



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



Evaluación de células de *Salinispora arenicola* inmovilizadas en alginato de sodio como control biológico de *Vibrio parahaemolyticus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

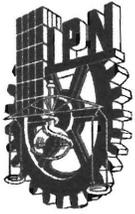
EN

MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

NAYLIN HERRERA HERNÁNDEZ

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de Noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DE CÉLULAS DE *Salinispora arenicola* INMOVILIZADAS EN ALGINATO DE SODIO COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Vibrio parahaemolyticus*"

Presentada por el alumno:

HERRERA

Apellido paterno

HERNÁNDEZ

materno

NAYLIN

nombre(s)

Con registro:

A	1	7	0	7	2	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
Directora de Tesis

DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ
2º. Director de Tesis

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

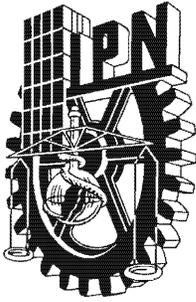
DRA. ERIKA TERESA QUINTANA CANO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 04 del mes de Diciembre del año 2018

El (la) que suscribe BIÓL. NAYLIN HERRERA HERNÁNDEZ Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A170721 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO y DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DE CÉLULAS DE *Salinispora arenicola* INMOVILIZADAS EN ALGINATO

DE SODIO COMO CONTROL BIOLÓGICO DE *Vibrio parahaemolyticus*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: naylinherrera.92@gmail.com - claudia.hernandez.guerrero@gmail.com - sergiofranciscomartinez@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIÓL. NAYLIN HERRERA HERNÁNDEZ

Nombre y firma del alumno

La presente tesis se realizó en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) bajo la dirección de la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, y el Dr. Sergio Francisco Martínez Días, dentro de los proyectos “Producción de compuestos durante el crecimiento y esporulación de cepas del género *Salinispora* de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., México”. SIP 20170434 y “Caracterización de compuestos con actividad antibacteriana producidos por *Salinispora* sp. frente a *Vibrio parahaemolyticus*”. SIP 20181803.

Este trabajo está dedicado al tesoro más grande que tengo, mi familia y especialmente a mis padres. A pesar de la distancia, su amor constante ha hecho que sea más fuerte cada día. Gracias

A Sandy, por acompañarme en todos estos años y demostrarme que toda meta lleva un sacrificio, pero gracias a ti ha sido mucho más fácil

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por darme las facilidades para la realización de este posgrado.

Al CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios.

A mis directores de tesis Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero y Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz.

A los miembros de mi comité revisor Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, Dra. Erika T. Quintana Cano y Dr. Gustavo Hernández Carmona.

A Ariel Cruz por su ayuda en el análisis de las muestras por microscopía electrónica de barrido.

A esa amigas inseparables que el tiempo ni la distancia podrá separar: Olivia, Saymé y Laura.

A Yanelis y Jessica por haber creado un lazo de confidencialidad y apoyo en los momentos difíciles.

A la Dra. Bárbara González, la Dra. Noemí Águila y el Dr. César Cardona, gracias

A todos mis compañeros de laboratorio, Anthony, Lina y Angélica, por ayudarme en mis tantas dudas, a Estrella, Kim, Zulema, Valeria, Karla, Salvador, Juan Pablo, Erika, Diana, César, por todos los momentos de risas.

A todas aquellas personas que hicieron posible que llevará a cabo esta meta de superación personal.

ÍNDICE

GLOSARIO.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Actinobacterias.....	5
2.2 Género <i>Salinispora</i>	6
2.3 Estrategias de prevención y control de <i>Vibrio</i> sp.....	7
2.4 Encapsulación de bacterias.....	9
3. PROBLEMÁTICA.....	10
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. HIPÓTESIS.....	12
6. OBJETIVOS.....	12
6.1 Objetivo general	12
6.2 Objetivos específicos.....	12
7. MATERIALES Y MÉTODO	13
7.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	13
7.2 Cultivo bacteriano de <i>Salinispora arenicola</i> (PA-Sa-34'-1) y determinación de su curva de crecimiento	13
7.3 Obtención de bioencapsulados de <i>Salinispora arenicola</i> (cepa PA-Sa-34'-1)	14
7.4 Evaluación de la actividad inhibitoria in vitro frente a la cepa M1 de <i>V. parahaemolyticus</i>	15
7.5 Determinación de las fases de desarrollo morfológico y viabilidad de la cepa PA-Sa-34'-1 de <i>Salinispora arenicola</i> encapsulada.....	16
7.6 Evaluación del crecimiento de los encapsulados de <i>Salinispora arenicola</i> en el sedimento.....	16
7.7 Evaluación del efecto de la inclusión de los encapsulados de <i>S. arenicola</i> en el control de <i>V. parahaemolyticus</i> en el sedimento.....	17

8. RESULTADOS.....	18
8.1 Obtención de curva de crecimiento de la cepa PA-Sa-34'-1 de <i>Salinispora arenicola</i>	18
8.2 Determinación de los bioencapsulados de cepas de <i>Salinispora arenicola</i>	19
8.3 Evaluación de la actividad inhibitoria in vitro frente a la cepa M1 de <i>V. parahaemolyticus</i>	19
8.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de los encapsulados frente a la cepa M1 de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante co-cultivo	22
8.5 Determinación de las fases de desarrollo morfológico y viabilidad de la cepa PA-Sa-34'-1 de <i>Salinispora arenicola</i> encapsulada.....	26
8.6 Evaluación del crecimiento de los encapsulados de <i>Salinispora arenicola</i> en el sedimento.....	30
8.7 Evaluación del efecto de la inclusión de los encapsulados de <i>S. arenicola</i> en el control de <i>V. parahaemolyticus</i> en el sedimento.....	30
9. DISCUSIÓN	34
9.1 Evaluación de la actividad inhibitoria frente a la cepa M1 de <i>V. parahaemolyticus</i> y su relación con las fases de desarrollo morfológico	35
9.2 Crecimiento de <i>Salinispora arenicola</i> en el sedimento y su capacidad de inhibir el crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en sedimento	38
10. CONCLUSIONES	41
11. RECOMENDACIONES.....	42
12. LITERATURA CITADA	43

GLOSARIO

Actividad biológica o bioactividad: efecto benéfico o adverso de una sustancia sobre un organismo vivo.

Antibiótico: sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintéticamente que mata o inhibe el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

Antagonismo: en microbiología se refiere a la competencia entre microorganismos, que incluye competencia, alelopatía, parasitismo y depredación.

Bioactivos: sustancias que tiene algún efecto sobre un organismo vivo, tejido o célula.

Biocatálisis: es el proceso por el que se aumenta la velocidad de una reacción metabólica debido a la acción enzimática.

Bioflocs: es la tecnología que permite el cultivo de organismos acuáticos tales como peces o crustáceos en un ambiente dominado por microorganismos.

Cepa: en microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que poseen la misma composición genética.

Co-cultivo: en microbiología, consiste en mezclar varios tipos de microorganismos in vitro para permitir interacciones sinérgicas o antagonistas.

Control biológico o biocontrol: método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con el objetivo de controlar las poblaciones de otro organismo.

Enzimas hidrolíticas: cataliza la escisión o desdoblamiento de un enlace mediante hidrólisis.

Espora: es un estado inactivo o latente de la célula en el que no crece y no hay reproducción, la célula forma una cubierta que le confiere resistencia contra la desecación, escasez de nutrientes, frío, calor, radiación, salinidad, agentes oxidantes, desinfectantes, pH extremo, etc.

Fagoterapia: terapia que consiste en el uso de bacteriófagos, virus que infectan bacterias, para tratar enfermedades causadas por bacterias.

Gram positiva: célula procariótica cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

Gram negativa: célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas.

Halo: zona alrededor de un disco o área impregnada con la sustancia activa en la que no se produce crecimiento bacteriano.

Inmunosupresores: molécula que suprime o disminuye las reacciones inmunitarias.

Metabolito secundario: compuesto orgánico sintetizado por el organismo que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, pero que pueden brindar ventaja competitiva.

Plásmido: molécula de ADN extracromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico.

Saprófitos: organismos que se alimentan de la materia orgánica en descomposición.

ABREVIATURAS

AHPND	Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (por sus siglas en inglés “Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease”)
BLASTp	por sus siglas en inglés “Basic Local Alignment Search Tool protein”, es un programa informático de alineamiento de secuencias de aminoácidos, mediante la comparación de una secuencia problema con una base de datos.
C	citocina
DO	densidad óptica
G	guanina
GYM	glucosa-levadura-malta (por sus siglas en inglés “glucose-yeast-malt”)
MEB	microscopía electrónica de barrido
PA-Sa-34´-1	cepa de <i>Salinispora arenicola</i>
PVC	volumen del paquete celular
rpm	revoluciones por minuto
TCBS	tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa
UFC	unidades formadoras de colônia
VPM1	cepa M1 de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de densidad óptica arrojados en los ensayos de co-cultivo a los 14 días del cultivo con 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación frente a la cepa VPM1.....	24
Tabla 2. Valores de densidad óptica arrojados en los ensayos de co-cultivo a los 21 días del cultivo con 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación frente a la cepa VPM1.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa PA-Sa-34'-1 de <i>Salinispora arenicola</i> desde el día 0 del cultivo hasta los 28 días.....	18
Figura 2. Perlas obtenidas con alginato de sodio 1 % y goteadas en cloruro de calcio al 10 % (A) Medición. (B) Vista al estereoscopio.....	19
Figura 3. Actividad de los bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 (A) 7 días de cultivo (B) 14 días de cultivo (C) 21 días de cultivo, frente a la cepa VPM1.....	20
Figura 4. Medición de los halos de inhibición en el ensayo de actividad frente a VPM1 a los 7, 14 y 21 días de cultivo de PA-Sa-34'-1.....	21
Figura 5. Actividad de los bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 realizados a los 14 días del cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21(D) días de encapsulación frente a la cepa VPM1 en co-cultivo.....	23
Figura 6. Actividad de los bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 realizados a los 21 días del cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21(D) días de encapsulación frente a la cepa VPM1 en co-cultivo.....	25
Figura 7. Microscopía electrónica de barrido a los 14 días de cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) días post-encapsulación.....	27
Figura 8. Microscopía electrónica de barrido a los 24 días de cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) días post-encapsulación.....	28
Figura 9. Ubicación de las células de PA-Sa-34'-1 dentro de las cápsulas de alginato observadas mediante microscopía electrónica de barrido.....	29
Figura 10. Crecimiento de VPM1 frente a los encapsulados de PA-Sa-34'-1 en sedimento.....	32
Figura 11. Crecimiento de VPM1 frente a los encapsulados de PA-Sa-34'-1 en la columna de agua.....	33

RESUMEN

El género *Salinispora* es de interés biotecnológico por la actividad bactericida de sus metabolitos secundarios. Las cepas de *Salinispora arenicola* aisladas de sedimentos del Golfo de California poseen efectos bactericidas contra algunas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* causantes de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) de camarón; por lo que podrían utilizarse como agentes de biocontrol. La estrategia actual de incorporación de bacterias en los cultivos incluye la aplicación directa y el uso del alimento como vehículo, sin embargo, se podría aumentar su eficiencia utilizando tecnologías como la encapsulación, lo que podría mejorar la viabilidad de las células, su liberación controlada y protección ante condiciones adversas. La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de incluir encapsulados de *S. arenicola* en sedimento marino para el control de *V. parahaemolyticus*. Para ello, se realizó la encapsulación de la cepa PA-Sa-34'-1 de *S. arenicola*, en matrices de alginato de sodio, tomando en consideración su fase de desarrollo. Se evaluó el efecto de los encapsulados frente a *V. parahaemolyticus* mediante el método de difusión en agar; se observó que la actividad antibacteriana es dependiente de la edad del cultivo de *S. arenicola*. Las cápsulas preparadas con cultivos de 14 y 21 días presentaron la mayor actividad. El mismo efecto se evaluó mediante un co-cultivo, donde los encapsulados fueron enfrentados a *V. parahaemolyticus* luego de incubarse previamente durante 7, 14 y 21 días. El crecimiento de *V. parahaemolyticus* fue medido mediante densidad óptica mostrando valores significativos de inhibición con los encapsulados realizados a los 21 días de cultivo y a partir de los 14 días post-encapsulación. En la última etapa de este estudio, los encapsulados fueron inoculados en sedimento estéril y se determinó la viabilidad de *S. arenicola* mostrando crecimiento de 1.96×10^5 UFC/g a los 7 días hasta 4.35×10^6 UFC/g al cabo de los 21 días en el sedimento. Al inocular *V. parahaemolyticus* en el sistema, se observó que a pesar de que *S. arenicola* tuvo un incremento poblacional, no se observa un efecto inhibitorio sobre la capacidad del patógeno; de colonizar, lo cual puede atribuirse a las nuevas condiciones de incubación.

ABSTRACT

The genus *Salinispora* is of biotechnological interest due to the bactericidal activity of its secondary metabolites. The strains of *Salinispora arenicola* isolated from sediments of the Gulf of California have bactericidal effects against some strains of *Vibrio parahaemolyticus* that cause Acute Hepatopancreatic Necrosis of shrimp (AHPND); so they could be used as biocontrol agents. The current strategy of incorporating bacteria in crops includes the direct application and use of the food as a vehicle, however, the efficiency could be increased using technologies such as encapsulation, which could improve the viability of the cells, their controlled release and protection against adverse conditions. The objective of this research was to assess the effect of including encapsulates of *S. arenicola* in marine sediment for the control of *V. parahaemolyticus*. The encapsulation of the strain *S. arenicola* PA-As-34'-1, was carried out in sodium alginate matrices, considering the development phase. The effect of the encapsulations against *V. parahaemolyticus* was assessed by the agar diffusion method; it was found that the antibacterial activity is dependent on the age of the culture of *S. arenicola*. The capsules prepared with cultures of 14 and 21 days showed the highest activity. The same effect was evaluated by co-culture, where the encapsulates were confronted with *V. parahaemolyticus* after being previously incubated for 7, 14 and 21 days. The growth of *V. parahaemolyticus* was measured by optical density showing significant inhibition with the encapsulations performed at 21 days of culture and after 14 days post-encapsulation. In the last stage of this study, the encapsulates were inoculated in sterile sediment and the viability of *S. arenicola* was determined, showing growth of 1.96×10^5 CFU/g at 7 days, and up to 4.35×10^6 CFU/g after 21 days in the sediment. When *V. parahaemolyticus* was inoculated in the system, it was shown that although *S. arenicola* had a population increase, no inhibitory effect on the pathogen's capacity was observed; to colonize, which can be attributed to the new incubation conditions.

