CNA.pdf)
- Afreen, M., & Bağdatlı, İ. (2021). Food-borne pathogens in seafood. *Eurasian Journal of Agricultural Research*, 5(1), 44-58.
- Aguilar Sánchez, V. (2022). *Selection of Aptamers against Pathogenic Bacteria of Interest in Aquaculture and Public Health* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Ali, A. A., Altemimi, A. B., Alhelfi, N., & Ibrahim, S. A. (2020). Application of biosensors for detection of pathogenic food bacteria: a review. *Biosensors*, 10(6), 58.
- Anderson, M. J. (2014). Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). *Wiley statsref: statistics reference online*, 1-15.
- Angthong, P., Uengwetwanit, T., Pootakham, W., Sittikankaew, K., Sonthirod, C., Sangsrakru, D., ... & Karoonuthaisiri, N. (2020). Optimization of high molecular weight DNA extraction methods in shrimp for a long-read sequencing platform. *PeerJ*, 8, e10340.
- Barbosa, L. J., Ribeiro, L. F., Lavezzo, L. F., Barbosa, M. M. C., Rossi, G. A. M., & Do Amaral, L. A. (2016). Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street markets. *Letters in Applied Microbiology*, 62(5), 372-378.
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS microbiology*, 3(3), 529.
- Binur, R., Pugeg Aryantha, N. P. & Suantika, G. (2021). Nutritional profiling of microfungi and its effects on the growth performance, bacterial communities, and survival with *Vibrio harveyi* on the white shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*). *Elsevier, Aquaculture*.

- Cheng, Y., Ge, C., Li, W., & Yao, H. (2021). The intestinal bacterial community and functional potential of *Litopenaeus vannamei* in the coastal areas of china. *Microorganisms*, 9(9), 1793.
- Cisneros Quezada, L. A., & Feijóo Aponte, K. M. (2020). *Evaluación de dos métodos para la extracción de ADN de hepatopáncreas e intestino de camarón (Penaeus vannamei), provenientes de piscinas camaroneras de la zona sur del país* (Bachelor's thesis).
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150-1173.
- Dai, W., Qiu, Q., Chen, J., & Xiong, J. (2019). Gut eukaryotic disease-discriminatory taxa are indicative of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) white feces syndrome. *Elsevier, Aquaculture*.
- Dai, W., Yu, W., Zhang, J., Tao, Z., & Xiong, J. (2017). The gut eukaryotic microbiota influences the growth performance among cohabitating shrimp. *Springer*.
- FAO. (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul*. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Flores, C. A. O. (2021). Turismo gastronómico. Una alternativa para el desarrollo local de Bahía de Kino, Sonora.
- García-López, R., Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Sánchez-López, F., Cota-Huizar, A., Sotelo-Mundo, R. R.,... & Ochoa-Leyva, A. (2020). Doing more with less: A comparison of 16S hypervariable regions in search of defining the shrimp microbiota. *Microorganisms*, 8(1), 134.
- Garibay-Valdez, E., Martínez-Porchas, M., Calderón, K., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., & Arvayo, M. A. (2020). La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte. *Biotecnia*, 22(1), 5-16.

- Grano-Maldonado, M. I., & Mendieta-Vega, R. A. (2019). Parasitosis, turismo gastronómico e identidades alimentarias: un problema de salud pública en Mazatlán, Sinaloa, México. *Neotropical Helminthology*, 13(2).
- He, Z., Pan, L., Zhang, M., Zhang, M., Huang, F., & Gao, S. (2020). Metagenomic comparison of structure and function of microbial community between water, effluent and shrimp intestine of higher place *Litopenaeus vannamei* ponds. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 243-255.
- Hossain, M.S., Dai, J. and Qiu, D. (2021), Dysbiosis of the shrimp (*Penaeus monodon*) gut microbiome with AHPND outbreaks revealed by 16S rRNA metagenomics analysis. *Aquaculture Research*, 52: 3336-3349. <https://doi.org/10.1111/are.15178>
- Hurtado, C. (2022). Medicina de precisión: conceptos, aplicaciones y proyecciones. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 33(1), 7-16.
- Iqbal, G., Mushtaq, S., Sushil Singh, L., & Kumar Ganpatbhai, A. V. (2023). Fungal diseases in aquaculture: A review. *The Pharma Innovation*.
- Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., & Hugenholtz, P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(4), 557-578.
- Leyva-López, N., Mendieta-Vega, R. A., Zazueta-Matías, E., Santiago-Osuna, J., & Grano-Maldonado, M. I. (2020). OCURRENCIA DE ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN TURISTAS NACIONALES E INTERNACIONALES ENTRE 2014-2018, EN MAZATLAN, SINALOA, MEXICO. *Biotempo*, 17(1), 127-136.
- Li, J., Jiang, H., Li, L., Zhang, X., & Chen, J. (2019). The effect of disease and season to hepatopáncreas and intestinal mycobiota of *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in microbiology*.
- López Torres, V. G., González Rosales, V. M., Ramírez Pérez, J. F. (2022). Acuicultura en Baja California: Redes, actores y empresas. (1ra edición). Universidad Autónoma de Baja California y sistemas de producción acuícola en Baja California. <https://www.researchgate.net/profile/Luis-Moreno->