1. INTRODUCCIÓN

Los sedimentos marinos albergan comunidades microbianas complejas que permanecen poco estudiadas en relación con otros biomas. Las estrategias competitivas empleadas por las bacterias van desde rápido crecimiento (competencia por explotación) a la producción de metabolitos secundarios alelopáticos (competencia por interferencia); sin embargo, se sabe poco acerca de cómo estos compuestos afectan la estructura de la comunidad microbiana (Patin *et al.*, 2015).

El sedimento oceánico al ser una fuente poco explorada en cuanto al estudio de microorganismos únicos, con un ambiente evolutivo singular, podría haber dado como resultado el desarrollo de nuevos metabolitos secundarios, los cuales pueden ser utilizados como productos farmacéuticos (Bose *et al.*, 2014).

Las actinobacterias marinas son conocidas debido a las numerosas moléculas que han sido descritas para este grupo; principalmente de los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* y más recientemente descrito, *Salinispora*. El género *Salinispora* pertenece a la familia Micromonosporaceae, y fue el primer género de actinobacteria marino obligado en ser descrito (Maldonado *et al.*, 2005). Sus miembros están extensamente distribuidos en los sedimentos marinos tropicales y subtropicales y en especies de esponjas. Actualmente se han descrito 3 especies: *S. arenicola*, *S. tropica* y *S. pacifica* (Mincer *et al.*, 2002). Las especies de este género invierten fuertemente en el metabolismo secundario, con aproximadamente el 10% de su genoma dedicado a este proceso. Estudios realizados con el objetivo de evaluar la bioactividad de los metabolitos secundarios de diferentes cepas de *Salinispora* sp. demostraron que un 35% posee actividad antibacteriana frente a cepas de patógenos resistentes. Además, se han aislado metabolitos importantes como agentes antimicrobianos y antibióticos, siendo el caso de la arenimicina y rifamicina, aislados de *S. arenicola*, este último comercializado por industrias biofarmacéuticas (Maldonado *et al.*, 2005; Jensen & Mafnas, 2006; Subramani & Aalbersberg, 2012).

En las actinobacterias, los compuestos antibacterianos son producidos como una estrategia defensiva para la eliminación competitiva de especies (Íñiguez-Martínez *et al.*, 2016). En este sentido existen diversos trabajos que se han enfocado en el estudio de este grupo

frente a cepas patógenas de *Vibrio* sp., agentes causales de enfermedades en la acuicultura (Browdy *et al.*, 2014).

Actualmente se han propuesto antibióticos como la enrofloxacin, la oxitetraciclina y el florfenicol contra cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* causante de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda en camarones (AHPND) (Soto-Rodriguez *et al.*, 2014). Sin embargo, la aplicación de antibióticos u otros productos químicos resulta muy costosa y no deseable, debido a la resistencia bacteriana, persistencia en el ambiente acuático, efectos sobre la biogeoquímica del sedimento y la acumulación de residuos de antibióticos en los tejidos de los organismos. Por lo que la mayoría de los antibióticos fueron prohibidos en acuicultura. Esta medida fue adecuada para prevenir efectos adversos en la salud humana, pero dejó a los productores acuícolas con pocas herramientas para el combate de enfermedades bacterianas, haciéndose imprescindible la necesidad de encontrar nuevos métodos preventivos (Velmurugan *et al.*, 2015).

Actualmente el uso de bacterias antagonistas como control biológico se aplican de manera directa o usando el alimento como vehículo, sin embargo, el uso de microencapsulados ha sido ampliamente utilizado, ya que mejora la viabilidad de las células, su liberación controlada y protección ante condiciones adversas. Por lo que en este trabajo se pretende evaluar el efecto de incluir encapsulados de una cepa de *Salinispora arenicola* en sedimento para el control de *Vibrio parahaemolyticus* positivos a la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND).

2. ANTECEDENTES

2.1 Actinobacterias

Los actinomicetos son el grupo de bacterias Gram-positivas descritas con alto contenido de GC (69-78%), la mayoría son organismos de vida libre que están ampliamente distribuidos en los ecosistemas terrestres y acuáticos, pueden encontrarse como patógenos en plantas, simbiontes de invertebrados, así como en briozoos y corales (Bose *et al.*, 2015; Patin *et al.*, 2017; Babu *et al.*, 2018). Se caracterizan por tener colonias resistentes y micelios vegetativos ramificados con hifas filamentosas que normalmente no se fragmentan, además son capaces de producir esporas que las protege ante condiciones adversas del entorno o falta de nutrientes. Son organismos saprófitos que forman parte de la microbiota del suelo, contribuyen significativamente a la descomposición de polímeros biológicos complejos, tales como lignocelulosa, hemicelulosa, pectina, queratina y quitina. Además, son productores de enzimas hidrolíticas como amilasas, quitinasas, lipasas y proteasas implicadas en la productividad mediante la mineralización y los ciclos de nutrientes (Sharma, 2014; Babu *et al.*, 2018).

El recambio biogeoquímico, tanto en el medio marino como terrestre se debe principalmente al metabolismo de la población microbiana, y esto se realiza a través del proceso de descomposición aeróbica y anaeróbica mediante los cuales las células microbianas obtienen su energía. Además, también juegan un papel importante en la disolución de sales inorgánicas insolubles y la regeneración de nutrientes (You *et al.*, 2005).

La degradación y el recambio de diversos materiales son críticos en el reciclaje de compuestos de carbono y nitrógeno en el medio acuático, y es un proceso continuo mediado por la acción de una variedad de microorganismos.

La existencia de actinomicetos en el medio marino ha sido cuestionada con frecuencia, y se postuló la hipótesis de escorrentía terrestre; la cual atribuye un origen terrestre de todas las células de actinobacterias. Sin embargo, con base a estudios independientes y dependientes del cultivo, se confirmó que los actinomicetos marinos comprenden una microbiota autóctona en el ambiente marino (Janaki, 2016). Este punto de vista fue mejor

respaldado con el descubrimiento del primer género de actinomiceto marino obligado, *Salinispora* (anteriormente conocido como *Salinospora*) (Mincer *et al.*, 2005). A pesar de que las primeras investigaciones estimaron bajas cantidades (Jensen *et al.*, 1991) y distribución irregular (Mincer *et al.*, 2002) de actinomicetos en el ambiente marino, estudios más recientes sugirieron una mayor abundancia y diversidad de actinobacterias con numerosos taxones nuevos. De ahí que se ha podido determinar que este grupo está ampliamente distribuido en diferentes ecosistemas marinos. Aunque las poblaciones de actinobacterias en general son aparentemente persistentes en los océanos (Mincer *et al.*, 2002), los estudios sobre la diversidad, distribución y funciones ecológicas en los océanos son escasos, siendo uno de los problemas no resueltos en la microbiología marina (Stach *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2005). En estos microorganismos, se ha descrito además, que son una fuente prolífica de pequeñas moléculas bioactivas, metabolitos secundarios, que incluyen citoquinas de relevancia clínica, inmunosupresores y antibióticos (Patin *et al.*, 2018). Más de la mitad de los compuestos bioactivos descritos actualmente pertenecen a este grupo, sin embargo, solo unos pocos géneros derivados del suelo (*Streptomyces* y *Micromonospora*) representan la mayoría de estos compuestos.

El rico potencial biosintético detectado en las secuencias del genoma plantea la posibilidad de que las técnicas tradicionales de cultivo usadas en laboratorio no generan las señales ambientales necesarias para la producción de muchos metabolitos especializados (Patin *et al.*, 2018). Todas estas características han impulsado investigaciones orientadas a su uso como agentes de control biológico.

2.2 Género *Salinispora*

Los actinomicetos pertenecientes al género *Salinispora* se encuentran ampliamente distribuidos en sedimentos marinos tropicales y subtropicales (Mincer *et al.*, 2002; Jensen & Mafnas, 2006). Hasta la fecha, dos especies: *S. tropica* y *S. arenicola* han sido descritas formalmente, mientras que una tercera *S. pacifica* ha sido propuesta (Fenical y Jensen 2006; Millán-Aguiñaga *et al.*, 2017). Este taxón se describió como el primer género obligatorio de actinomicetos marinos basado en la falta de crecimiento cuando el agua de mar se reemplazó con agua desionizada en un medio de crecimiento complejo (Maldonado *et al.*

2005; Penn & Jensen, 2012). En el estudio realizado por Tsueng y Lam en 2010 demostraron que *Salinispora* spp. son capaces de crecer con tan solo 5 mM de Na⁺ si se proporciona el entorno osmótico adecuado. Sin embargo, también se demostró que las células se lisan en medios de baja resistencia osmótica, lo que sugiere un alto nivel de adaptación marina (Penn & Jensen, 2012).

De acuerdo con algunos autores, las cepas de *Salinispora* aparecen en gran parte como esporas latentes y representan miembros relativamente raros de la comunidad microbiana de sedimentos (Mincer *et al.*, 2005). La gran diversidad de metabolitos secundarios de *Salinispora* que no poseen actividad antibiótica (Fenical y Jensen, 2006) sugiere que muchos de estos compuestos proporcionan funciones ecológicas distintas de la alelopatía (Patin *et al.*, 2015).

El género de actinomicetos marinos *Salinispora* proporciona un modelo valioso para abordar los conceptos de especiación bacteriana, el metabolismo secundario y la ecología química (Patin *et al.*, 2017). El género es una fuente rica de productos naturales estructuralmente diversos, y existe evidencia de que ciertos compuestos y sus grupos de genes biosintéticos asociados se fijan a nivel de especie. Si bien las tres especies son prolíficas en términos de biosíntesis de productos naturales, se demostró que *S. arenicola* invierte diferencialmente en la competencia por interferencia, mientras que *S. tropica* invierte en el crecimiento, estableciendo así estos linajes coexistentes como ecotipos distintos (Millán-Aguñaga *et al.*, 2017). Las tres especies están enriquecidas en el metabolismo secundario, con aproximadamente el 10% del genoma dedicado a este proceso (Penn *et al.*, 2009).

2.3 Estrategias de prevención y control de *Vibrio* sp.

Las especies del género *Vibrio* son bacterias anaerobias facultativas y Gram-negativas de la familia Vibrionaceae. Son microorganismos prominentes en el medio marino y generalmente constituyen la mayoría de la microbiota normal de camarones peneidos criados y silvestres, llegan a convertirse en patógenos oportunistas cuando se suprimen los mecanismos naturales de defensa en los camarones. Las principales especies que causan enfermedades en camarones son *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* y *V. parahaemolyticus* (Augustine *et al.*, 2016).

Los miembros del género *Vibrio*, incluidos *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, han sido descritos como las principales especies patógenas en camarones y son responsables de la mayoría de las muertes en larvas. Estos patógenos causan infecciones graves, disminuyen la producción tanto en el criadero como en los estanques de cultivo, reducen la conversión de alimento y las tasas de crecimiento en los individuos sobrevivientes, lo que genera un impacto negativo en el estado financiero general del negocio.

Se han propuesto varias estrategias para controlar la vibriosis en criaderos de camarón. Uno de ellos, el uso de antibióticos para controlar los agentes infecciosos, sin embargo, han dado lugar a problemas de resistencia.

La vacunación o la inmunoestimulación de los camarones es otra tecnología ampliamente aceptada que promueve la respuesta inmune, pero en general no pueden usarse como una medida universal de control de la enfermedad en la acuicultura debido a que la eficacia de la respuesta en los encuentros subsiguientes es limitada y requieren mucha mano de obra.

Los probióticos han sido otro enfoque de investigación para mejorar la salud de los camarones y el control de enfermedades. Mediante el fenómeno de la exclusión competitiva, los probióticos inhiben activamente la colonización de patógenos potenciales en el tracto digestivo mediante la producción de sustancias bactericidas, la competencia por los nutrientes y el espacio y la modulación del sistema inmunitario. La estimulación de la inmunidad del huésped y la exclusión de patógenos pueden proporcionar una mayor protección contra enfermedades no específicas como resultado de la mejora de la inmunidad y la exclusión competitiva (Rengpipat *et al.*, 2000). Hay evidencia acumulada de que el uso profiláctico de bacterias beneficiosas es eficaz para inhibir una amplia gama de patógenos de peces. La mayor preocupación por los microorganismos resistentes a los antibióticos ha llevado a sugerencias de métodos alternativos de prevención de enfermedades, incluido el uso de bacterias no patógenas como agentes de control biológico probiótico.

Las aplicaciones de la tecnología de inmovilización celular han sido ampliamente reconocidas y desarrolladas desde hace muchos años. Los sistemas celulares inmovilizados se utilizan ampliamente en la producción de enzimas (por ejemplo, enzimas que digieren celulosa, proteínas y quitina), antibióticos, alcoholes, polisacáridos complejos,

surfactantes y aditivos alimentarios. Las comunidades microbianas en forma de biopelículas o biogránulos también se han empleado en tecnologías de biorremediación ambiental, por ejemplo, tratamiento de aguas residuales para eliminar la demanda química de oxígeno, nitrógeno, fósforo, metales pesados, hidrocarburos y cianuro y en biosensores (Venugopalan *et al.*, 2005). Los estudios también demostraron que los gránulos aeróbicos se pueden usar para la eliminación de fosfato y amoníaco (Dulekgurgen *et al.*, 2003; Tsuneda *et al.*, 2003). Con su estructura compacta y alta eficiencia de degradación, los gránulos aeróbicos muestran una excelente capacidad de degradación de compuestos tóxicos, como el fenol (Jiang *et al.*, 2002).

2.4 Encapsulación de bacterias

La inmovilización de sustancias biológicamente activas o de células, ha sido una herramienta universal en la biotecnología desde décadas pasadas. La inmovilización celular puede definirse como un procedimiento que limita células o sustancias dentro de un sistema dado y que, además, controla la migración o difusión de sustancias.

Una activa inmovilización puede lograrse a través del atrapamiento de células mediante fuerzas físicas o químicas. Algunas de las ventajas descritas de la inmovilización celular frente a cultivos en suspensión podemos encontrar: (1) provee de una alta concentración de células, (2) la combinación de altas concentraciones celulares y elevadas tasas de flujo, permiten una alta productividad volumétrica, (3) provee de condiciones microambientales favorables para las células (contacto entre célula, gradiente de nutrientes, gradientes de pH), lo que permite un mejor rendimiento de la biocatálisis y (4) en algunos casos, la inmovilización mejora la estabilidad genética de los cultivos.

La gelificación iónica comprende un método de microencapsulación que se desarrolló para inmovilizar células, donde se utiliza principalmente alginato de sodio como componente de la membrana y la combinación con iones divalentes como el calcio, para inducir la gelificación (Pedroza, 2002). Las gotas se transforman inmediatamente en esferas con una membrana semipermeable, la cual atrapa las células en una matriz tridimensional de alginato iónico, es seco, simple de usar, uniforme, biodegradable y no tóxico, además, es capaz de contener una alta población bacteriana y proporciona una liberación lenta de los microorganismos al suelo por períodos prolongados.

La técnica de la encapsulación de bacterias se ha utilizado ampliamente en la agricultura, donde las formulaciones tienen dos objetivos fundamentales: proteger temporalmente a los microorganismos encapsulados de las condiciones ambientales en el suelo y de la competencia microbiana y permitir la liberación gradual de los microorganismos al suelo.

Otras investigaciones basadas en estas nuevas tecnologías fueron desarrolladas a partir de probióticos, como es el caso de Rosas-Ledesma *et al.*, 2012, donde proporcionan a larvas de peces encapsulados de *Shewanella putrefaciens*. Otros trabajos, como el desarrollado por Ivanova *et al.*, 2002 determinaron que con la encapsulación de *Enterococcus* sp. aumentaba en un 50 % la producción de bacteriocinas.

3. PROBLEMÁTICA

Con el inicio de la AHPND en México en el 2013, la producción de camarón ha sufrido una reducción drástica en las regiones afectadas de Sinaloa (57%), Sonora (65%) y Nayarit (67%) en comparación con la producción de camarón en el 2012 (Nunan *et al.*, 2014).

La industria camaronera en México está siendo afectada debido a la gran escala de mortalidad y la falta de respuesta a los tratamientos comúnmente utilizados en este sector. Esta enfermedad afecta típicamente a juveniles de camarón provocando mortalidades de hasta el 100%; el origen se ha atribuido a cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* que contienen un plásmido que codifica genes para la expresión de una toxina que causa la enfermedad (Rodríguez-Camacho *et al.*, 2014).

Actualmente no existe un tratamiento para la enfermedad y dado que en la acuicultura el uso de antibióticos está prohibido, se están desarrollando nuevas estrategias de control que plantean el uso de bioflocs, fagoterapia o bacterias antagonistas (Martínez-Díaz & Hipolito-Morales, 2013; Browdy *et al.*, 2014; Lomeli-Ortega & Martínez-Díaz, 2014). Dentro de esta última estrategia, las actinobacterias pueden ser un potencial agente de biocontrol en la acuicultura, debido a que son una fuente potencial de compuestos antibióticos, participan en la degradación de compuestos orgánicos, competencia por nutrientes, además de la formación de esporas resistentes que les confieren alta viabilidad (Velmurugan *et al.*, 2015).

En la última década se han llevado a cabo numerosas investigaciones en las que evalúan la actividad bactericida de diferentes cepas de actinobacterias frente a especies del género *Vibrio*. Algunos de estos trabajos son los realizados por Thirumurugan & Vijayakumar en el 2013, quienes aislaron actinobacterias de la costa sur de la India las cuales mostraron actividad frente a *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginoliticus*. Por otro lado, Li *et al.*, 2014 aislaron actinobacterias de 3 géneros de corales *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Streptomyces*, y demostraron actividad frente a cepas de *Vibrio* sp. Más recientemente, una investigación realizada en las costas de Cuba por Bernal *et al.*, 2015 fueron aisladas 31 cepas de actinobacterias, de las cuales un 16 % fueron capaces de inhibir el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. vulnificus*.

4. JUSTIFICACIÓN

El antagonismo bacteriano es un fenómeno común en la naturaleza; por lo que, las interacciones microbianas juegan un papel importante en el equilibrio entre los microorganismos competidores beneficiosos y potencialmente patógenos; de ahí que, la exclusión competitiva de bacterias patógenas, potencialmente reduce o elimina la necesidad de la profilaxis antibiótica en sistemas de acuicultura intensiva (Garriques y Arevalo, 1995).

Estudios preliminares realizados en el laboratorio de Microbiología del CICIMAR con una colección de cepas de *Salinispora arenicola* aisladas de sedimento marino del Golfo de California han mostrado que presentan un efecto antagónico frente a cepas de *Vibrio parahaemolyticus* positivas a AHPND. Y dado que el género *Salinispora* está ampliamente distribuidas en el sedimento marino (Jensen, 2015), su encapsulación podría aumentar la eficiencia en la colonización del mismo. Por tanto, la importancia del presente estudio radica en proponer una estrategia de control al inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* mediante la inclusión de encapsulados de cepas bacterianas de *Salinispora arenicola* en el sedimento.

5. HIPÓTESIS

¿Encapsulados de *Salinispora arenicola* pueden actuar como agente de biocontrol de *Vibrio parahaemolyticus*?

Considerando que *Salinispora arenicola* es un habitante habitual de sedimentos marinos capaz de producir compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*; y que la inmovilización celular es una técnica donde las células permanecen metabólicamente activas. Mediante la incorporación de células de *S. arenicola* en encapsulados de alginato de sodio, se promoverá el desarrollo normal del ciclo biológico de esta bacteria junto con su capacidad de producir compuestos antagónicos, los cuales serán liberados al medio. Además de que al incorporar encapsulados de *Salinispora arenicola* en sedimentos, se inducirá su colonización y se generará un impacto sobre la capacidad de *Vibrio parahaemolyticus* para colonizar y proliferar en los sedimentos marinos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de incluir células de *Salinispora arenicola* en cápsulas de alginato como control biológico de *Vibrio parahaemolyticus*.

6.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones de encapsulación de *S. arenicola*.
2. Evaluar el efecto de los encapsulados de *S. arenicola* en la inhibición de *V. parahaemolyticus* in vitro.
3. Determinar el efecto de la encapsulación sobre la viabilidad de *S. arenicola* en el sedimento.
4. Evaluar el efecto de los encapsulados de *S. arenicola* en la inhibición de *V. parahaemolyticus* en el sedimento.

7. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

La cepa de *Salinispora arenicola* (PA-Sa-34'-1) fue previamente aislada de sedimento marino de Punta Arena de la Ventana, Baja California Sur, dentro del Golfo de California (Lat. 24°03'40''N y Long. 109°49'52''W). Su aislamiento fue llevado a cabo por la Dra. Erika T. Quintana Cano, investigadora de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, perteneciente al Instituto Politécnico Nacional, de acuerdo con el método de Mincer *et al.*, 2002.

Para su reactivación PA-Sa-34'-1 fue cultivada en placa Petri con medio GYM (1.2 % de agar, 0.04 % de extracto de levadura, glucosa y malta en agua de mar), y se incubó a 30 °C bajo condiciones aeróbicas por siete días, en triplicados.

La cepa de *Vibrio parahaemolyticus* M1 (VPM1) fue aislada de cultivos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) durante brotes infecciosos que provocaron mortalidades masivas en los estados de Sinaloa y Baja California Sur durante el 2015. La cepa fue corroborada como portadora de los factores genéticos que determinan el AHPND y actualmente se encuentra almacenada en la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología del CICIMAR a -80°C.

7.2 Cultivo bacteriano de *Salinispora arenicola* (PA-Sa-34'-1) y determinación de su curva de crecimiento

A partir de la cepa PA-Sa-34'-1 almacenada a -80 °C en glicerol se tomaron 30 µL y se sembró en una placa con agar marino, mediante el método de microgotas, se incubó a 30 °C durante 7 días. Posteriormente, se transfirió cada microgota por separadas en 5 ml de medio GYM y se incubó durante 2 días a 30 °C en agitación constante a 150 rpm, posteriormente se pasó a 50 ml bajo las mismas condiciones durante 3 días, este cultivo sirvió de preinóculo para el posterior cultivo celular.

Se tomaron muestras de 1 ml y se realizaron diluciones seriadas para sembrarse en placas con agar marino y determinar UFC/ml antes de realizar el escalado final.

Se transfirieron los 50 ml del preinóculo en 500 ml de medio GYM y se incubó en las mismas condiciones antes descritas.

Para la determinación de la curva de crecimiento de la cepa a evaluar se realizaron tomas de muestras de 5 ml a los días 0, 4, 7, 10, 14, 18, 21, 25 y 28 de cultivo, se centrifugaron a 4000 g durante 10 minutos para medir el volumen del paquete celular (PVC) según Ng *et al.*, 2014, con respecto al tiempo de cultivo siguiendo la fórmula:

$$\% \text{ PVC} = \text{PVC} * 100$$

Donde:

Volumen total PVC: volumen del paquete celular

Volumen total de la muestra

Todos estos experimentos se realizaron por triplicado.

7.3 Obtención de bioencapsulados de *Salinispora arenicola* (cepa PA-Sa-34'-1)

Se tomaron muestras del cultivo de la cepa PA-Sa-34'-1 a los 7, 14 y 21 días, y se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm. El precipitado celular se mezcló con una solución de alginato de sodio (Sigma, viscosidad: 110.8±1.4 mPas, fuera de gel: 1360.6) al 1 % para obtener inóculos de 4 %, 6 % y 8 %. Todo este proceso se realizó utilizando materiales estériles para evitar contaminación. La mezcla fue goteada con una jeringa de 10 ml en una solución de cloruro de calcio al 10 % en agitación constante. Cada gota se convirtió en una perla al contacto con la solución de cloruro de calcio. Al final se lavaron con solución salina 2.5 % para remover el exceso de calcio y secadas en papel de filtro estéril para eliminar el exceso de agua.

7.4 Evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* frente a la cepa M1 de *V. parahaemolyticus*

Con los encapsulados de PA-Sa-34'-1 a los 7, 14 y 21 días de cultivo se evaluó su actividad frente a la cepa VPM1. Se colocaron las perlas en placas de agar marino con la cepa VPM1 ajustado a 1×10^8 UFC/ml y se incubó durante 24 horas a 35 °C. Se probaron diferente número de perlas (1, 3 y 6) en las placas de agar y se utilizó como control positivo 25 µg de cloranfenicol. Posteriormente se midieron los halos de inhibición.

A partir de los resultados obtenidos en el experimento anterior, se evaluó el efecto de los encapsulados de PA-Sa-34'-1 frente a VPM1 en un co-cultivo. Para determinar el número de encapsulados a utilizar en el ensayo de co-cultivo se midió el radio de inhibición que mostraron en el ensayo de actividad en placas de agar marino, y se llevó a un valor de volumen, con base a una aproximación de la longitud de difusión alcanzado bajo el efecto de una perla. Esto mostró un valor de 3.8 perlas por ml de medio líquido. Los ensayos se evaluaron tomando en cuenta este valor y el doble de este. Se utilizó 6 % de inóculo inicial de *S. arenicola* para la realización de las perlas.

Considerando los días de mayor actividad, se realizaron las perlas y se incubaron los encapsulados en caldo marino a 30 °C y 120 rpm, durante 7, 14 y 21 días cuando se le añadió la cepa VPM1 ajustado a 1×10^4 UFC/ml y crecida previamente durante 24 horas.

Los encapsulados realizados a los 14 y 21 días de cultivo de PA-Sa-34'-1 se pusieron en tubos de cristal con 5 ml de caldo marino, y se probaron dos tratamientos, 19 y 38 encapsulados. Se incubaron a 30 °C en agitación a 150 rpm, durante los 0, 7, 14 y 21 días posteriores a la encapsulación. Llegados estos tiempos se le añadió la cepa VPM1 ajustando a 1×10^4 células/ml. Como controles positivos se aplicaron los tratamientos: (1) cepa VPM1 con los encapsulados sin PA-Sa-34'-1 y (2) VPM1 solamente.

Todos los tratamientos se incubaron a las mismas condiciones expuestas anteriormente. Se tomaron 200 µl de muestra a los tiempos 0, 4, 8, 12 y 24 horas, y se pasaron a placas de 96 pocillos para medir DO a 600nm.

7.5 Determinación de las fases de desarrollo morfológico y viabilidad de la cepa PA-Sa-34'-1 de *Salinispora arenicola* encapsulada

Se realizó un seguimiento de las bacterias en el interior de las cápsulas de alginato con el objetivo de identificar las fases de desarrollo de PA-Sa-34'-1 mediante microscopía electrónica de barrido en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Para ello se analizaron las cápsulas realizadas a los 14 y 21 días de cultivo y a los tiempos 0, 7, 14 y 21 días posteriores a la encapsulación. Luego de realizadas las cápsulas se pusieron en nitrógenos líquido y fueron almacenadas a -70 °C hasta su análisis mediante MEB.

La preparación de las muestras para ser observadas mediante microscopía electrónica de barrido se realizaron de la siguiente manera: primero se lavaron los encapsulados con agua destilada 3 veces, dejando el doble del volumen que ocupan las perlas en el último lavado, posteriormente se realizó la fijación con tetróxido de osmio, añadiéndose dos gotas a cada muestra; luego de que las perlas alcanzaran una coloración oscura al cabo de 24 horas se realizó otros 3 lavados con agua destilada. Seguidamente, se pasó a la prehidratación utilizando un gradiente de alcohol del 30%, 60%, 80% y 100% y dejando incubar durante 30 minutos para cada concentración. Posteriormente se siguió al secado al punto crítico para finalmente montarse las perlas abiertas en una cámara al vacío Sputter Coater para su recubrimiento con oro.

La viabilidad y densidad celular en el interior de las cápsulas se determinó mediante maceración de las perlas y sembrado en placas de agar marino. Se determinó el número de UFC/perla mediante cuenta en placa.