[64/publication/367795786_Acuicultura_en_Baja_California_Redes_Actores_y_Empresas/links/63dab5ab64fc8606380584aa/Acuicultura-en-Baja-California-Redes-Actores-y-Empresas.pdf#page=50](https://doi.org/10.24242/367795786_Acuicultura_en_Baja_California_Redes_Actores_y_Empresas/links/63dab5ab64fc8606380584aa/Acuicultura-en-Baja-California-Redes-Actores-y-Empresas.pdf#page=50)

- Martín del Burgo Rabadán, M. D. L. Á. (2021). *Vibrio parahaemolyticus* en los productos marinos.
- Morillo Luchena, Á. (2021). El boom del sushi: Posibles riesgos toxicológicos.
- Nag, D., Farr, D. A., Walton, M. G., & Withey, J. H. (2020). Zebrafish models for pathogenic vibrios. *Journal of Bacteriology*, 202(24), e00165-20.
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 535-546.
- Parks, D.H. and Beiko, R.G. (2010) 'Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities', *Bioinformatics*, 26(6), pp. 715–721. doi:10.1093/bioinformatics/btq041.
- Raza, A., & Shahid, M. S. (2020). Next-generation sequencing technologies and plant molecular virology: a practical perspective. In *Applied Plant Virology* (pp. 131-140). Academic Press.
- Rezasoltani, S., Bashirzadeh, D. A., Mojarad, E. N., Aghdaei, H. A., Norouzinia, M., & Shahrokh, S. (2020). Signature of gut microbiome by conventional and advanced analysis techniques: advantages and disadvantages. *Middle East journal of digestive diseases*, 12(1), 5.
- Rodríguez Pérez, C., Carreño Ruiz, S. D., Martínez Rodríguez, M., & Ortiz Ojeda, R. F. (2023). PCR como técnica molecular más utilizada en el diagnóstico del virus del dengue. Revisión sistemática: PCR as the most widely used molecular technique in the diagnosis of dengue virus. Systematic review. *LATAM Revista Latinoamericana De Ciencias Sociales Y Humanidades*, 4(1), 3444–3455. <https://doi.org/10.56712/latam.v4i1.498>

- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, 61(2), 49-63.
- Seong, H. J., Kim, J. J., Kim, T., Ahn, S. J., Rho, M., & Sul, W. J. (2021). A case study on the distribution of the environmental resistome in Korean shrimp farms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227, 112858.
- Shan, X., Li, K., Stadler, P., Borbor, M., Reyes, G., Solorzano, R., ... & Cordero, O. X. (2024). Microbiome determinants of productivity in whiteleg shrimp aquaculture. *bioRxiv*, 2024-09.
- Valdez, E. G., Porchas, M. M., Calderón, K., Galván, T. G., Martínez-Córdova, L. R., Albores, F. V., & Arvayo, M. A. (2020). La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte//The gut microbiota of penaeid shrimp: a historical perspective and state of the art. *Biotecnia*, 22(1), 5-16.
- Wood, D., Lu, J. and Langmead, B. (2022) *Taxonomic Sequence Classification System, Kraken2*. Available at: <https://ccb.jhu.edu/software/kraken2/> (Accessed: 26 September 2024).
- Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS computational biology*, 6(2), e1000667.
- Zeng, S., Huang, Z., Hou, D., Liu, J., Weng, S., & He, J. (2017). Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, 5, e3986.

XIV. ANEXOS

14.1. Productos Académicos



SOCIEDAD
MEXICANA DE
BIOQUÍMICA, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Jesús Daniel López Loera

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

Phenotypic and genomic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Litopenaeus vannamei* at an aquaculture farm in Sonora

Por:

López Loera Jesús Daniel, Gracia Valenzuela Martina Hilda, Acuña Ramírez Héctor Manuel, Gutiérrez Payán Sergio Abrahán, Cervantes Leal Edén Noé, Rodríguez José, Magaña Lizárraga José Antonio, Bernal Reynaga Rodolfo, Rendón Maldonado José Guadalupe, y Báez Flores María Elena

En la modalidad de cartel durante el XXXIV Congreso Nacional de Bioquímica
20 - 25 de octubre de 2024, en la Ciudad de Mazatlán, Sin. México

Atentamente
Comité Organizador


Dr. Agustín Guerrero Hernández
Presidente


Dra. María de Lourdes Girard Cuesy
Secretaria-Tesorera


Dra. Libia Vega Loyo
Vice-Presidente


Dra. Irma Romero Álvarez
Sub-Secretaria-Tesorera

XV. SIGLAS Y ABREVIATURAS

- ANOSIM: Análisis de Similitudes.
- ARNr: ARN ribosomal.
- CIAD: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato.
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.
- OTU: Unidad Taxonómica Operativa.
- PCA: Análisis de Componentes Principales.
- PERMANOVA: Análisis Multivariado Permutado de la Varianza.
- SIMPER: Porcentaje de la Similitud.
- TDH: Hemolisina directa termoestable.
- TRH: Hemolisina relacionada a la TDH.
- UISP: Unidad de Investigaciones en Salud Pública.