7.6 Evaluación del crecimiento de los encapsulados de *Salinispora arenicola* en el sedimento

Se obtuvieron muestras de sedimento de estanques de cultivo de la granja de camarón comercial. El sedimento fue colocado en matraces de 250 ml con 46 g de sedimento, el cual ocupa una altura de 1 cm, se esterilizó durante 40 minutos a 121 °C. Posteriormente se le añadió 200 ml de agua de mar filtrada a 0.2 µm y esterilizada en autoclave. A cada

unidad se le colocaron 100 cápsulas de PA-Sa-34'-1 con aireación constante. Los experimentos se realizaron por triplicados.

Para determinar la prevalencia de PA-Sa-34'-1 encapsulada en el sedimento se tomaron 3 muestras de sedimento a los 7, 14 y 21 días posteriores a la encapsulación de las bacterias y se colocaron en tubos de 15 ml. A cada muestra se le añadió agua de mar estéril y filtrada para una proporción de 1 g de sedimento en 9 ml de agua de mar. Se realizaron diluciones decimales y posteriormente se sembró en placas de agar marino para determinar cuenta viable.

7.7 Evaluación del efecto de la inclusión de los encapsulados de *S. arenicola* en el control de *V. parahaemolyticus* en el sedimento

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inclusión de los encapsulados de PA-Sa-34'-1 en el control de VPM1 en el sedimento se montaron las unidades experimentales como se explica en el apartado 7.6, por triplicado.

Luego de la incubación de los encapsulados de PA-Sa-34'-1 durante 14 y 21 días por separados, en sedimento, se añadió la cepa VPM1 a la densidad de 10^4 células/ml. Posteriormente, se evaluó el efecto sobre VPM1 mediante el conteo de UFC tanto en sedimento como en la columna de agua a las 24, 48, 72 y 96 horas después del reto, y se comparó con un control positivo sin adición de bacterias encapsuladas.

El conteo de VPM1 se realizó mediante diluciones decimales en medio TCBS, se incubaron a 30 °C durante 48 horas y se realizó el conteo de UFC mediante el método de microgota.

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de los datos, se aplicó un ANOVA y posteriormente para determinar las diferencias significativas se realizó una prueba a posteriori de Tukey, con valor $p < 0.05$. Se trabajó con el programa Statistica.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de curva de crecimiento de la cepa PA-Sa-34'-1 de *Salinispora arenicola*

La curva de crecimiento de la cepa PA-Sa-34'-1 se realizó tomando muestras de 5 ml a los días 0, 4, 7, 10, 14, 18, 21, 25 y 28 de cultivo, se centrifugaron a 4000 g durante 10 minutos para medir el volumen del paquete celular (PVC). La gráfica 1 muestra la curva de crecimiento desarrollada durante los primeros 28 días del cultivo bacteriano. Se puede observar la fase de adaptación durante los primeros 4 días del cultivo, seguida de una fase de crecimiento exponencial hasta el día 10 de cultivo. Posteriormente se aprecia una fase estacionaria hasta el día 25 de cultivo seguida de la fase de muerte celular.

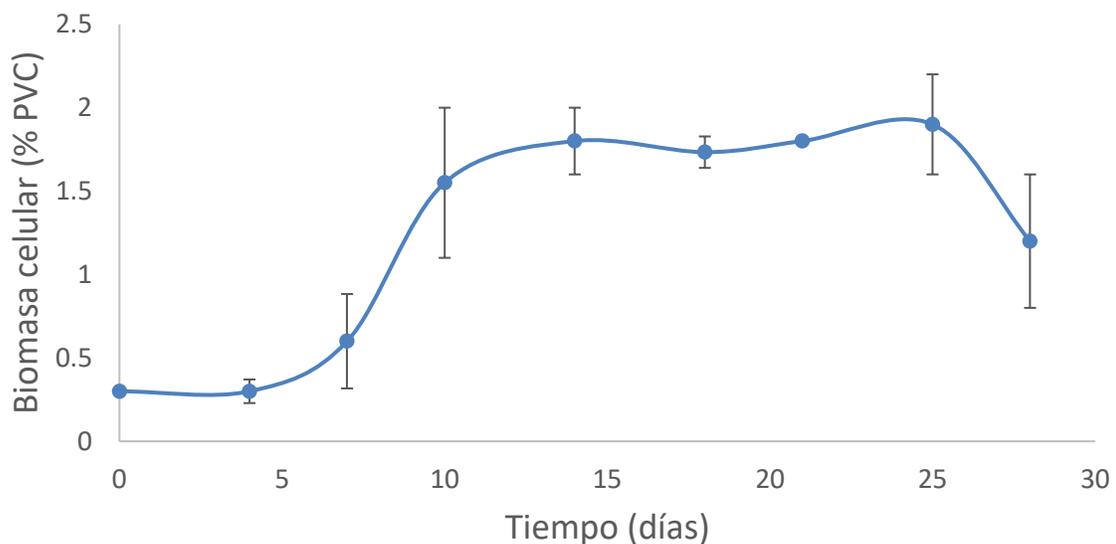


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa PA-Sa-34'-1 de *Salinispora arenicola* durante 28 días de cultivo.

8.2 Determinación de los bioencapsulados de cepas de *Salinispora arenicola*

Se realizaron bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 a los 7, 14 y 21 del cultivo, con diferente porcentaje de inóculo inicial, 4 %, 6 % y 8 % y se obtuvieron perlas de 3 mm de diámetro como se muestran en la figura 2. Al momento en que se realizó el escalado del cultivo se partió de un inóculo inicial de 5.6×10^4 UFC/ml.



Figura 2. Perlas obtenidas con alginato de sodio 1 % y goteadas en cloruro de calcio al 10 % (A) Medición. (B) Vista al estereoscopio.

8.3 Evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* frente a la cepa M1 de *V. parahaemolyticus*

Se evaluó la actividad de los encapsulados de PA-Sa-34'-1 realizados a los 7, 14 y 21 días de cultivos frente a la cepa VPM1 (10^8 células/ml). Fueron evaluados los diferentes tiempos, porcentajes de inóculo en las perlas, así como los distintos número de perlas.

El ensayo de actividad de los bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 mostró una variación en la actividad con respecto al tiempo de cultivo. La menor actividad frente a la cepa VPM1 se presentó con las perlas elaboradas con un cultivo de 7 días comparado con los encapsulados realizados a los 14 y 21 días de cultivo cuya actividad se incrementó. Se usó como control positivo 25 μ g de cloranfenicol (Fig. 3).

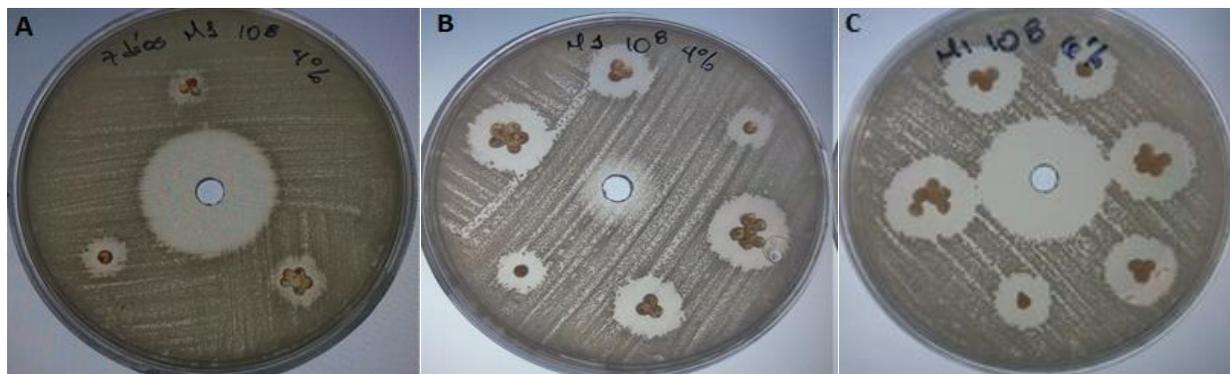


Figura 3. Actividad de los bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 (A) 7 días de cultivo (B) 14 días de cultivo (C) 21 días de cultivo, frente a la cepa VPM1.

Con respecto al porcentaje del inóculo a utilizar para la elaboración de las perlas, los mayores halos de inhibición se mostraron con 6 % y 8 % de inóculo, sin diferencias significativas entre ambos, de ahí que se decidió tomar el inóculo del 6 % para continuar con los ensayos de actividad frente VPM1.

Por otro lado, el número de encapsulados probados no mostró diferencias en la inhibición provocada, posiblemente se debe a que las moléculas encargadas de la inhibición tuvieron la misma difusión tanto para 1,3 ó 6 encapsulados, observado en el radio de inhibición. Lo que sugiere que la inhibición no fue dependiente del número de células presentes (Fig 4).

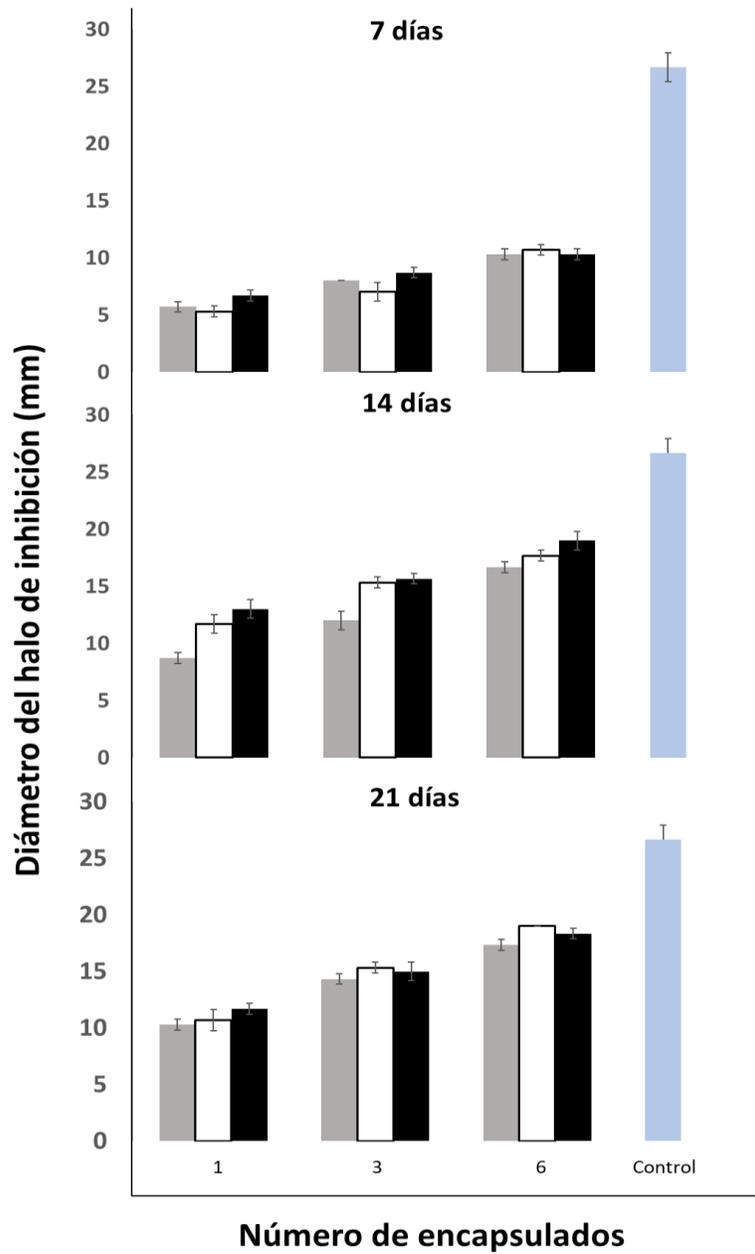


Figura 4. Medición de los halos de inhibición en el ensayo de actividad frente a VPM1 a los 7, 14 y 21 días de cultivo de PA-Sa-34'-1. Se evaluaron diferente número de encapsulados y porcentaje de inóculo representado por las barras grises, 4 %; barras blancas, 6 %; barras negras, 8 % y como control el cloranfenicol representado con la barra azul.

8.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de los encapsulados frente a la cepa M1 de *V. parahaemolyticus* mediante co-cultivo

A través de un co-cultivo se evaluó la actividad de los encapsulados de PA-Sa-34'-1, realizados a los 14 y 21 días de cultivos, siendo los días que mayor actividad mostraron en el ensayo en placas.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de co-cultivo para los encapsulados realizados a los 14 días de cultivo y 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación frente a la cepa VPM1.

Los encapsulados con cultivo de 14 días mostraron efecto significativo en la reducción del crecimiento de VPM1 al cabo de las 24 horas en el tiempo de 7 días posteriores a la encapsulación de PA-Sa-34'-1 en el tratamiento con 38 perlas. Sin embargo, este efecto se pierde con el paso de los tiempos de encapsulación restantes, de ahí que, el crecimiento de VPM1 comienza a potenciarse comparado con el control de crecimiento.

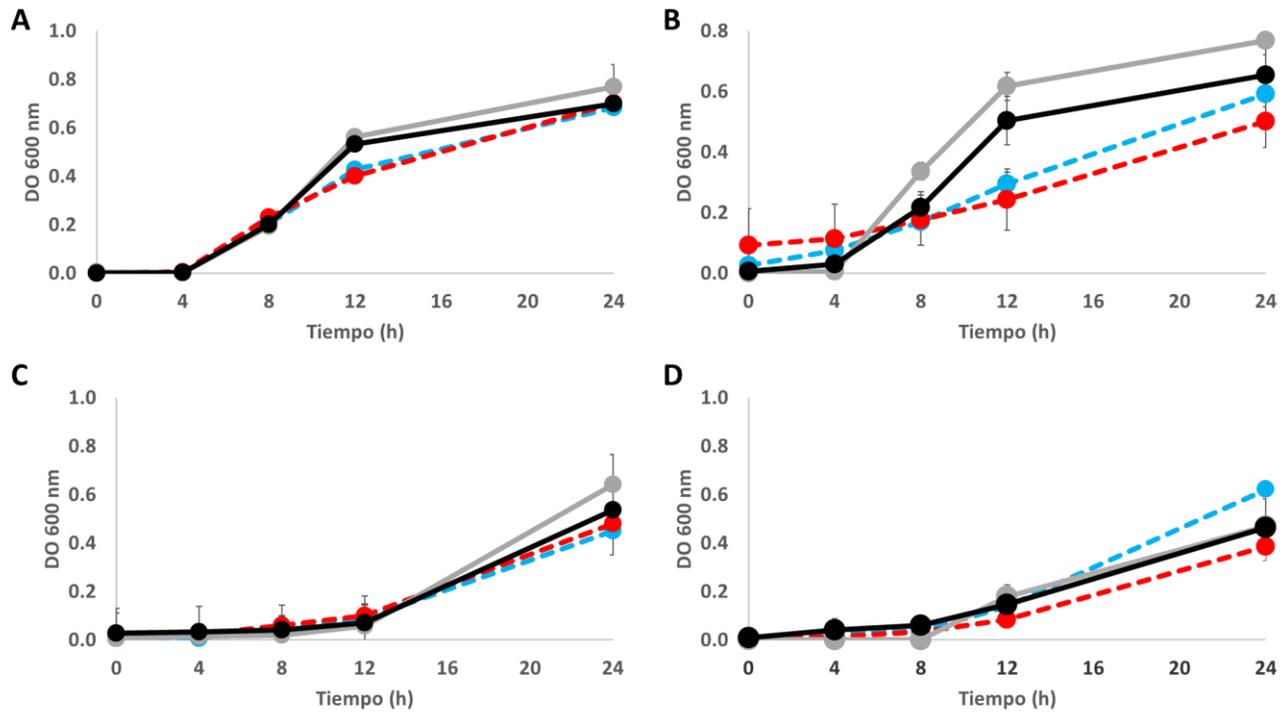


Figura 5. Actividad de los bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 realizados a los 14 días del cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21(D) días de encapsulación frente a la cepa VPM1 en co-cultivo. La línea gris representa el crecimiento de VPM1, la línea negra el tratamiento de VPM1 con encapsulados sin PA-Sa-34'-1 y las líneas discontinuas azul y roja muestran los tratamientos con 19 y 38 perlas respectivamente.

Tabla 1. Valores de densidad óptica arrojados en los ensayos de co-cultivo a los 14 días del cultivo con 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación frente a la cepa VPM1. Análisis estadístico ANOVA y prueba a posteriori Tukey, $p < 0.05$. Las letras con superíndices diferentes marcan los grupos con diferencias significativas y letras iguales no hay diferencias significativas.

	Control de Crecimiento de <i>Vibrio</i>	19 perlas	38 perlas	P
0 días	0.77 ± 0.09 ^a	0.68 ± 0.04 ^a	0.70 ± 0.01 ^a	>0.05
7 días	0.77 ± 0.09 ^a	0.59 ± 0.08 ^a	0.50 ± 0.09 ^b	<0.05
14 días	0.64 ± 0.09 ^a	0.45 ± 0.10 ^a	0.48 ± 0.05 ^a	>0.05
21 días	0.47 ± 0.12 ^a	0.62 ± 0.03 ^a	0.39 ± 0.05 ^a	>0.05

La figura 6 muestra los resultados obtenidos de los encapsulados realizados a los 21 días de cultivo con 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación frente a la cepa VPM1.

En los resultados obtenidos a los 21 días de cultivo se comenzaron a observar efecto inhibitorio significativo a los 7 días posteriores a la encapsulación tanto para 19 como 38 encapsulados. Ya para los 14 y 21 días post-encapsulación el efecto se observa en ambos tratamientos (19 y 38 encapsulados), con inhibición del 99% (Tabla 2).

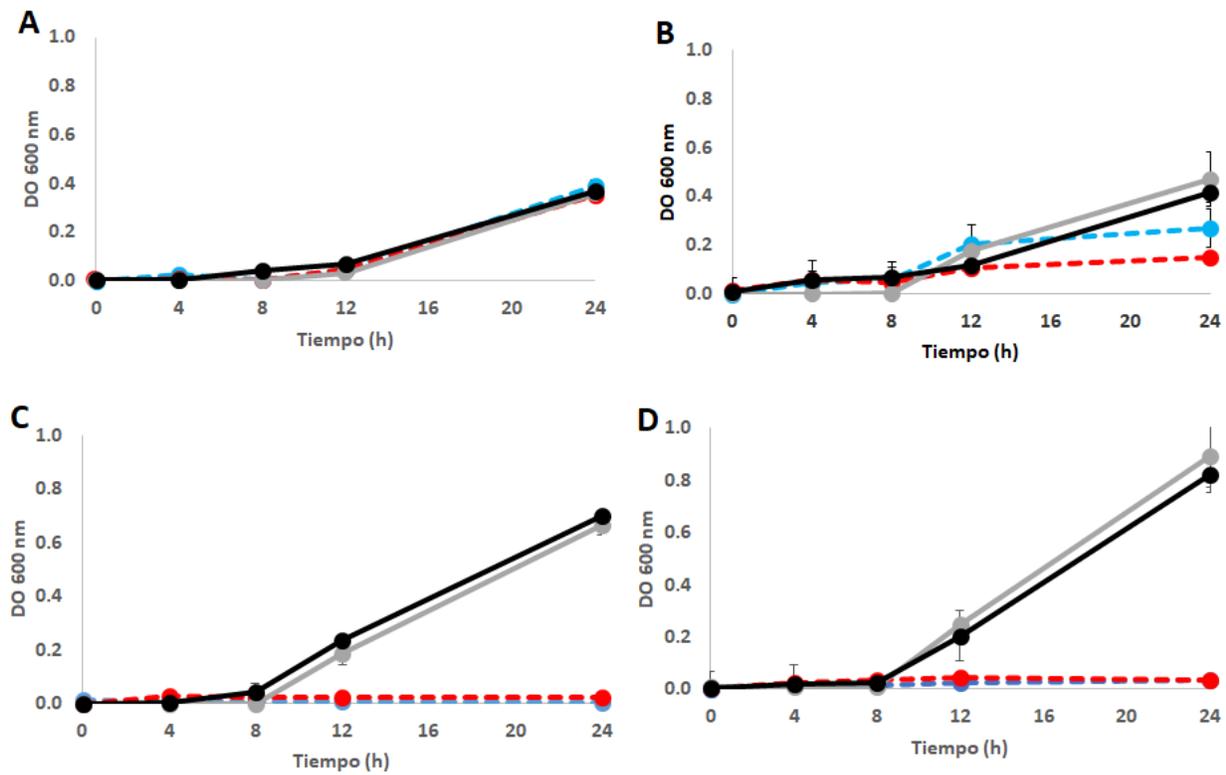


Figura 6. Actividad de los bioencapsulados de PA-Sa-34'-1 realizados a los 21 días del cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) días de encapsulación frente a la cepa VPM1 en co-cultivo. La línea gris representa el tratamiento de VPM1 solamente, la línea negra el tratamiento de VPM1 con los encapsulados sin PA-Sa-34'-1 y las líneas discontinuas azul y roja muestran los tratamientos con 19 y 38 perlas respectivamente.

Tabla 2. Valores de densidad óptica arrojados en los ensayos de co-cultivo a los 21 días del cultivo con 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación frente a la cepa VPM1. Análisis estadístico ANOVA y prueba a posteriori Tukey, $p < 0.05$. Las letras con superíndices diferentes marcan los grupos con diferencias significativas y letras iguales no hay diferencias significativas.

	Control de Crecimiento de <i>Vibrio</i>	19 perlas	38 perlas	P
0 días	0.37 ± 0.03 ^a	0.40 ± 0.03 ^a	0.36 ± 0.01 ^a	>0.05
7 días	0.51 ± 0.11 ^a	0.27 ± 0.09 ^b	0.14 ± 0.13 ^b	<0.05
14 días	0.71 ± 0.05 ^a	0.02 ± 0.51 ^b	0.001 ± 0.001 ^b	<0.01
21 días	0.86 ± 0.12 ^a	0.07 ± 0.04 ^b	0.01 ± 0.002 ^b	<0.000

8.5 Determinación de las fases de desarrollo morfológico y viabilidad de la cepa PA-Sa-34'-1 de *Salinispora arenicola* encapsulada

Con el objetivo de determinar las fases de desarrollo morfológico en el que se encontraban las células en el interior del alginato, se tomaron muestras de los encapsulados a los mismos tiempos en los que se realizaron los retos con VPM1. Las muestras fueron preparadas y se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido (Figuras 7 y 8).

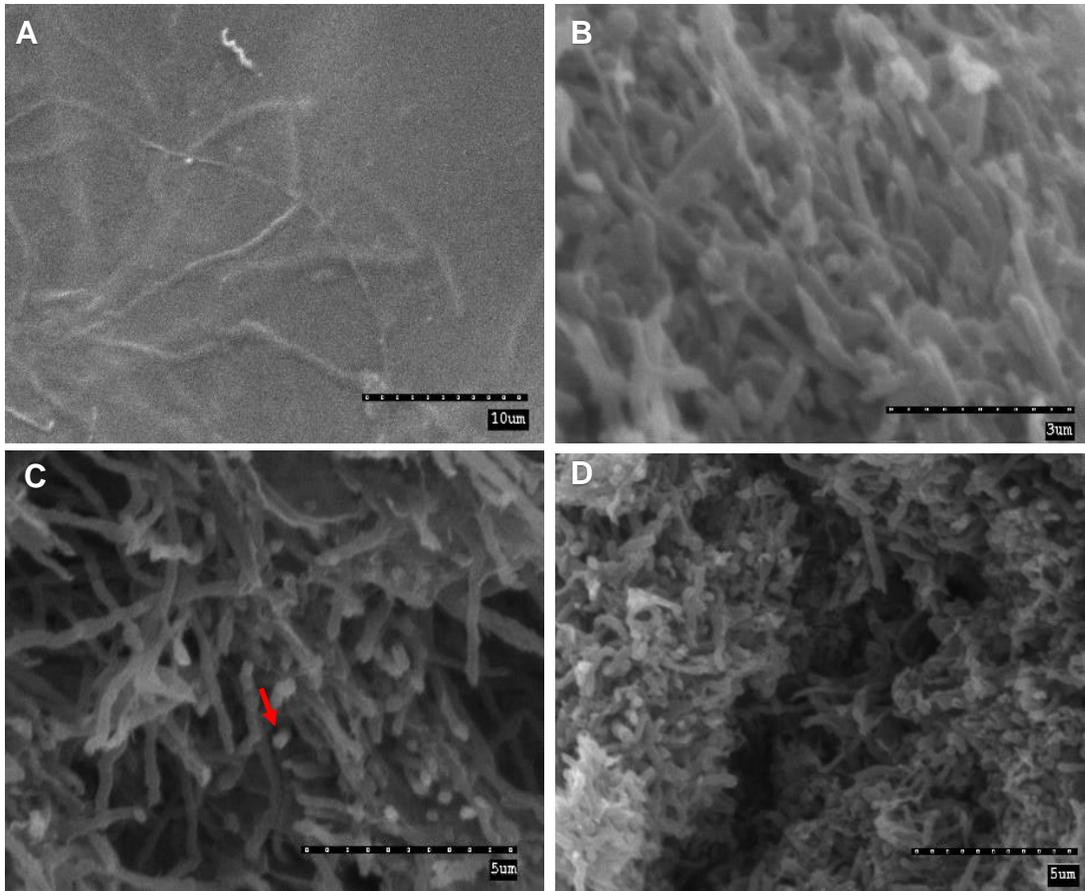


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido a los 14 días de cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) días post-encapsulación. La flecha roja muestra ensanchamiento en el extremo apical del micelio.

Para los encapsulados realizados a los 14 días de cultivo se puede observar a los 0 días post-encapsulación un incipiente crecimiento micelar (Fig 7A), el cual fue aumentando su densidad con el paso de los días de post-encapsulación (Fig 7D). La formación de esporas se observa hasta los 21 días posteriores a la encapsulación (Fig. 7D), sin embargo se puede apreciar un ensanchamiento en el extremo del micelio (Fig 7C), lo cual pudiera corresponder con el inicio de la esporulación.

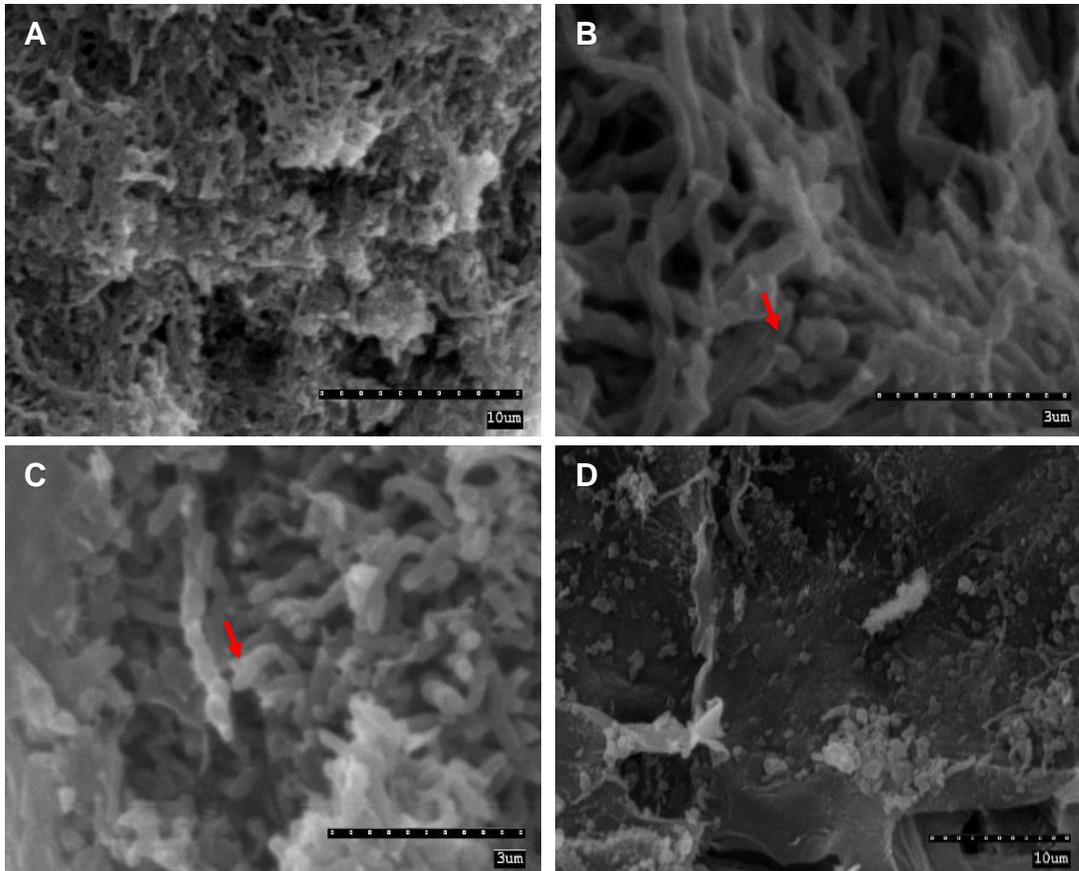


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido a los 21 días de cultivo y 0 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) días post-encapsulación. La flecha roja muestra ensanchamiento en el extremo apical del micelio.

En los encapsulados realizados a los 21 días de cultivo, desde los 7 días posteriores a la encapsulación ya se observa un inicio de la esporulación con un ensanchamiento en el extremo del micelio (Fig. 8A). Para el día 21 post-encapsulación la formación de esporas es notable, observándose estructuras circulares separadas del crecimiento micelar (Fig. 8D).

Otro dato importante de resaltar fue el hecho de que las células se ubicaron en el interior de las cápsulas de alginato para su crecimiento (Fig. 9).

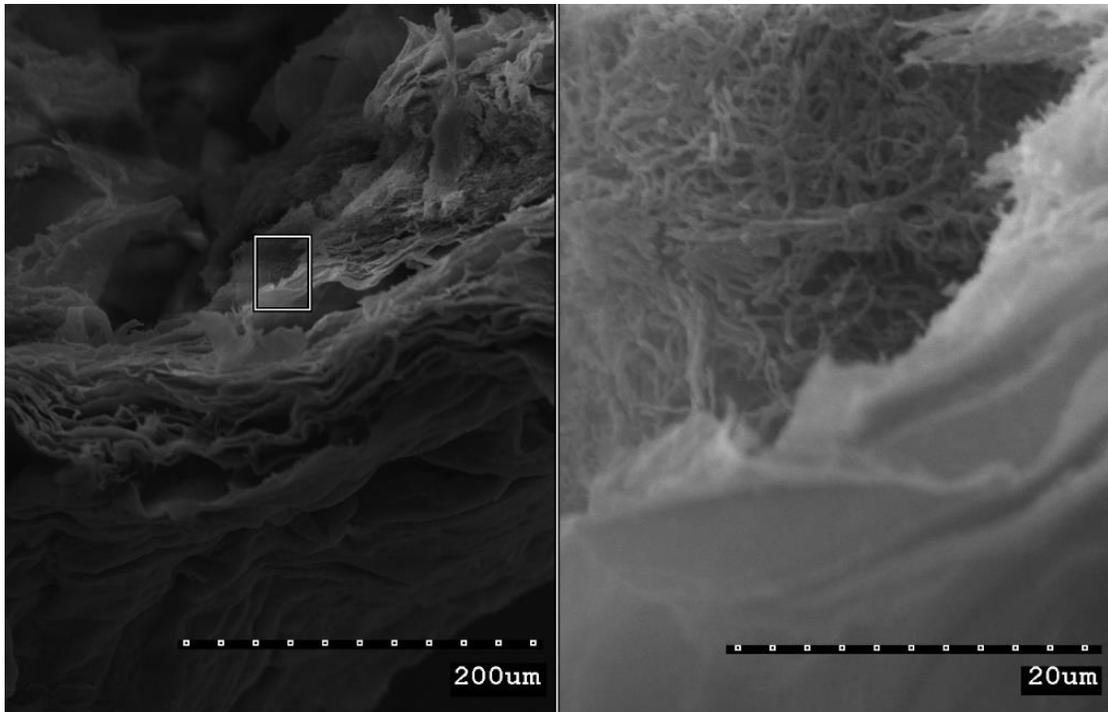


Figura 9. Ubicación de las células de PA-Sa-34'-1 dentro de las cápsulas de alginato observadas mediante microscopía electrónica de barrido.

Con el aumento en la cantidad de micelio formado con el paso de los días analizados, pudimos concluir que las células se encuentran viables en el interior de las capas de alginato.

Por otro lado, se contabilizó mediante UFC el crecimiento celular en el interior de las perla de alginato que se habían realizado con 21 días de cultivo e incubados durante 14 y 21 días post-encapsulación. Para ello se maceró una perla y se resuspendió en 1 ml de caldo marino, para luego ser sembrado 100 μ l en placas de agar marino. Al cabo de los 14 días se obtuvo un valor de 2.0×10^2 UFC/perla (~ 14 UFC/ mm^3 del encapsulado), mientras que a los 21 días post-encapsulación, tenía 1.2×10^3 UFC/perla (~ 85 UFC/ mm^3). Se realizó el análisis por triplicado.

8.6 Evaluación del crecimiento de los encapsulados de *Salinispora arenicola* en el sedimento

A partir de las unidades experimentales realizadas como se explica en el acápite 7.6, se tomaron 3 muestras de sedimento en cada una de las 3 réplicas del ensayo a los 7, 14 y 21 días posteriores a la encapsulación. Los valores arrojados mostraron un aumento en el número de UFC, siendo de 1.96×10^5 UFC/g de sedimento, para los 7 días posteriores a la encapsulación de las bacterias y puestas en el sedimento. Mientras que para los 14 días el valor fue de 1.18×10^6 UFC/g de sedimento teniendo un incremento hasta los 21 días de 4.35×10^6 UFC/g. El haber obtenido estos resultados nos da la idea de que *S. arenicola* es capaz de crecer y adaptarse a las condiciones establecidas en el laboratorio y utilizar los nutrientes presentes en el sedimento recolectado de la granja de camarones.

8.7 Evaluación del efecto de la inclusión de los encapsulados de *S. arenicola* en el control de *V. parahaemolyticus* en el sedimento

Los resultados obtenidos anteriormente, tanto en el ensayo de co-cultivo, donde se logró determinar el efecto inhibitorio de PA-Sa-34'-1 encapsulada frente a VPM1, así como la capacidad de crecer dentro de las cápsulas de alginato y a través del sedimento, dio pauta a poder determinar la capacidad de producir compuestos bioactivos capaces de inhibir el crecimiento de VPM1, y que logaran una difusión hacia el sedimento.

Primeramente se evaluó el crecimiento y comportamiento de la cepa VPM1 en el sedimento, siendo el control positivo del ensayo. Las unidades experimentales se prepararon de la misma manera como se presenta en el acápite 7.6 sin añadir los encapsulados de PA-Sa-34'-1. Se probó un inóculo inicial de VPM1, de 10^4 células/ml.

Se tomaron muestras de la columna de agua y del sedimento durante 24, 48, 72 y 96 horas. Por otro lado, se evaluó el efecto de los metabolitos secundarios producidos por los encapsulados de PA-Sa-34'-1 frente a VPM1. Para ello, se mantuvieron las perlas durante

14 y 21 días en el sedimento en unidades experimentales por separado para luego de llegar los tiempos deseados realizarse el reto.

Los resultados obtenidos mediante conteo de UFC para sedimento y en la columna de agua se muestran en las figuras 10 y 11 respectivamente.

El grupo control mostró un crecimiento esperado, puesto que se observan mayor número de UFC de VPM1 en sedimento que en la columna de agua.

En el sedimento, la curva de crecimiento de VPM1 muestra una fase de adaptación hasta las 48 horas y una fase exponencial marcada hasta las 72 horas, para continuar con una fase de meseta hasta las 96 horas evaluadas.

Los grupos tratados con los encapsulados de PA-Sa-34'-1 mostraron una disminución en el crecimiento de VPM1 a las 72 h, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa. Para las 96 h de cultivo el efecto ya no se observa.

En el agua, el comportamiento fue totalmente contrario, el conteo de UFC del grupo control fue muy bajo, mientras que en los tratamientos el crecimiento fue significativamente mayor a partir de las 48 horas.

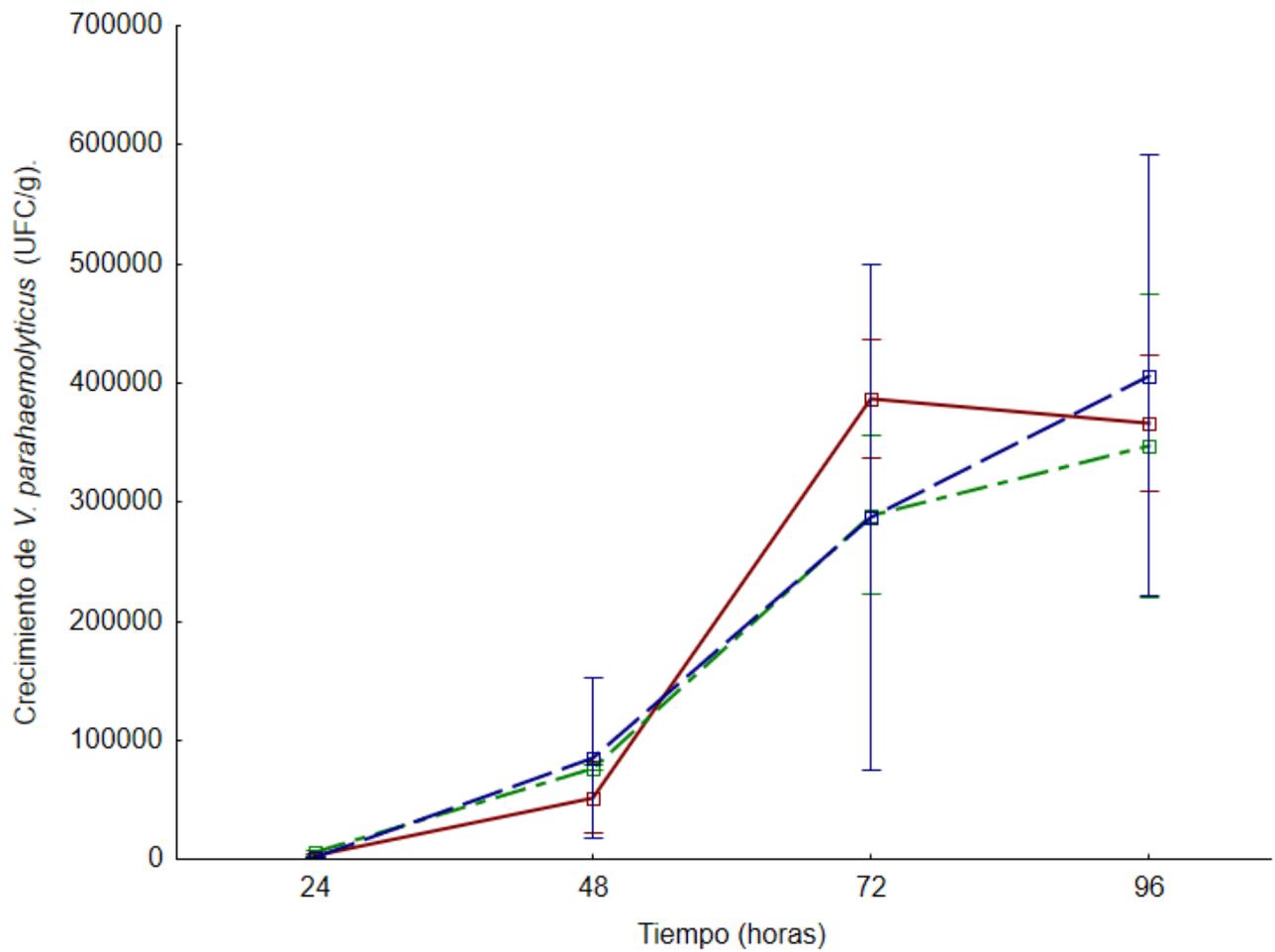


Figura 10. Crecimiento de VPM1 frente a los encapsulados de PA-Sa-34'-1 en sedimento. La línea roja representa el control de crecimiento, la línea verde corresponde al tratamiento con encapsulados de 14 días y la línea azul con encapsulados de 21 días.

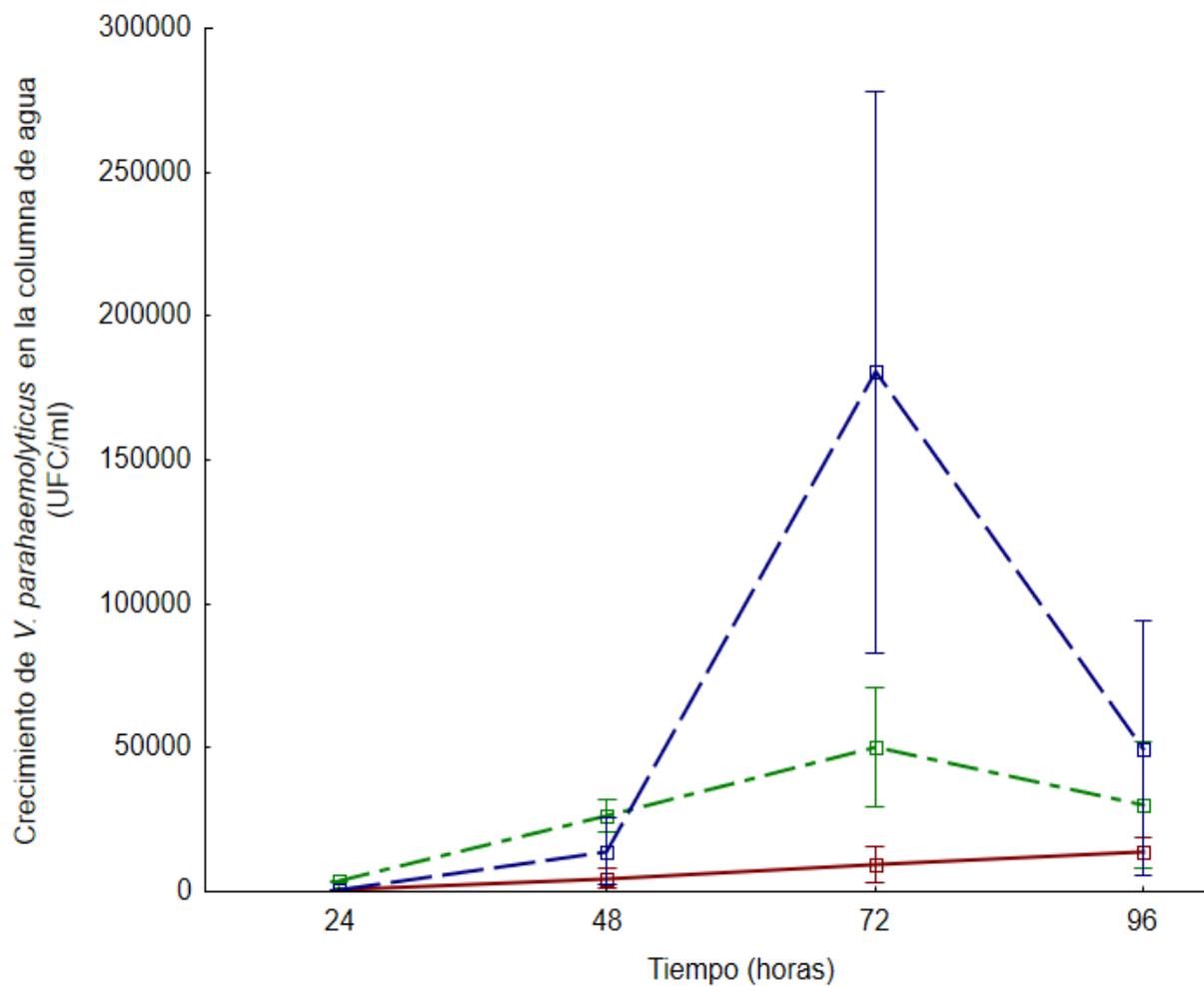


Figura 11. Crecimiento de VPM1 frente a los encapsulados de PA-Sa-34'-1 en la columna de agua. La línea roja representa el control de crecimiento, la línea verde corresponde al tratamiento con encapsulados de 14 días y la línea azul con encapsulados de 21 días.

9. DISCUSIÓN

Los actinomicetos desempeñan un papel importante en el reciclaje de materia orgánica en el medio, de ahí que se han realizado estudios basados en su capacidad como biorremediadores en la acuicultura (Babu *et al.*, 2018). Esta característica, unida a su producción de compuestos bioactivos, ampliamente estudiado en este grupo, los hace candidatos para su uso como agentes de control biológico.

El género *Salinispora* es un miembro raro de la comunidad bacteriana, su forma de crecimiento micelar y su capacidad para secretar metabolitos secundarios biológicamente activos sugiere que podría tener un impacto importante en la estructura de la comunidad localizada, contribuyendo así a la heterogeneidad microbiana de los sedimentos (Patin *et al.*, 2017).

En el presente trabajo, se evaluó la hipótesis de que los metabolitos secundarios producidos por *S. arenicola* encapsulada son capaces de inhibir el crecimiento de la cepa M1 de *V. parahaemolyticus* en el sedimento; siendo así, un candidato para ser usado como agente de control biológico.

Primeramente, se determinó la curva de crecimiento de la cepa PA-Sa-34'-1 de *Salinispora arenicola*, teniendo el inicio de la fase exponencial a los 4 días de cultivo. El comienzo de las diferentes fases en el desarrollo bacteriano, observado en la curva de crecimiento, puede variar dependiendo del medio de cultivo donde se esté creciendo al microorganismo. Diferencias podemos encontrar en el trabajo realizado por Patin *et al.*, 2015 en el cual observan el inicio de la fase exponencial al cabo de los 9 días de cultivo. Para *S. arenicola* se ha descrito un ciclo de desarrollo bastante largo comparado con otras especies bacterianas, incluso con diferencias entre el mismo género, teniendo un tiempo de duplicación de 5.2 días según Patin *et al.*, 2015 comparado con 3.5 días en *S. tropica*.

9.1 Evaluación de la actividad inhibitoria frente a la cepa M1 de *V. parahaemolyticus* y su relación con las fases de desarrollo morfológico

La inhibición del crecimiento debido a la producción de antibióticos u otras sustancias inhibitorias puede definirse como una competencia por interferencia, mientras que la inhibición debida al agotamiento de nutrientes puede considerarse una competencia por explotación (Hibbing *et al.*, 2010).

La exclusión competitiva es uno de los procesos ecológicos que se pueden manipular para modificar la composición de especies de un cuerpo de agua o suelo u otro entorno microbiano. Pequeños cambios en los factores que afectan las tasas de crecimiento o mortalidad conducirán a cambios en el dominio de las especies (Augustine *et al.*, 2016).

El uso de actinomicetos marinos como organismo potencial contra las biopelículas producidas por *Vibrio* spp. ha sido descrito y se recomienda su uso para prevenir enfermedad causadas por este género (You *et al.*, 2007).

Como parte de esta investigación, se realizaron ensayos de difusión en agar para determinar el efecto de los encapsulados de PA-Sa-34'-1 frente al crecimiento de VPM1. Las actividades detectadas en los ensayos de desafío directo podrían estar relacionadas con la presencia de moléculas difusibles y, por lo tanto, indicativas de la producción de antibióticos (Patin *et al.*, 2017).

El mayor efecto inhibitorio se mostró en los retos con los encapsulados realizados a los 14 y 21 días del cultivo, a diferencia de 7 días donde se observa muy poca inhibición ($\sim 7 \pm 3$ mm). Estas variaciones en la actividad pudieran deberse a los cambios morfológicos que están ocurriendo en las células a los 14 días de cultivo, donde se ha reportado según Ng *et al.*, 2013, el inicio de la esporulación para esta especie. Muchos antibióticos se producen al inicio del desarrollo de las esporas, estableciendo así una conexión directa entre la disponibilidad de nutrientes, la diferenciación morfológica y la producción de compuestos (Patin *et al.*, 2017). Trabajos enfocados en la variación en la producción de metabolitos secundarios producidos por *S. arenicola* durante el ciclo de desarrollo fue realizado por Ng *et al.*, 2013, en el cual demuestran que la rifamicina se produce durante todo el ciclo, con modificaciones en cantidad relativa en determinadas fases del ciclo, se detectó un pequeño aumento entre los 20 y 22 días del cultivo y posteriormente un aumento marcado después de 28 días de incubación y una disminución a los 34 días, después de la formación de

esporas maduras. Si bien esta es la correlación mejor estudiada, otros trabajos han demostrado que el cambio en las condiciones del cultivo químico o físico también puede provocar la producción secundaria de metabolitos (Pettit, 2011). Los indicadores conocidos incluyen metales pesados, solventes e incluso antibióticos (Pettit, 2011; Seyedsayamdost, 2014), aunque los mecanismos de inducción no se conocen bien.

El co-cultivo se ha convertido en un método popular para inducir la producción de metabolitos especializados, lo que lleva al aislamiento de nuevos compuestos de hongos, fitoplancton y bacterias, incluidos los actinomicetos. En algunos casos, se requiere contacto físico para la inducción, mientras que, en otros, un inductor químico es suficiente para efectuar cambios en el metabolismo especializado (Patin *et al.*, 2018).

En este estudio se evaluó el efecto de los encapsulados de PA-Sa-34'-1 frente a VPM1 mediante un co-cultivo. Se evaluaron los encapsulados realizados a los 14 y 21 días del cultivo con 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación en ambos casos. Para los retos realizados con los encapsulados a los 14 días del cultivo y 0, 7, 14 y 21 días post-encapsulación solo se mostró inhibición significativa el día 7 posterior a la encapsulación. Sin embargo, el efecto inhibitorio no se mantuvo en los tiempos restantes de incubación de 14 y 21 días post-encapsulación. Por lo que, en cierto modo, no se comportó de manera similar al ensayo en placa de agar, ya que los encapsulados realizados a los 14 días del cultivo sí mostraron actividad frente a VPM1, lo cual nos podría llevar a la idea de que el proceso de encapsulación, el ser añadidas en un medio rico en nutrientes nuevamente, y la presencia de otros competidores, no provocaron la producción de compuestos con actividad antibiótica en ninguno de los tiempos de incubación desde 0 a 21 días, además del cambio en la difusión de las moléculas de un medio sólido como el agar a un medio líquido.

La morfología observada mediante microscopía electrónica en estos tiempos mostró un aumento en el crecimiento de micelio con el paso de los días; lo cual nos permite apreciar que las células son capaces de adaptarse a las condiciones de encapsulación en el alginato. No obstante, no se observa formación de esporas al menos hasta los 21 días posteriores a la encapsulación, aunque se puede apreciar al cabo de los 14 días post-encapsulación un ensanchamiento en el extremo del micelio, lo cual pudiera corresponder con una temprana esporogénesis, la cual produce una hinchazón del extremo apical de una hifa antes de ser

delimitada por el septo de esporulación (Ng *et al.*, 2013). El tiempo de inicio de la esporulación coincide con el estudio realizado por Ng y colaboradores en el 2013, donde plantean el inicio a los 14 días en un cultivo en placa de agar SYP (almidón-levadura-peptona).

Por otro lado, los encapsulados realizados a los 21 días del cultivo comenzaron a mostrar actividad en el ensayo de co-cultivo al cabo de los 7 días post-encapsulación, con el tratamiento de 38 perlas. El hecho de haber mostrado actividad con el tratamiento con mayor número de perla nos indica que la concentración en los metabolitos producidos pudiera haber influido sobre el mayor efecto frente a VPM1. Contrario a lo mostrado en el ensayo de desafío directo en placas de agar donde el aumento en el número de perlas no mostró aumento en la actividad, estos cambios podrían deberse a la difusión de los metabolitos activos entre el medio sólido y medio líquido.

Al cabo de los 14 y 21 días posteriores a la encapsulación mostró los mayores niveles de inhibición, llegando a alcanzar valores cercanos al 99% de inhibición. La actividad observada fue comparada con las fases de desarrollo presentes mediante microscopía electrónica de barrido; el cual mostró el inicio de una temprana esporogénesis a los 7 días posteriores a la encapsulación, iniciando antes que los encapsulados realizados a los 14 días del cultivo, lo cual pudiera deberse a esta misma razón, el haber continuado su desarrollo en el alginato, desde un cultivo más maduro. La mayor actividad observada en estos días, unido a los cambios en el ciclo de desarrollo, pudiera estar relacionando el metabolismo especializado de actinomicetos con el ciclo de crecimiento (Patin *et al.*, 2018). Sin embargo, la formación de colonias, la estructura de las colonias y la formación de esporas del género *Salinispora* en relación con la producción de antibióticos aún no se han investigado, y solo se dispone de datos limitados sobre la relación de las condiciones de crecimiento con la síntesis del producto natural específico (Ng *et al.*, 2013).

En el estudio realizado por Patin *et al.*, 2017, se evaluó la actividad inhibitoria de *S. arenicola* frente a especies marinas coexistentes de los grupos Actinobacterias, Proteobacteria α y γ , Bacteroidetes y Firmicutes. En este trabajo se determinó que en promedio el 9% de la inhibición generada por *S. arenicola* podría vincularse con el agotamiento del hierro, la

inhibición correspondiente a moléculas difusibles fue del 51%, mientras que el 40% se les atribuyó a otras causas. El bajo porcentaje en la inhibición dado por el agotamiento de hierro se debe a que en esta especie no se ha reportado la presencia de dos grupos de genes adicionales que codifican para la biosíntesis de sideróforos (sid3 y sid 4), presentes en *S. tropica*. Los sideróforos son un mecanismo importante por el cual las bacterias adquieren hierro esencial para el crecimiento y su producción se ha relacionado con el antagonismo en *Vibrio* y *Pseudomonas* spp. Si bien los sideróforos son metabolitos secundarios secretados, se puede argumentar que desempeñan un papel funcional en la competencia por explotación en oposición a los agentes alelopáticos más tradicionales, como los antibióticos, que funcionan en la competencia por interferencia (Patin *et al.*, 2015).

Un resultado notable es la gran cantidad de actividades que no podrían vincularse a moléculas difusibles o limitación de hierro. Estas actividades requieren más estudios y pueden estar relacionadas con el agotamiento de otros nutrientes además del hierro, incluidas las fuentes de carbono y nitrógeno (Patin *et al.*, 2016) .

Algunos de los efectos antibacterianos pueden deberse a la producción de antibióticos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno o alteración del pH al producir ácidos orgánicos.

9.2 Crecimiento de *Salinispora arenicola* en el sedimento y su capacidad de inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* en sedimento

Los encapsulados de PA-Sa-34'-1 una vez puestos en el sedimento, se determinó si eran capaces de salir de las cápsulas y crecer en el sedimento. Los resultados del experimento mostraron que sí es capaz de crecer fuera de las cápsulas, observándose un aumento en el número de UFC de 7 a 21 días. Lo cual nos permite confirmar la teoría de que a pesar de ser un taxón raro en el sedimento marino y encontrarse en la mayoría de los casos en esporas (Patin *et al.*, 2018), sí es capaz de crecer en el sedimento de manera vegetativa.

Por otro lado, se evaluó el crecimiento de VPM1 en el sedimento. Se probó un inóculo inicial de 10^4 células/ml mostrando mayor número de UFC en sedimento que en la columna de agua. Este resultado coincide con lo planteado por Dabadé *et al.*, 2016 donde realizó un estudio en el cual determina la concentración y diversidad de este género en el agua,

sedimento y en el tracto digestivo de camarones, determinando que se localiza en mayor medida en estos dos últimos. Esto nos permite creer que los metabolitos producidos por *S. arenicola* podrían actuar de manera más directa hacia el patógeno en el sedimento, pudiéndose tomar como método de control biológico en estanques de cultivo de camarones.

Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron inhibición en el crecimiento de VPM1 en ninguno de los tiempos retados con los encapsulados de PA-Sa-34'-1. Esto nos permite suponer que las nuevas condiciones para PA-Sa-34'-1 no son propicias para la síntesis de compuestos con actividad antibiótica efectivos hacia VPM1. En los experimentos anteriores y en la bibliografía citada se plantea claramente que la disponibilidad de nutrientes, los cambios morfológicos y la producción de compuestos están muy relacionados. Ante las condiciones experimentales presentes en el ensayo no podemos saber la disponibilidad de nutrientes presentes para *S. arenicola* en el sedimento, por lo que podríamos plantear que las discrepancias entre los resultados publicados con los ensayos anteriores podrían deberse a una serie de razones que incluyen: diferentes umbrales de crecimiento, diferentes estados fisiológicos del inóculo o madurez del cultivo, concentraciones de nutrientes o incluso diferencias en las fuerzas iónicas entre el medio caldo marino y el agua de mar.

En caso de presentarse una falta de nutrientes para *S. arenicola* en el sedimento, como se observa para *V. parahaemolyticus*, se ha planteado según Contador *et al.*, 2015 para la especie de *S. tropica*, que esta es capaz de utilizar el alginato como fuente de carbono. Análisis de BLASTp han detectado, para esta especie, genes de aminoácidos con baja identidad (40%) que codifican para liasas de alginato. La utilización del alginato como fuente de carbono ha mostrado fases más largas de adaptación en la especie.

El comportamiento de *V. parahaemolyticus* a través del conteo de UFC en sedimento se mantuvo similar para ambos tratamientos, mientras que, en la columna de agua el crecimiento se hace significativamente mayor comparado con su control.

En el sedimento se puede apreciar como en el grupo control a las 72 horas comienza una fase de meseta en su crecimiento, en contraste con lo observado en ambos tratamientos (14 y 21 días), donde continua el crecimiento de VPM1, para lo cual, se podría plantear que

existe otra fuente de nutrientes que no se presentó en el grupo control. Este comportamiento se observa más marcado en la columna de agua.

Según el trabajo publicado por Badur *et al.*, 2015 se han descrito enzimas capaces de degradar el alginato (alginato liasas) en cepas de *Vibrio splendidus*. Estas son enzimas que degradan el alginato mediante la eliminación β del enlace glicosídico en oligómeros más pequeños, escinden los enlaces β 1-4 entre β D-manuronato y α 1-4 guluronato. También se han descrito otra familia de enzimas de liasas que degradan el alginato de forma exolítica, convirtiéndolos en los monómeros necesarios para el metabolismo.

Otros trabajos como el realizado por Hehemann *et al.*, 2016 han planteado la presencia de estas enzimas en diferentes especies de vibrios marinos, las cuales se han diversificado en diferentes poblaciones caracterizadas por su capacidad de consumir polisacáridos de alginato insoluble y oligosacáridos de alginato solubles de diferentes longitudes de cadena.

Las nuevas condiciones de crecimiento para *S. arenicola* propiciaron nuevas interacciones entre ambos microorganismos y con el medio circundante. Esto trajo consigo la ausencia en el efecto inhibitorio de PA-Sa-34'-1 frente a VPM1. Algunas de las posibles causas a las que se le atribuye este efecto podrían ser: (1) la ausencia de metabolitos secundarios con actividad antibiótica frente a VPM1, (2) alta tasa de crecimiento de VPM1 aunado o no a la fuente de carbono dada por el alginato, la cual haya superado la tasa de producción de metabolitos producidos por PA-Sa-34'-1, (3) bloqueo de los compuestos con actividad antibacteriana por otras moléculas presentes en el medio que impiden llegar a su sitio diana o incluso (4) la unión de todos estos factores.

La realización de diferentes ensayos de reto *in vitro* y luego en sedimento nos permitió determinar que PA-Sa-34'-1 posee el potencial de producir compuestos con actividad antibacteriana frente a VPM1. Sin embargo, como se ha descrito en la literatura, las condiciones específicas pudieran hacer que las diferentes rutas de síntesis de metabolitos se encuentren activas o no. Además de la presencia de otras moléculas que pudieran estar mediando su actividad.

10. CONCLUSIONES

S. arenicola fue capaz de adaptarse a las nuevas condiciones de encapsulación, observándose un aumento en el conteo de UFC con el paso de los días de incubación.

Los encapsulados de PA-Sa-34'-1 realizados a los 14 y 21 días de cultivo mostraron el mayor efecto inhibitorio frente a VPM1 en placas, sin diferencias significativas entre ambos tiempos.

El aumento en número de perlas utilizadas (1, 3 y 6) en los ensayos en placas de agar marino no mostró un efecto potenciado en la actividad inhibitoria frente a VPM1.

En el experimento de co-cultivo los encapsulados de PA-Sa-34'-1 realizados a los 21 días de cultivo con 14 y 21 días posteriores a la encapsulación mostraron una significativa inhibición (~99%) en el crecimiento de VPM1.

El ensayo de reto en sedimento no mostró efectos significativos en la inhibición en el crecimiento de VPM1 en ninguno de los tiempos de reto evaluados, a diferencia del ensayo de co-cultivo.

La utilización del alginato como un mecanismo de inmovilización para las células de PA-Sa-34'-1 en el ensayo de reto en sedimento, propició posiblemente un ambiente más nutritivo para el crecimiento de VPM1, de ahí que su crecimiento se haya visto potenciado.

11. RECOMENDACIONES

Dado los resultados obtenidos en este estudio en la encapsulación de PA-Sa-34'-1 y su actividad antibacteriana frente a VPM1, se cree conveniente hacer las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones:

- Evaluar otro método de encapsulación para PA-Sa-34'-1 donde no se utilice el alginato o determinar si es efectivo aplicarla de manera directa, dada su capacidad para formar biogránulos.
- Extender el tiempo de incubación de PA-Sa-34'-1 (más de 21 días) en sedimento y evaluar la actividad frente a VPM1.

12. LITERATURA CITADA

- Babu, D. T., Archana, K., Kachiprath, B., Solomon, S., Jayanath, G., Singh, I. B., & Philip, R. 2018. Marine actinomycetes as bioremediators in *Penaeus monodon* rearing system. *Fish & shellfish immunology*, 75: 231-242.
- Bernal, M. G., Á. I. Campa-Córdova, P. E. Saucedo, M. C. González, R. M. Marrero & J. M. Mazón-Suástegui. 2015. Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary world*, 8(2), 170.
- Bose U., A.K. Hewavitharana, M.E. Vidgen, Y.K. Ng, P.N. Shaw, J. A. Fuerst & M. P. Hodson. 2014. Discovering the Recondite Secondary Metabolome Spectrum of *Salinispora* Species: A Study of Inter-Species Diversity. *PLoS ONE*,9(3): e91488.
- Bose, U., Hewavitharana, A. K., Ng, Y. K., Shaw, P. N., Fuerst, J. A., & Hodson, M. P. 2015. LC-MS-Based metabolomics study of marine bacterial secondary metabolite and antibiotic production in *Salinispora arenicola*. *Marine drugs*, 13(1), 249-266.
- Browdy, C.L., J. Hargreaves, H. Tung & Y. Arnimelech. 2014. Proceeding of the biofloc technology and shrimp disease workshop. The Acuaculture Engineering Society, Cooper Hill, VA USA.
- Contador, C. A., Rodríguez, V., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. 2015. Genome-scale reconstruction of *Salinispora tropica* CNB-440 metabolism to study strain-specific adaptation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(5): 1075-1090.
- Dabadé, D. S., Wolkers-Rooijackers, J. C., Azokpota, P., Hounhouigan, D. J., Zwietering, M. H., Nout, M. R., & den Besten, H. M. 2016. Bacterial concentration and diversity in fresh tropical shrimps (*Penaeus notialis*) and the surrounding brackish waters and sediment. *International journal of food microbiology*, 218: 96-104.
- Dulekgurgen, E., S. Ovez, N. Artan & D. Orhon. 2003. Enhanced biological phosphate removal by granular sludge in a sequencing reactor. *Biotechnol*, 25: 687-693.
- Fenical W. & P. R. Jensen. 2006. Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *Nature Chemical Biology*, 2(12): 666-673.
- Hehemann, J. H., Arevalo, P., Datta, M. S., Yu, X., Corzett, C. H., Henschel, A. & Polz, M. F. 2016. Adaptive radiation by waves of gene transfer leads to fine-scale resource partitioning in marine microbes. *Nature communications*, 7: 12860.

- Hibbing, M.E.; Fuqua, C.; Parsek, M.R. & Peterson, S.B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol*, 8: 15-25.
- Iñiguez-Martínez, A.M., F. Cardoso-Martínez, J. de la Rosa, M. Cueto, A. Díaz-Marrero, J. Darias & I. E. Soria-Mercado. 2016. Compounds isolated from *Salinispora arenicola* of the Gulf of California, México. *Biología Marina y Oceanografía*, 51: 161-170.
- Ivanova E., V. Chipeva, I. Ivanova, X. Dousset & D. Poncelet. 2002. Encapsulation of lactic acid bacteria in calcium alginate beads for bacteriocin production. *Journal of Culture Collections*, 3: 53-58.
- Janaki, T. 2016. Antimicrobial Activity of Mangrove Actinomycetes from Soil Sample of *Rhizophora Apiculata*. *Journal of Biotechnological Research*, 1(1): 44-52.
- Jensen P. R., R. Dwight, W. Fenical. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102-8.
- Jensen P. R., E. Gontang, C. Mafnas, T. J. Mincer & W. Fenical. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, 7(7), 1039–1048.
- Jensen P. R. & Mafnas C. 2006. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environmental Microbiology*, 8(11):1881-8.
- Jensen P. R., B. S. Moore & W. Fenical. 2015. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Natural Products Report*, (32)738-351.
- Jiang, H.L., J.H. Tay, S.T.L. Tay. 2002. Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Appl. Microbiol*, 35: 439-445.
- Li J., J. D. Dong, J. Yang, X. M. Luo, S. Zhang. 2014. Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral associated actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106:623-635.
- Lomelí-Ortega, C.O. & S.F. Martínez-Díaz. 2014. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434: 208–211.
- Maldonado, L. A., W. Fenical, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, T. J. Mincer, A. C. Ward, A. T. Bull & M. Goodfellow. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family

Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,55: 1759-1766.

- Martínez-Díaz, S.F. & A. Hipolito-Morales. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, 400–401:120–124.
- Millán-Aguiñaga, N., K. L. Chavarria, J. A. Ugalde, A. C. Letzel, G. W. Rouse & P. R. Jensen. 2017. Phylogenomic insight into *Salinispora* (Bacteria, Actinobacteria) species designations. *Scientific reports*, 7(1): 3564.
- Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman & W. Fenical. 2002. Widespread and persistent Populations of a Major New Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 5005-11.
- Mincer T. J., W. Fenical & P. R. Jensen. 2005. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol*,71(11):7019-28.
- Ng, Y. K., Hewavitharana, A. K., Webb, R., Shaw, P. N., & Fuerst, J. A. 2013. Developmental cycle and pharmaceutically relevant compounds of *Salinispora* actinobacteria isolated from Great Barrier Reef marine sponges. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(7): 3097-3108.
- Ng, Y. K., M. P. Hodson, A. K. Hewavitharana, U. Bose, P. N. Shaw & J. A. Fuerst. 2014. Effects of salinity on antibiotic production in sponge-derived *Salinispora* actinobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1): 109-125.
- Nunan L., D. Lightner, C. Pantoja & S. Gomez-Jimenez. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of aquatic organisms*, 111: 81-86.
- Patin N. V., K. R. Duncan, P. C. Dorrestein & P. R. Jensen. 2015. Competitive strategies differentiate closely related species of marine actinobacteria. *The ISME Journal*, 1–13.
- Patin, N. V., Schorn, M., Aguinaldo, K., Lincecum, T., Moore, B. S., & Jensen, P. R. 2017. Effects of actinomycete secondary metabolites on sediment microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 83(4): e02676-16.
- Patin N. V., D. J. Floros, C. C. Hughes, P. C. Dorrestein & P. R. Jensen. 2018. The role of inter-species interactions in *Salinispora* specialized metabolism. *Microbiology*, 164: 946-955.

- Pedroza, R. 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, México. 438-447.
- Penn, K., Jenkins, C., Nett, M., Udway, D. W., Gontang, E. A., McGlinchey, R. P. & Moore, B. S. 2009. Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacteria. *The ISME journal*, 3(10): 1193.
- Penn, K. and Jensen, P.R. 2012. Comparative genomics reveals evidence of marine adaptation in *Salinispora* species. *BMC Genomics* 13: 86.
- Pettit, R. K. 2011. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial biotechnology*, 4(4): 471-478.
- Rengpipat S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191: 271-288.
- Rodríguez-Camacho J.C., E. Méndez-Gómez, A.M.Rivas-Montaño & J.A.Cortés-Ruiz. 2014. Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Biociencias*, 2(4): 282-292.
- Rosas-Ledesma P., J. M. León-Rubio, F. J. Alarcón, M. A. Moriñigo & M. C. Balebona. 2012. Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43: 106–116.
- Seyedsayamdost, M. R. 2014. High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(20): 7266-71.
- Sharma, M. 2014. Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2): 801-32.
- Soto-Rodriguez, S. A., B. Gomez-Gil, R. Lozano-Olvera, M. Betancourt-Lozano & M. S Morales-Covarrubias. 2014. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied Environmental Microbiology*, 81: 1689-1699.

- Stach, J. E. M., L. A. Maldonado, D. G. Masson, A. C. Ward, M. Goodfellow, & A. T. Bull. 2003. Statistical approaches to estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 69: 6189–6200.
- Subramani R. & W. Aalbersberg. 2012. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167: 571-580.
- Thirumurugan D. & R. Vijayakumar. 2013. Exploitation of Antibacterial Compound Producing Marine Actinobacteria against Fish Pathogens Isolated from Less Explored Environments. *Asian J. Pharm. Res*, 2(3): 75-78.
- Tsueng G. & Lam K. S. 2010. A preliminary investigation on the growth requirement for monovalent cations, divalent cations and medium ionic strength of marine actinomycete *Salinispora*. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5): 1525-1534.
- Tsuneda S., T. Nagano, T. Hoshino, Y. Ejiri, N. Noda & A. Hirata. 2003. Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Res.* 37: 4965-4971.
- Venugopalan V.P., Y.V. Nancharaiah, T.V.K. Mohan & S.V. Narasimhan. 2005. Biogranulation: self-immobilized microbial consortia for high performance liquid waste remediation. *BARC News Lett*, 254:1-8.
- Velmurugan S., T. J. Shani, D. S. Nagaraj, T. A. Ashine, S. Kumaran & S.R. Pugazhvendan. 2015. Isolation of Actinomycetes from Shrimp Culture Pond and Antagonistic to Pathogenic *Vibrio* spp. and WSSV. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(7): 82-92.
- You J., Cao L., Liu G., Zhou S., Tan H. & Lin Y. 2005. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 21: 679-682.